

На правах рукописи

ГАЙНУТДИНОВ ТИМУР ИМИЛЬЕВИЧ

**Тандемные системы бинарных олигонуклеотидных производных:
исследование закономерностей сенсibilизированной фотомодификации
биополимеров**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук



Новосибирск, 2003 г.

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН (бывший Новосибирский институт
биоорганической химии СО РАН)

Научные руководители:

д.х.н., академик
к.х.н.

Власов Валентин Викторович
Добриков Михаил Иванович

Официальные оппоненты:

д.б.н., профессор
д.х.н.

Дымшин Григорий Моисеевич
Сильников Владимир Николаевич

Ведущая организация: Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии "Вектор"

Защита состоится « 17 » октября 2003 г. в 9¹⁵ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01
в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: 630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « 15 » сентября 2003 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор химических наук

Фёдорова О.С.



2003-A
14974

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фотореакционноспособные производные олигонуклеотидов являются перспективными реагентами для направленной химической модификации определенных последовательностей нуклеиновых кислот и инструментами для исследования структуры и функции биополимеров.

Бинарные системы олигонуклеотидных конъюгатов позволяют осуществить фотомодификацию ДНК с повышенной эффективностью (Vlassov et al., 1996; Dobřikov et al., 1997). Принцип подхода заключается в том, что используются два олигонуклеотида, комплементарные соседним участкам ДНК- или РНК-мишени, к одному из которых присоединен сенсibilизатор, к другому – фотореагент. При комплементарном связывании таких пар олигонуклеотидных конъюгатов с нуклеиновой кислотой сенсibilизатор и фотореагент сближаются, в результате чего формируется фотореакционноспособный центр. Облучение образовавшегося комплекса длинноволновым светом вызывает возбуждение сенсibilизатора с последующей активацией фотореагента за счет безызлучательного переноса энергии и фотомодификацию биополимера.

Фотомодификация нуклеиновых кислот и белков, взаимодействующих с РНК и ДНК, бинарными системами олигонуклеотидных конъюгатов может быть использована как инструмент в исследовательских, диагностических и терапевтических целях. В условиях *in vivo* исключительно важно, чтобы фотомодификация инициировалась видимым или ИК-светом, более глубоко проникающим в клетки и не вызывающим, в отличие от коротковолнового УФ, нежелательных побочных эффектов облучения. Поэтому применение бинарных систем олигонуклеотидных конъюгатов активизируемых длинноволновым светом особенно перспективно для использования *in vivo*.

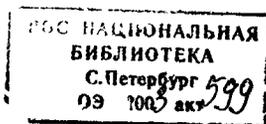
Целью настоящей работы являлась разработка нового подхода для направленного воздействия на нуклеиновые кислоты. В соответствии с этим были поставлены задачи:

Разработка новых, активируемых видимым светом, бинарных систем производных олигонуклеотидов для фотосенсibilизированной модификации биополимеров.

Изучение влияния химической структуры сенсibilизатора и влияния последовательности целевой нуклеиновой кислоты на эффективность фотомодификации ДНК-мишени.

Использование бинарных систем конъюгатов олигонуклеотидов для исследования процессов взаимодействия нуклеиновых кислот с клеточными белками *in vivo*.

Научная новизна и практическая ценность. Разработаны и охарактеризованы новые бинарные системы производных олигонуклеотидов на основе сенсibilизаторов – 3-периленметиламина и 3-аминопропионилгидразон 9-антраценаля, обес-



печивающих в сочетании с фотореагентом (N-(п-азидотетрафторбензаль)-гидразон-N'-пропиониламин) инертность компонентов при облучении видимым светом (более 460 нм) в отсутствие целевого биополимера, но участвующих в формировании активного фотореакционного центра при образовании комплементарного комплекса фотореагент – нуклеиновая кислота – сенсibilизатор. Это позволило осуществить высокоселективную сайт-специфическую модификацию ДНК-мишени. Экспериментально показано, что использование 9-хлор-10-аминометилантрацена в качестве сенсibilизатора позволяет достичь 100% модификации ДНК-мишени, содержащей в сайте модификации последовательность (pG)₄.

Показано, что в отличие от ранее использованных сенсibilизаторов, нерасходуемых в ходе реакции фотомодификации целевой нуклеиновой кислоты, сенсibilизированная 3-аминометилпериленом фотомодификация сопровождается инактивацией сенсibilизатора. Полученные данные позволяют сделать предположение, что наиболее вероятной причиной инактивации сенсibilизатора является фотоокисление периленового остатка вследствие фотоиндуцированного переноса электрона с азидогруппы реагента на электронно-возбужденный сенсibilизатор.

На основе полученных в ходе исследования данных была разработана новая высокоэффективная система для сенсibilизированной фотомодификации биополимеров бинарными системами производных олигонуклеотидов. С использованием этой бинарной системы олигонуклеотидных конъюгатов было исследовано взаимодействие поверхностных белков эукариотических клеток с экстраклеточными нуклеиновыми кислотами. В условиях *in vivo* продемонстрировано, что белки, связывающие олигонуклеотиды, участвуют и в связывании двуцепочечной ДНК.

Публикации и апробация работы. По результатам работы опубликовано 7 статей. Результаты работы были представлены на 2 международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 104 страницах, содержит 21 рисунок и 2 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 195 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Влияние нуклеотидной последовательности ДНК-мишени на эффективность сенсibilизированной фотомодификации

Для достижения значимых биологических эффектов при воздействии на ДНК *in vivo* необходимо, чтобы эффективность модификации была высокой. При фотомодификации ДНК олигонуклеотидными реагентами эффективность реакции зависит от реакционной способности реагента по отношению к нуклеотидам целевой последовательности ДНК-мишени и от геометрических параметров комплекса. Ранее было показано, что эффективность прямой фотомодификации ДНК-мишени за

висит от ее последовательности в сайте модификации (предельная степень модификации растет в ряду Т < С, А < G и составляет 40%, 45%, 45% и 65% соответственно (Levina et al., 1996)).

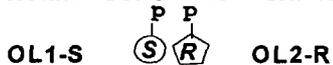
Поэтому для разработки подходов, направленных на увеличение эффективности сенсibilизированной фотомодификации ДНК бинарными системами олигонуклеотидных конъюгатов нами была исследована зависимость выхода продуктов модификации от состава нуклеотидной последовательности ДНК-мишеней в предполагаемом сайте модификации.

1.1. Сенсibilизированная фотомодификация ДНК-мишеней M1 и M2

СХЕМА 1

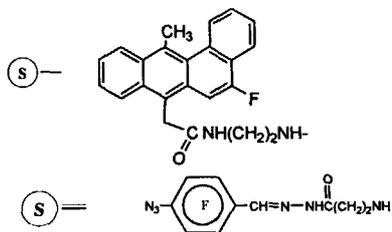
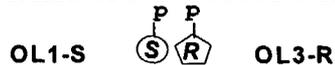
5' * pATCTTTAACTG - ATGAACTTCT M1

3' AGAAATTGAC TACTTGAAGA



5' * pATCTTTAACTG - GTGAACTTCT M2

3' AGAAATTGAC CACTTGAAGA



толов OL2-R и OL3-R (несущих остаток N-(4-азидотетрафторбензилиден)-N'-(3-аминопропил)гидразина) приведены на схеме 1. Использование OL1-BzA в качестве сенсibilизатора было обусловлено тем, что закономерности сенсibilизированной модификации ДНК-мишени M1, в сочетании с используемым фотореагентом были подробно исследованы ранее (Vlassov et al., 1996; Dobrikov et al., 1997).

