



УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИНИКОВА

на правах рукописи

АСТАХОВА Ирина Владимировна

**НУКЛЕОЗИДЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПЕРИЛЕНОМ
И (ФЕНИЛЭТИНИЛ)ПИРЕНАМИ ПО 2'-ПОЛОЖЕНИЮ:
СИНТЕЗ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА В СОСТАВЕ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ**

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

09 АПР 2009

Москва 2009

Работа выполнена в Лаборатории химии нуклеиновых кислот Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научный руководитель кандидат химических наук
В.А. Коршун

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Т.С. Орецкая

доктор химических наук
В.К. Потапов

Ведущая организация **Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН**

Защита состоится *22 апреля* 2009 г. в 10.00 на заседании
Специализированного совета Д 002.019.01 при Институте биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу:
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан *20 марта* 2009 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета
доктор физ.-мат. наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы бурно развивается химия модифицированных нуклеиновых кислот (НК), что в значительной степени вызвано расширением области их практического применения. Они все чаще используются в молекулярной и физико-химической биологии и смежных областях знания. Для исследования взаимодействий различных биомолекул, в том числе нуклеиновых кислот, люминесцентные красители практически вытеснили радиоизотопные метки. Предел детекции флуоресцентных меток на современном оборудовании весьма мал: иногда удается регистрировать излучение единичной молекулы. Основными преимуществами флуоресцентных меток являются их неограниченная стабильность, возможность автоматизации процедур модификации и детекции и особенно их пригодность для определения в режиме реального времени.

Одним из самых интересных и перспективных типов люминесцентных меток для НК являются полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), характеризующиеся стабильностью в условиях автоматизированного олигонуклеотидного синтеза, высокими молярными коэффициентами поглощения и квантовыми выходами эмиссии и, в результате, высокой яркостью флуоресценции. Кроме того, в водных растворах флуоресценция ПАУ в составе НК сильно зависит от ближайшего пространственного окружения, так как полициклические ароматические углеводороды способны к нековалентным взаимодействиям с НК. Например, ПАУ способны интеркалировать между парами оснований или связываться в бороздки двойной спирали ДНК. Их участие в стэкинг-взаимодействиях подтверждается увеличением стабильности дуплексов и изменением спектров флуоресценции. ПАУ могут образовывать эксиплексы (сокращ. excited complex – возбужденный комплекс) с гетероциклическими основаниями НК. Помимо этого при сближении двух остатков ПАУ на расстояние $\sim 3,5$ Å происходит образование эксимера (сокращ. excited dimer – возбужденный димер). Интеркаляция в двойную спираль ДНК, образование эксимеров и эксиплексов вносят существенные изменения в спектры флуоресценции конъюгатов ПАУ с нуклеиновыми кислотами, что делает ПАУ ценным инструментом для изучения изменений пространственной структуры НК в ходе гибридизации с образованием дуплексов и триплексов, а также при взаимодействии с белками, пептидами и смешанными биополимерами.

Среди ПАУ, использующихся для детекции взаимодействий НК, лидирующую позицию, бесспорно, занимает пирен – тетрациклический ароматический углеводород, характеризующийся большим временем жизни возбужденного состояния (до нескольких сотен наносекунд в зависимости от окружения и полярности растворителя). Другим ПАУ с интересными спектральными свойствами является перилен – пентациклический ароматический углеводород, обладающий высоким квантовым выходом флуоресценции, фотостабильностью и длинноволновым сдвигом спектров поглощения и флуоресценции по сравнению с пиреном.

Последнее свойство является особенно интересным, так как оно открывает возможность использования биомолекул, меченных периленом, для экспериментов *in vivo*.

Цель работы. Диссертация посвящена совершенствованию флуоресцентных меток – производных пирена (синтезированы различные фенилэтинилпиреновые красители) и исследованию флуоресцентных свойств периленовой метки в ДНК. Синтезированы три класса флуоресцентных реагентов для амидофосфитного автоматического твердофазного синтеза на основе *арабиноуридин-2'*-карбаматов, уридина и LNA(*locked nucleic acid*)-нуклеозидов, содержащих различные (фенилэтинил)пирены и перилен, присоединенные по положению 2 сахара (2'-положению нуклеозида). Эти реагенты позволяют получить олигонуклеотиды, при гибридизации которых с НК, красители с улучшенными по сравнению с пиреном спектральными характеристиками располагаются в большой или малой бороздке дуплексов. Целью работы был синтез олигонуклеотидных зондов с помощью данных реагентов и изучение спектральных свойств полученных конъюгатов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Разработаны методы получения новых реагентов для флуоресцентной модификации олигонуклеотидов, позволяющих вводить краситель в заданное положение; их эффективность продемонстрирована в синтезе модельных флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов, а