В результате обработки модифицированных мишеней пиперидином была определена позиционная направленность реакции фотомодификации в комплементарных (M1 + OL2-R); (M1 + OL1-BzA + OL2-R); (M2 + OL3-R); (M2 + OL1-BzA + OL3-R) и неполностью комплементарных (M1 + OL3-R); (M1 + OL1-BzA +

Выбор ДНК-мишеней M1 (нуклеотидная последовательность которой аналогична последовательности регуляторного участка от -96 до -76 гена CYP102, кодирующего цитохром P450) и M2, различающихся одним остатком - A¹² и G¹², был основан на предположении, что присутствие гуанозина в области формирования фотореакционного центра должно приводить к повышению эффективности модификации ДНК-мишени. Структура ДНК-мишеней и олигонуклеотидных конъюгатов: сенсibilизатора OL1-BzA (несущего остаток N-(5-фтор-12-метилбензо[а]антрацен-7-илацетил)этилендиамин), реагентов

OL3-R); (M2 + OL2-R); (M2 + OL1-BzA + OL2-R) комплексах (рис. 1). Деградации облученных в отсутствие фотореагентов мишеней **M1** (дор. 7) и **M2** (дор. 11) не наблюдается. Прямая и сенсibilизированная фотомодификации мишеней **M1** и **M2** в комплементарных комплексах (панель А) протекают по остатку G^{11} (дор. 1, 2) и по остаткам G^{11} , G^{12} (дор. 5, 6, соответственно). Фотомодификация мишеней **M1** и **M2** в неполностью комплементарных комплексах (панель Б) протекает менее специфично. Основное расщепление ДНК **M1** наблюдается по остаткам G^{11} и T^{13} , незначительное расщепление происходит по остаткам T^{10} и A^{12} (дор. 8, 9). Обработка пиперидином фотомодифицированной мишени **M2** приводит к преимущественному расщеплению по остаткам G^{11} , G^{12} и в меньшей степени по остатку T^{13} (дор. 12, 13).

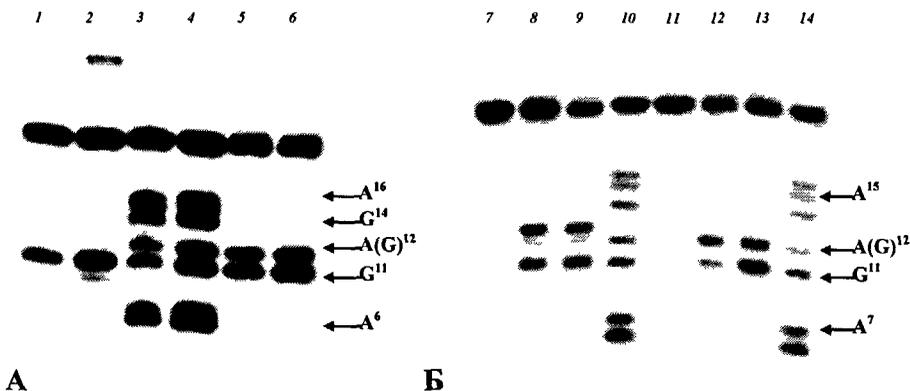


Рис. 1. Радиоавтограф геля, полученный после пиперидинового расщепления (1М пиперидин, 95 °С, 30 мин) продуктов фотомодификации 5'-[³²P]-меченых ДНК-мишеней **M1** и **M2** в комплементарных (А) и неполностью комплементарных (Б) комплексах, облученных в течение 300 мин светом (365-580 нм): **M1 + OL2-R - 1; M1 + OL1-BzA + OL2-R - 2; M2 + OL3-R - 5; M2 + OL1-BzA + OL3-R - 6; M1 - 7; M1 + OL3-R - 8; M1 + OL1-BzA + OL3-R - 9; M2 - 11; M2 + OL2-R - 12; M2 + OL1-BzA + OL2-R - 13; A+G-расщепление ДНК-мишеней M1 - 3, 10 и M2 - 4, 14** Продукты фотомодификации ДНК-мишени анализировали электрофорезом в 13% денатурирующем ПААГ

Была изучена фотомодификация мишени **M2** комплементарным ей олигонуклеотидным реагентом **OL3-R**. Полученные данные были сопоставлены с данными по модификации неполностью комплементарным реагентом **OL2-R** (рис. 2). Было найдено, что при фотомодификации мишени **M2** в комплементарных комплексах (**M2 + OL3-R**) и (**M2 + OL1-BzA + OL3-R**) начальная скорость и предельная степень модификации (кривые 3, 4) выше, чем в неполностью комплементарных комплексах (**M2 + OL2-R**) и (**M2 + OL1-BzA + OL3-R**) (кривые 1, 2, соответственно).

Сравнение количественных параметров фотомодификации двух мишеней олигонуклеотидными реагентами в полностью комплементарных комплексах (**M1 + OL2-R**); (**M1 + OL1-BzA + OL2-R**); (**M2 + OL3-R**) и (**M2 + OL1-BzA + OL3-R**) показывает, что предельная степень сенсibilизированной (рис. 2, кр. 4) и особенно прямой (рис. 2, кр. 3) фотомодификации мишени **M2** (75% и 72%) больше, чем мишени **M1** (68% и 41%, рис. 1, дор. 7, 12, соответственно). Эффективность фотомодификации возрастает в том случае, когда в предполагаемом месте модификации ДНК-мишени находятся два остатка G.

Полученные результаты, свидетельствуют о том, что выбор мишени с двумя остатками гуанозина в предполагаемом сайте модификации приводит к повышению эффективности модификации.

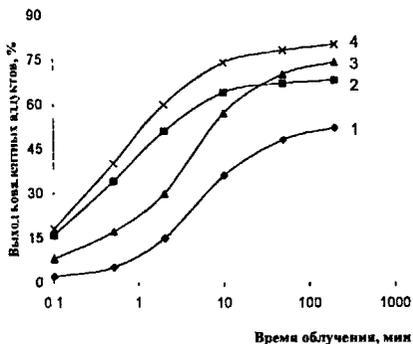


Рис. 2. Зависимость выхода ковалентных аддуктов при фотомодификации мишени **M2** олигонуклеотидными реагентами **OL2-R** (кривые 1 и 2) и **OL3-R** (кривые 3 и 4) от времени (полулогарифмические координаты). Прямая фотомодификация: кривые 1 и 3; фотомодификация, сенсibilизированная конъюгатом **OL1-BzA**: кривые 2 и 4. Концентрации компонентов: $[M2] = 0,1$ мкМ, $[OL1-BzA] = [OL2-R] = [OL3-R] = 50$ мкМ. Облучение видимым светом 400-440 нм. Продукты фотомодификации ДНК-мишени анализировали электрофорезом в 13% денатурирующем ПААГ, степень модификации определяли денситометрией радиоавтографа

(соответствующий радиоавтограф не представлен).

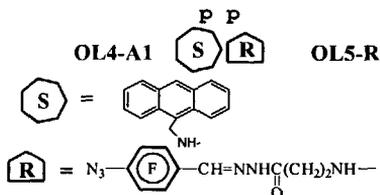
1.2. Сенсibilизированная фотомодификация ДНК-мишени **M3**

При фотомодификации одноцепочечной ДНК-мишени **M3** бинарной системой олигонуклеотидных реагентов было проверено предположение о том, что дальнейшее увеличение числа гуанозиновых остатков должно существенно повысить степень модификации. В качестве ДНК-мишени **M3** был использован 25-звенный олигодезоксирибонуклеотид, соответствующий фрагменту последовательности мРНК человеческого гена множественной лекарственной устойчивости и несущий в предполагаемом месте модификации тетрауклеотидную (pG)₄-последовательность. Фотомодификацию проводили с помощью гептануклеотидных

конъюгатов **OL4-A1** и **OL5-R**, несущих остатки антрацен-9-ил-метиламина и перфторарилазида **R**, соответственно.

СХЕМА 2

***PATGGATTCTTTGAAGG-GGACCGCATT M3**
AAC TTCC CCTGGCG



Было предложено использовать сенсibilизатор на основе антрацена, поскольку энергия его первого возбужденного состояния ($E_s = 73$ ккал/моль) сопоставима с энергией возбуждения ранее использованного сенсibilизатора *N*-(5-фтор-12-метилбензо[а]антрацен-7-илацетил)этилендиамин ($E_s = 72$ ккал/моль). Спектр поглощения антрацена сдвинут в длинноволновую область на 10 нм ($\lambda_{\text{макс}}$ 377 и 367 нм, соответственно) по сравнению со спектром

поглощения бензантрацена, что позволяет инициировать сенсibilизированную фотомодификацию ДНК светом с большей длиной волны.

Облучение видимым светом комплекса **M3 + OL4-A1 + OL5-R** приводило к образованию ковалентных аддуктов (рис. 3). Начальная скорость сенсibilизированной фотомодификации (основано на анализе денситограммы, полученной после обработки приведенного радиоавтографа (данные не представлены)) была примерно в 50 раз выше, чем прямой. Предельный выход ковалентных аддуктов фотомодификации был высоким: в дуплексе **M3 + OL5-R** он достигал 82-85% за 200 мин облучения (дор. 7), а в комплексе **M3 + OL4-A1 + OL5-R** - 98-99% за 10 мин облучения (дор. 11-13).

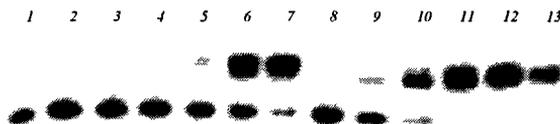


Рис. 3. Радиоавтограф геля, полученный после электрофоретического разделения продуктов прямой (2-7) и сенсibilизированной (8-13) фотомодификаций $5'$ - $[^{32}\text{P}]$ -меченой мишени **M3** при облучении светом диапазона 380-580 нм. Концентрации **[M3]** - 1 мкМ, **[OL4-A1]** и **[OL5-R]** - 50 мкМ, $T = 21^\circ\text{C}$. Время облучения, мин: дор. 2, 8 - 0.1; дор. 3, 9 - 0.5; дор. 4, 10 - 2; дор. 5, 11 - 10; дор. 6, 16 - 50; дор. 1 (мишень **M3**, облучение в отсутствие **OL4-A1** и **OL5-R**), 7, 13- 200. Продукты фотомодификации ДНК-мишени анализировали электрофорезом в 13% денатурирующем ПААГ.

Данные, полученные в результате расщепления модифицированных мишеней пиперидином (табл. 1), показывают, что основной точкой прямой фотомодификации в дуплексе **M3 + OL5-R** является остаток G^{16} , находящийся в одноцепочечной части комплекса. Следует отметить, что в обоих комплексах расщепление преимущественно происходит по остаткам G^{15} и G^{16} и в меньшей степени по остаткам G^{14} и G^{17} .

Таблица 1. Позиционная направленность прямой и сенсibiliзированной фотомодификаций ДНК-мишени **M3** после 200 мин облучения светом (365-580 нм) и обработки пиперидином.

Комплексы		M3 + OL5-R	M3 + OL4-A1 + OL5-R
Степень модификации после обработки пиперидином, %		76	92
Нерасщепившиеся аддукты, %		25	42
Продукты расщепления пиперидином по основаниям нуклеотидов:	G^{14}	3	6
	G^{15}	10	20
	G^{16}	36	20
	G^{17}	2	4

Из данных, полученных при фотомодификации трёх ДНК-мишеней, следует, что предельные степени прямой фотомодификации мишеней (**M1** - 41%, **M2** - 72% и **M3** - 85%) возрастают при увеличении количества остатков G в сайте модификации. Предельные степени сенсibiliзированной фотомодификации ДНК-мишеней - (68%, 75% и 99%, соответственно) - также возрастают при увеличении количества остатков G в сайте модификации. Во всех случаях степень сенсibiliзированной фотомодификации выше, чем прямой.

Таким образом, высокая эффективность сенсibiliзированной фотомодификации ДНК-мишени **M3** определяется наличием четырех остатков гуанозина в сайте модификации, G -специфичностью фотореагента и тем, что каждая молекула сенсibiliзатора способна инициировать модификацию до 10 молекул мишени (данные не приведены). Предлагаемая конструкция фотореакционноспособного центра может способствовать дополнительному увеличению специфичности сенсibiliзированной фотомодификации за счет того, что любая замена остатков гуанозина в мишени **M3** будет приводить не только к снижению стабильности неполностью элементарного комплекса, но и к снижению выхода модификации такой ДНК-мишени вследствие более низкой эффективности реакции перфторароматических азидов по другим нуклеотидным остаткам.

2. Влияние строения сенсibilизатора на скорость и эффективность сенсibilизированной фотомодификации ДНК

Ключевым моментом при разработке бинарных систем, активируемых видимым светом, является поиск химических соединений, способных выступить в качестве сенсibilизатора в данных условиях. Для реализации рациональных подходов к поиску таких соединений необходимо исследовать как химическое строение и спектрально-люминесцентные свойства сенсibilизатора влияют на скорость, эффективность и спектральную зависимость сенсibilизированной фотомодификации нуклеиновых кислот.

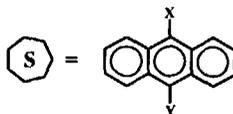
Далее представлены результаты исследования влияния различных заместителей в антраценовом остатке сенсibilизатора на скорость и эффективность сенсibilизированной фотомодификации ДНК-мишени с помощью бинарной системы олигонуклеотидных производных.

2.1. Влияние заместителей в антраценовом остатке

Было изучено влияние введения в 9 и(или) 10 положение антраценового ядра различных заместителей (аминометильной или аминопропионилгидразоновой групп; атома Cl) на эффективность сенсibilизированной фотомодификации.

В качестве мишени был использован синтетический 25-звенный дезоксирибоолигонуклеотид **M3**. Строение сенсibilизаторов представлено на схеме 3 (строение мишени **M3**, олигонуклеотидов **OL4** и **OL5** и фотореагента идентично структурам, представленным на схеме 2).

СХЕМА 3



конъюгат	X	Y	$\lambda_{\text{мкс}}$
OL4-A1	H-	-CH ₂ -NH-	388
OL4-A2	Cl-	-CH ₂ -NH-	403
OL4-A3	H-	-CH=NNHCO(CH ₂) ₂ NH-	392
OL4-A4	Cl-	-CH=NNHCO(CH ₂) ₂ NH-	404

Введение аминометильной группы в антраценовое ядро вызывает длинноволновый сдвиг максимума поглощения на 7 нм (**A1**), введение 3-аминопропионилгидразоновой группы - длинноволновый сдвиг максимума поглощения на 10 нм (**A3**). Хлорирование антрацена приводит к батохромному сдвигу на 8-11 нм (**A2** и **A4**). Наличие атома хлора и аминометильной группы приводит к увеличению интенсивности флуоресценции (**A2**), в то время как наличие гидразоно группы на два порядка снижает ее интенсивность (**A3** и **A4**). Стоксов сдвиг (разни-

ца между максимумом флуоресценции и максимумом поглощения) для аминотильных производных составляет 31-33 нм и для гидразонопроизводных - 77-78 нм. Эти данные свидетельствуют о том, что для аминотильных производных **A1**, **A2** безызлучательные потери энергии в фотовозбужденном состоянии меньше, чем для гидразонопроизводных **A3**, **A4**.

Методом гашения флуоресценции антрацена и его производных **A1-A4** перфторарилазидом **RH** (схема 3) были оценены значения эффективных констант переноса энергии ($K_{эфф}$). Полученные значения представлены в таблице 2. Видно, что значение констант падает при увеличении длины волны максимума флуоресценции (λ_n).

С целью оценки влияния заместителей в 9 и 10 положении остатка антрацена (схема 3: X и Y) на эффективность переноса энергии было изучено накопление ковалентных аддуктов в ходе сенсibilизированной и прямой фотомодификаций (рис 4). Присоединение производных антрацена (**A1-A4**) к олигонуклеотиду **OL4** приводило к bathochromному смещению максимума поглощения сенсibilизатора на 7-10 нм (схема 3). Поэтому облучение проводилось в том диапазоне длин волн (380-420 нм), в котором располагаются максимумы поглощения олигонуклеотидных конъюгатов **OL4-A1 - OL4-A4**.

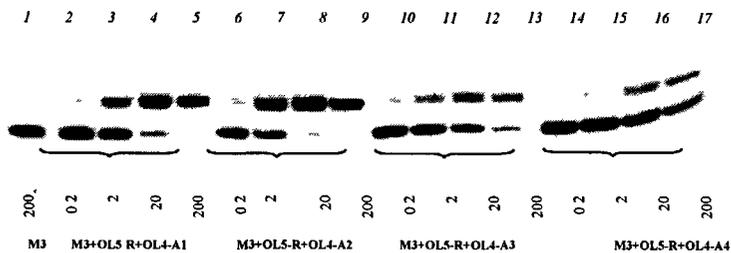


Рис. 4. Радиоавтограф геля, полученный после электрофоретического разделения продуктов сенсibilизированной (2-17) фотомодификации 5'-[P³²]-меченой мишени **M3** при облучении светом (380-420 нм). Концентрации: **M3** - 1 мкМ, фотореагент **OL5-R** и сенсibilизаторы **OL4-A1 - OL4-A4** - 50 мкМ; T = 25 °C. Комплексы 1- **M3**; 2-5 - **M3 + OL5-R + OL4-A1**; 6-9 - **M3 + OL5-R + OL4-A2**; 10-13 - **M3 + OL5-R + OL4-A3**; 14-17 - **M3 + OL5-R + OL4-A4**. Время облучения, мин: дор. 2, 6, 10, 14- 0.2.; дор. 3, 7, 11, 15- 2; дор. 4, 8, 12, 16- 20; дор. 1, 5, 9, 13, 17 - 200. Продукты фотомодификации ДНК-мишени анализировали электрофорезом в 13% денатурирующем ПААГ.

Можно констатировать, что предельная степень сенсibilизированной фотомодификации увеличивается в ряду сенсibilизаторов **OL4-A4 < OL4-A3 < OL4-A1 < OL4-A2**, достигая для последних двух 98-99% (рис. 4, дор. 6, 9). Возможно низкая эффективность сенсibilизации фотомодификации конъюгата **OL4-A4** обу-

словлена тем, что энергия возбужденного состояния этого соединения недостаточна для активации азидогруппы.

Следовательно, с учетом начальной скорости (определенной после денситометрической обработки представленного на рис. 4 радиоавтографа) и предельной степени фотомодификации при облучении в максимуме поглощения, наиболее перспективным сенсбилизатором является конъюгат 9-хлорантраценил-10-метиламина **OL4-A2**.

Несколько иная картина наблюдается при облучении видимым светом в диапазоне длин волн 420-580 нм (рис. 5), где небольшое поглощение наблюдается только для олигонуклеотидных производных 9-антраценальгидразона **OL4-A3** и **OL4-A4**. Начальная скорость накопления ковалентных аддуктов фотомодификации ДНК-мишени увеличивается следующим образом: прямая фотомодификация $< \text{OL4-A1} < \text{OL4-A2} < \text{OL4-A4} < \text{OL4-A3}$. Предельная степень модификации для фотореакции, сенсбилизированной олигонуклеотидным производным 9-антраценальгидразон-пропиониламина **OL4-A3** также выше, чем для остальных конъюгатов.

Еще более заметным становятся преимущества соединения **OL4-A3** как сенсбилизатора при облучении видимым светом с большей длиной волны. При облучении светом с длиной волны более 460 нм (данные не приведены) наблюдается только фотомодификация, сенсбилизированная олигонуклеотидным конъюгатом **OL4-A3**, в то время как ни прямая реакция, ни реакция, сенсбилизированная производными **OL4-A1** и **OL4-A2**, в этих условиях не протекают. По-видимому, это обусловлено тем, что введение гидразоно-группы в антраценовое ядро приводит к расширению полосы поглощения антраценового производного **A3**. Максимальная длина поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$) для этого соединения - 387 нм, при этом полоса поглощения простирается в видимую область, что позволяет сенсбилизировать фотомодификацию при облучении видимым светом с длиной волны >460 нм.

Таким образом, конъюгат **OL4-A3** позволяет высокоспецифично проводить сенсбилизированную фотомодификацию в условиях, когда в отсутствие этого сенсбилизатора фотореагент практически инертен.

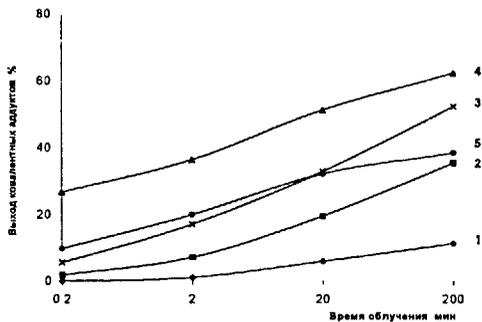


Рис 5. Зависимость выхода ковалентных аддуктов ДНК-мишени **M3** с олигонуклеотидным производным **OL5-R** при прямой (кр. 1) и сенсбилизированной олигонуклеотидными производными **OL4-A1** (кр. 2), **OL4-A2** (кр. 3), **OL4-A3** (кр. 4), и **OL4-A4** (кр. 5) фотомодификаций от времени облучения (полулогарифмические координаты). Условия облучения: 420-580 нм. Продукты фотомодификации

ДНК-мишени анализировали электрофорезом в 13% денатурирующем ПААГ, степень модификации определяли денситометрией радиоавтографа (соответствующий радиоавтограф не представлен).

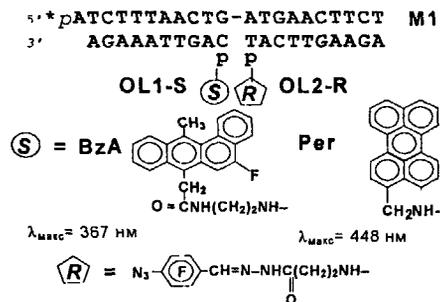
2.2. Использование перилена в качестве сенсibilизатора

В диссертационной работе Гайдамакова С. А. было описано применение в качестве сенсibilизатора 3-периленаметиламина. Была отмечена высокая эффективность сенсibilизированной этим соединением реакции фотомодификации. В данной части работы предлагается детальное исследование механизмов сенсibilизации производным олигонуклеотида **OL1-Per** модификации ДНК-мишени **M1** фотореагентом **OL2-R**.

2.2.1. Гашение флуоресценции олигонуклеотидного производного перилена в двуцепочечных комплексах

В качестве мишени был использован синтетический 21-звенный дезоксирибозо-олигонуклеотид **M1**. Строение ДНК-мишени, олигонуклеотидных конъюгатов, сенсibilизаторов и фотореагента **N**-(4-азидотетрафторбензилиден)-**N'**-(3-аминопропил)гидразина (**R**) представлено на схеме 4.

СХЕМА 4



Спектр поглощения конъюгата **OL1-Per** сдвинут батохромно относительно поглощения исходного перилена (λ_{max} 433 нм) на 15 нм, следовательно, энергия его возбужденного состояния ниже, чем энергия $E_{0,0}$ перилена на 2-3 ккал/моль. В свою очередь энергия возбуждения $E_{0,0}$ перилена ниже, чем энергия $E_{0,0}$ ароматических азидов. Следовательно, необходимо было убедиться в способности остатка перилена в составе конъюгата **OL1-Per** сенсibilизировать фотодиссоциацию азидов. Возможность переноса энергии электронного возбуждения с сенсibilизатора **OL1-Per** на олигонуклеотидный реагент **OL2-R** была показана методом гашения флуоресценции остатка перилена при образовании комплементарных дуплексов (рис. 6, кривые 3-5). В качестве сравнения приведены аналогичные данные для сенсibilизатора **OL1-BzA**

(Рис. 6, кривые 1, 2), реализующего механизм синглет-синглетного переноса энергии фотовозбужденя. Для каждого соединения использовались максимальные длины волн возбуждения и эмиссии.

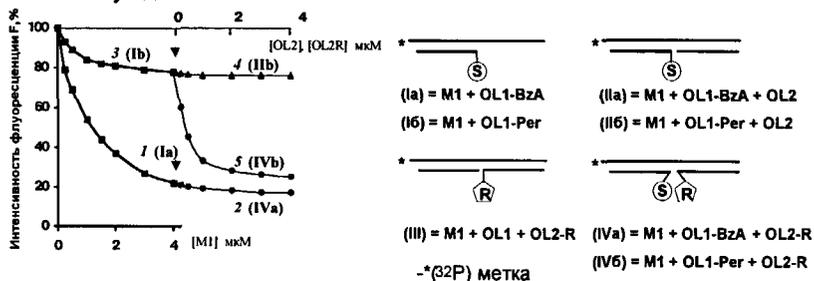


Рис. 6. Гашение флуоресценции (F, %) олигонуклеотидных производных 1,2-бензантрацена (OL1-BzA) (1-2) и перилена (OL1-Per) (3-5) при последовательном образовании комплексов (I), (II) и (IV). Концентрации конъюгатов OL1-BzA - 1 и OL1-Per - 0.5 мкМ в 2 мМ Na₂HPO₄, pH 7.1, 200 мМ NaCl: 1-2 - $\lambda_{\text{возб}} = 335-345$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 376 \pm 5$ нм; 3 - образование дуплекса (Ib), 4 - комплекса (IIb), 5 - комплекса (IVb). Стрелкой (\downarrow) отмечены точки добавления в реакционную смесь олигонуклеотидного конъюгата OL2-R или олигонуклеотида OL2.

При связывании олигонуклеотидного производного N-(5-фтор-12-метилбензо[а]антрацен-7-илацетил)этилендиамин (OL1-BzA) с комплементарной последовательностью M1 наблюдается пятикратное гашение его флуоресценции (кривая 1). Добавление к дуплексу (Ia) второго олигонуклеотида, несущего фотореагент, приводит к незначительному дальнейшему гашению флуоресценции (кривая 2). Эти данные подтверждают, что лишь небольшая часть энергии возбуждения остатка бензантрацена переносится на фотореагент.

В случае конъюгата OL1-Per наблюдается другая картина. При образовании дуплекса с ДНК-мишенью интенсивность флуоресценции гасится всего на 20% (кривая 3), добавление второго олигонуклеотида без фотореагента практически не приводит к дальнейшему гашению флуоресценции сенсibilизатора (кривая 4). Добавление к дуплексу (Ib) олигонуклеотидного конъюгата OL2-R приводит к дополнительному трехкратному гашению флуоресценции (кривая 5), что свидетельствует об эффективном переносе энергии с остатка перилена на фотореагент в комплементарном комплексе (IVb).

2.2.2. Сенсibilизированная фотомодификация ДНК-мишени

Для изучения того, каким образом различия в эффективности гашения флуоресценции остатков бензантрацена и перилена отражаются на эффективности модификации нуклеиновых кислот была проведена прямая и сенсibilизированная фотомодификация мишени М1 при облучении видимым светом 440-580 нм в составе дуплексов (IVб), (III), (IVа) и (IVб). Очевидно (рис. 7), что фотомодификация ДНК фотореагентом OL2-R в комплексе (IVб), сенсibilизированная олигонуклеотидным производным перилена OL1-Per заканчивается после 1 мин облучения (дорожка 5). Выход ковалентных аддуктов шивки фотореагента с ДНК-мишенью достигает 70% и не меняется при дальнейшем облучении (дорожки 6 и 7). Ни производное OL1-Per (дорожка 9), ни производное фотореагента OL2-R (дорожка 10) по отдельности не вызывают фотомодификации после 100 мин облучения. Сенсibilизированной производным бензантрацена OL1-BzA фотомодификации ДНК в комплексе (IVа) (дорожки 2-4) в данных условиях не наблюдается.

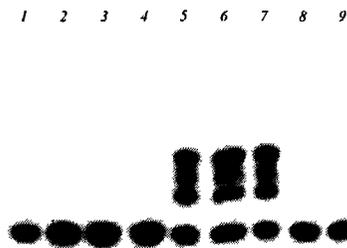


Рис. 7. Радиоавтограф геля, полученный при электрофоретическом анализе продуктов прямой (9) и сенсibilизированной (2-7) фотомодификации 5^{32}P -меченой мишени М1, инициированной облучением видимым светом (440-580 нм). Концентрации конъюгатов OL1-BzA, OL1-Per, OL2-R и олигонуклеотидов OL1, OL2 - 50 мкМ, олигонуклеотида М1 - 1 мкМ: 1 - 5^{32}P -меченая мишень М1, $\tau_{\text{обл}}$ 100 мин; 2-4 - дуплекс с участием OL1-BzA (IVа), $\tau_{\text{обл}}$ 1, 10, 100 мин соответственно; 5-7 - комплекс с участием OL1-Per (IVб), $\tau_{\text{обл}}$ 1, 10, 100 мин

соответственно; 8 - дуплекс (IVб), $\tau_{\text{обл}}$ 100 мин; 9 - комплекс (III), $\tau_{\text{обл}}$ 100 мин. Продукты фотомодификации ДНК-мишени анализировали электрофорезом в 13% денатурирующем ПААГ.

На рис. 8 представлены данные по прямой (кривая 1) и сенсibilизированной олигонуклеотидным производным бензантрацена (кривая 2) и перилена (кривая 3) фотомодификации ДНК-мишени при облучении видимым светом в более широком диапазоне экспозиций (H). Приведенные данные демонстрируют, что 10%-ный выход продуктов шивки реагента с мишенью в случае сенсibilизированной периленом фотомодификации достигается при $\lg H = 0.3$ (кривая 3), сенсibilизированной бензантраценом - при $\lg H = 4.7$ (кривая 2) и при $\lg H = 5.7$ в случае прямой фотомодификации (кривая 1). Следовательно, скорость сенсibilизированной производным перилена OL1-Per фотомодификации ДНК в комплексе IVб примерно в

300000 раз больше, а сенсibilизированной производным бензантрацена **OL1-BzA** - примерно в 10 раз больше, чем прямой фотореакции в комплексе III.

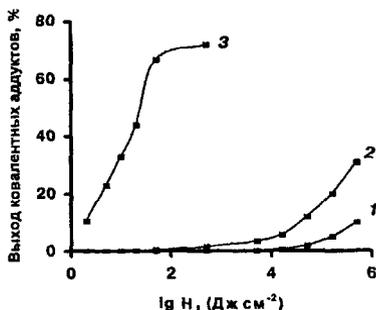


Рис. 8. Выход продуктов сшивки ДНК-мишени М1 с олигонуклеотидным производным **OL2-R** при прямой (1) и сенсibilизированной олигонуклеотидным производным 1,2-бензантрацена (2) или перилена (3) фотомодификации в зависимости от логарифма экспозиции (H , Дж см⁻²). Условия облучения: 1,2 - 420-580 нм, 3 440-580 нм. Продукты фотомодификации ДНК-мишени анализировали электрофорезом в 13% денатурирующем ПААГ, степень модификации определяли денситометрией радиоавтографа (соответствующий радиоавтограф не представлен).

Из полученных результатов следует, что высокоэффективную сенсibilизированную фотомодификацию ДНК в комплексе **IV6** можно проводить специфично, поскольку в условиях, необходимых для модификации, производные **OL1-Per** и **OL2-R** по отдельности не активны.

Вследствие высокой эффективности сенсibilизированной фотомодификации было решено более подробно изучить механизм фотосенсibilизации фотореагента периленом.

2.2.3. Механизм сенсibilизации фотореагента основан на переносе электрона

Перенос электрона из основного состояния азида на возбужденное состояние сенсibilизатора считается наиболее вероятным механизмом синглет-синглетной сенсibilизации ароматических азидов периленом, хотя перенос электрона не исключает также синглет-синглетного переноса энергии (Leyshon and Reiser, 1972). Оба механизма могут реализовываться параллельно, но вклад переноса электрона увеличивается при росте диэлектрической проницаемости растворителя, которая способствует разделению зарядов. Константа скорости гашения флуоресценции перилена ароматическими азидами увеличивается при росте диэлектрической проницаемости растворителя и достигает диффузионно контролируемого предела в метаноле при $\epsilon = 32$ (Leyshon and Reiser, 1972). Примерно такое же значение диэлектрической проницаемости наблюдается в бороздках двухцепочечной ДНК (Varawkar et al., 1995).

Было предположено, что обнаруженное значительное увеличение скорости сенсibilизированной производным перилена **OL1-Per** фотомодификации ДНК-

мишени (по сравнению со скоростью реакции сенсibilизированной бензантраценовым производным) может быть обусловлено переносом электрона. Для проверки предположения был изучен фотолиз перилена и смесей перилена - перфторнафталид и перилена-перфторнафтойная кислота. Перфторнафтойная кислота и 2-азидоперфтор-7-нафтойная кислота были выбраны вследствие того, что их спектры поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$ 340 и 345 нм, соответственно) не перекрываются со спектром поглощения перилена ($\lambda_{\text{макс}}$ 251 и 433 нм). При облучении в течение 1 ч видимым светом (440-580 нм) фотолиза ни перилена, ни азиды, ни смеси перилена-перфторнафтойная кислота ни в кислородных, ни в бескислородных условиях не наблюдается. При облучении в течение 1 ч видимым светом (440-580 нм) смеси перилена - 2-азидоперфтор-7-нафтойная кислота в присутствии кислорода, одновременно происходит фотопревращение как азиды, так и перилена с $\tau_{1/2}$ 8 мин. По данным ВЭЖХ перилена практически целиком превращается в соединение, не флуоресцирующее и обладающее характерным для 1,12-периленахинона спектром поглощения ($\lambda_{\text{макс}}$ 334 и 444 нм). Можно предположить, что идет фотоокисление перилена кислородом воздуха. При барботировании перед облучением смеси перилена - 2-азидоперфтор-7-нафтойная кислота аргоном скорость фотопревращения перилена несколько снижается, но процесс не прекращается, видимо, из-за неполного удаления кислорода и высокой скорости окисления.

При облучении видимым светом комплекса **IV6** в кислородных условиях наблюдаются аналогичные изменения - полное гашение флуоресценции периленового остатка и углубление цвета реакционной смеси (данные не представлены). Полученные результаты подтверждают, что при сенсibilизированной фотомодификации ДНК бинарной системой олигонуклеотидных конъюгатов (**OL1-Per + OL2-R**) одновременно с фотопрививкой реагента к мишени происходит фотоокисление сенсibilизатора (**S**), вероятнее всего за счет фотоиндуцированного переноса электрона.

Перенос электрона с фотовозбужденного сенсibilизатора на азид (Рис. 9а) теоретически возможен, но в нашем случае маловероятен. Подобный перенос электрона должен приводить к появлению в спектре поглощения смеси новой полосы переноса заряда (ПЗ). Экспериментально такой полосы обнаружено не было (данные не представлены).

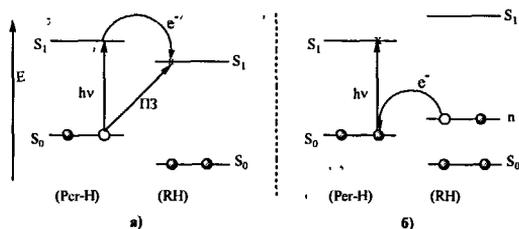


Рис. 9. Расположение электронных уровней при фотоиндуцированном переносе электрона (а) - с сенсibilизатора (**S**) на фотореагент (**R**) и (б) - с фотореагента на сенсibilизатор.

Наблюдаемая сенсibilизированная фотомодификация ДНК в комплексе IV6 обусловлена вероятнее всего переносом электрона с неподеленной электронной пары (n) атома азота в азидогруппе фотореагента на фотовозбужденный перилен (рис. 9б). В результате этого из перилена образуется анион-радикал, который быстро окисляется кислородом воздуха до соответствующего 1,12-периленхинона. Одновременно с этим из перфторарилазида образуется катион-радикал, который в ходе темновых превращений вызывает фотомодификацию ДНК, характерную для синглетного нитрена.

Из представленных результатов можно сделать вывод, что при сенсibilизированной производным перилена фотомодификации ДНК происходит инактивация сенсibilизатора. Наиболее вероятным механизмом инактивации является перенос электрона и последующее фотоокисление остатка перилена.

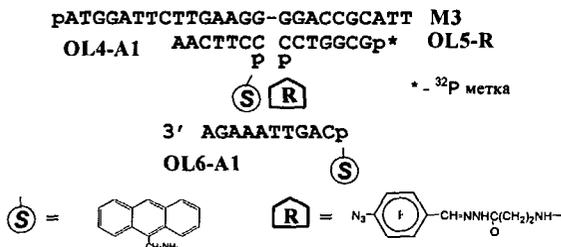
3. Сенсibilизированная фотомодификация олигонуклеотид-связывающих белков, представленных на поверхности эукариотических клеток

Существенным препятствием для развития антисмысловых технологий и практической генотерапии является низкая проницаемость клеточных мембран для олигонуклеотидов и полимерных нуклеиновых кислот. Можно полагать, что подход к решению проблемы создания методов эффективной доставки нуклеиновых кислот в клетки организма может быть разработан на основании использования естественных механизмов транспорта нуклеиновых кислот в живых системах.

Структура фотоактивируемого реакционноспособного дуплекса практически не отличается от фрагмента двуцепочечной ДНК и может служить удобным инструментом для исследования взаимодействия двуцепочечной ДНК с белками, обладающими сродством к нуклеиновым кислотам. Целью настоящей главы являлась демонстрация возможности применения бинарных систем олигонуклеотидных конъюгатов в качестве инструмента для исследования процессов взаимодействия дцДНК с белками *in vivo* на примере сенсibilизированной фотомодификации олигонуклеотид-связывающих белков, представленных на поверхности культивируемых эукариотических клеток.

Для исследования взаимодействия дцДНК с олигонуклеотид-связывающими белками с помощью бинарных систем олигонуклеотидных производных была использована модельная система, представленная на схеме 6. Олигонуклеотид **OL4-A1**, несущий остаток сенсibilизатора 9-аминометилантрацена и 5'-[32 P]-меченый олигонуклеотид **OL5-R**, несущий остаток фотореагента N-(*n*-азидотетрафторбензальгидразоно)-N'-пропиониламина, комплементарны соседним участкам одноцепочечного олигонуклеотида-матрицы **M3**. В контрольных экспериментах олигонуклеотидный конъюгат **OL6-A1**, несущий остаток 9-аминометилантрацена, был использован вместо производного **OL4-A1**.

СХЕМА 6



Для того, чтобы в условиях фотомодификации исключить возможность транспорта олигонуклеотидного производного в клетки и обеспечить взаимодействие исследуемого олигонуклеотид-связывающего белка с реакционноспособным производным олигонуклеотида непосредственно на клеточной поверхности, инкубацию клеток в присутствии производных олигонуклеотидов и облучение проводили при 4 °С. Температура плавления комплексов, образуемых производными олигонуклеотидов OL4-A1 и OL5-R с олигонуклеотидом M3, составляет 28 °С и 19 °С соответственно, т.е. в данных условиях большая часть олигонуклеотидных производных OL4-A1 и OL5-R должна находиться в составе комплементарного комплекса с олигонуклеотидом M3.

Для выявления поверхностных клеточных белков, способных взаимодействовать с одноцепочечным фотореагентом OL5-R и фотореакционноспособным дуплексом *in vivo*, нами была осуществлена фотомодификация эукариотических клеток линии СПЭВ. Реакцию фотомодификации инициировали облучением фильтрованным светом 365-580 нм. Показано, что при фотомодификации клеточного монослоя олигонуклеотидным производным OL5-R (рис. 10, дор. 1) и предформированным двуцепочечным комплексом (рис. 10, дор. 2 и 3) наблюдается появление одного и того же продукта модификации. Его молекулярная масса, оцениваемая по подвижности в ПААГ относительно стандартных маркеров молекулярной массы, составляет ~79 кДа, что соответствует массе описанного ранее олигонуклеотид-связывающего белка, участвующего в связывании и транспорте олигонуклеотидов в ядро. В контрольных экспериментах, при темновой инкубации клеток в присутствии одноцепочечного фотореагента (рис. 10, дор. 4) и предформированного двуцепочечного комплекса, состоявшего из олигонуклеотидов OL4-A1, OL5-R и M3 (рис. 10, дор. 5), продуктов модификации клеточных белков не наблюдалось. Можно предположить, что олигонуклеотид-связывающий белок (или группа белков с одинаковой подвижностью), ответственный за связывание и транспорт олигонуклеотидов, участвует и в связывании дцДНК.

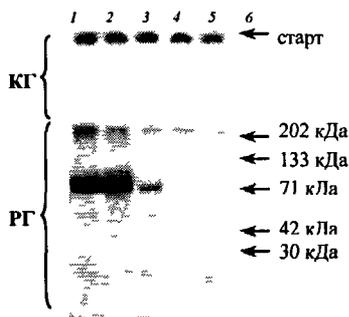


Рис. 10. Электрофоретическое разделение продуктов модификации поверхностных белков клеток СПЭВ фотоактивируемым производным олигонуклеотида. Клеточный монослой инкубировали при 4 °С в течение 5 мин в среде ДМЕМ, содержащей: (1, 4, 6) - 0,5 мкМ фотореагента [³²P]-OL5-R; (2) - 0,5 мкМ фотореагента и 0,5 мкМ комплементарного олигонуклеотида-матрицы М3; (3, 5) - 0,5 мкМ фотореагента, 0,5 мкМ олигонуклеотида OL4-A1 и 0,5 мкМ комплементарного им олигонуклеотида-матрицы М3. Затем клетки инкубировали в темноте в течение 30 мин при 4 °С (4, 5) или облучали фильтрованным светом ($\lambda = 365-580$ нм) в тех же условиях (1, 2, 3 и 6). На дорожке 6 нанесена аликвота среды, в которой проводилась фотомодификация клеток. Продукты фотомодификации анализировали электрофорезом в 12% SDS-ПААГ КГ – концентрирующий гель; РГ – разделяющий гель.

Для доказательства связывания олигонуклеотид-связывающего белка с дуплексом были использованы мягкие условия облучения (400-580 нм). В контрольном эксперименте вместо производного олигонуклеотида OL4-A1 использовали некомплементарный олигонуклеотид - матрице конъюгат OL6-A1 (схема 6), также несущий 9-аминометилантраценовый остаток.

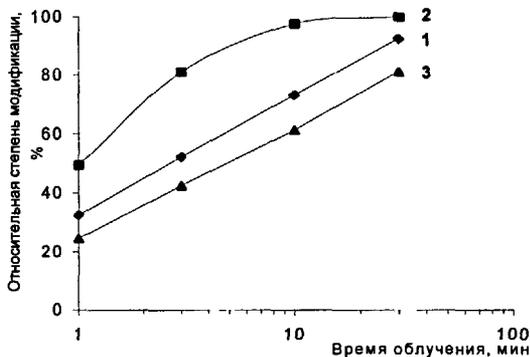


Рис. 11. Зависимость относительной степени модификации и начальных скоростей прямой и сенсibilизированной фотомодификаций поверхностных белков клеток линии СПЭВ от времени облучения (полулогарифмические координаты). Клеточный монослой инкубировали при 4 °С в течение 5 мин, в присутствии: 1 – 0,5 мкМ фотореагента [³²P]-OL5-R и 0,5 мкМ комплементарного олигонуклеотида-матрицы М3; 2 – 0,5 мкМ фотореагента, 0,5 мкМ олигонуклеотида OL4-A1 и 0,5 мкМ комплементарного им олигонуклеотида-матрицы М3; 3 - 0,5 мкМ фотореагента, 0,5

мкМ комплементарного олигонуклеотида-матрицы МЗ и 0,5 мкМ олигонуклеотида ОL6-А1. Клетки облучали видимым светом ($\lambda = 400-580$ нм). Продукты фотомодификации клеточных белков анализировали электрофорезом в 12% SDS-ПААГ, степень модификации определяли денситометрией радиоавтографа (соответствующий радиоавтограф не представлен).

В этих условиях облучения эффективность сенсibilизированной модификации была выше, чем эффективность прямой фотомодификации (сравни рис. 11, кривые 2 и 1). При облучении клеточного монослоя в присутствии конъюгата ОL4-А1 начальная скорость накопления продуктов фотомодификации примерно в 3-4 раза больше чем в случае прямой модификации (рис. 11, кривые 2 и 1).

Отсутствие эффекта сенсibilизации при использовании производного олигонуклеотида ОL6-А1 (рис. 11, кривая 3) свидетельствует о том, что в данном случае группировки сенсibilизатора и фотореагента располагаются на расстоянии, не позволяющем осуществить перенос энергии и инициировать реакцию фотомодификации. Таким образом, можно утверждать, что сенсibilизированная фотомодификация олигонуклеотид-связывающего белка происходит только после связывания с ним полностью собранного двуцепочечного фотореакционноспособного комплекса ОL4-А1 + ОL5-R + МЗ.

Нами продемонстрирована возможность применения бинарных систем олигонуклеотидных конъюгатов в качестве инструмента для исследования взаимодействия двуцепочечных нуклеиновых кислот с белками *in vivo*. Показано, что олигонуклеотид-связывающие белки, представленные на поверхности эукариотических клеток, обладают способностью взаимодействовать также и с двуцепочечными нуклеиновыми кислотами.

ВЫВОДЫ

1. Предложены и охарактеризованы новые бинарные системы фотоактивируемых олигонуклеотидных реагентов с использованием сенсibilизаторов 3-периленметиламина и 3-аминопропионилгидразон-9-антраценаля и фотореагента N-(4-азидотетрафторбензильден)-N'-(3-аминопропил)гидразина. Фотохимические свойства комбинаций предложенных сенсibilизаторов и фотореагента позволяют осуществить инициированную видимым светом (более 460 нм) высокоселективную сайт-специфическую фотомодификацию комплементарной ДНК-мишени и обеспечивают инертность компонентов в отсутствие целевого биополимера.
2. Показано, что в отличие от ранее использованных сенсibilизаторов, нерасходуемых в ходе реакции фотомодификации целевой нуклеиновой кислоты, сенсibilизированная 3-периленметиламином фотомодификация сопровождается инактивацией сенсibilизатора, вероятно, вследствие фотоокисления периле-

- нового остатка за счет фотоиндуцированного переноса электрона с азидогруппы реагента на электронно-возбужденный сенсibilизатор.
3. Продемонстрировано, что использование олигонуклеотидного производного 9-хлор-10-аминометилантрацена для сенсibilизации фотомодификации ДНК-мишени в сочетании с выбором целевой последовательности, содержащей в предполагаемом сайте модификации нуклеотидную последовательность (pG)₄, позволяет осуществить количественную модификацию ДНК.
 4. С использованием бинарной системы олигонуклеотидных конъюгатов исследовано взаимодействие поверхностных белков эукариотических клеток с экстраклеточными нуклеиновыми кислотами. В условиях *in vivo* продемонстрировано, что данные белки, связывающие олигонуклеотиды, участвуют и в связывании двуцепочечной ДНК

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Тенетова Е.Д., Шишкин Г.В., Власов В.В. "Бинарная система олигонуклеотидных производных перилена и *n*-азидотетрафтор-бензальгидраза для сенсibilизированной к видимому свету фотомодификации ДНК." // Докл. РАН. 1998. Т. 358. С. 403-407.
2. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Тенетова Е.Д., Шишкин Г.В., Власов В.В. "Сенсibilизированная фотомодификация ДНК бинарными системами олигонуклеотидных конъюгатов. IV. Фотоиндуцированный перенос электрона" // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 31-39.
3. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Иванова Т.М., Власов В.В. "Сенсibilизированная фотомодификация ДНК бинарными системами олигонуклеотидных конъюгатов. V. Влияние строения ДНК-мишени. Количественная фотомодификация" // Биоорган. химия. 1999. Т. 25. С. 137-146.
4. Добриков М.И., Гайнутдинов Т.И., Иванова Т.М., Власов В.В. "Сенсibilизированная фотомодификация ДНК бинарными системами олигонуклеотидных конъюгатов. VI. Влияние заместителей." // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 617-622.
5. Dobrikov M.I., Gaimutdinov T.I., Vlassov V.V. "Visible light activatable binary system of oligonucleotide conjugates for nucleic acid modification. // Nucleosides@Nucleotides. 1999. V.18. P. 1517-1518.
6. Dobrikov M.I., Bichenkova E.V., Douglas K.T., Gaimutdinov T.I., Vlassov V.V. Structure of Photoreactive Binary System of Oligonucleotide Conjugates Assembled on the Target Nucleotide Sequence. // J. Biomol. Struct. Dyn.. 1999. V. 17. P. 213-221.
7. Гайнутдинов Т. И., Шестова О. Е., Якубов Л. А., Добриков М. И., Власов В. В. "Сенсibilизированная фотомодификация олигонуклеотидсвязывающих белков, представленных на поверхности эукариотических клеток" // Изв. Акад. наук. Сер. Хим.. 2002. Т. 7. С. 1108-1112.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

14974.

2003-A

14974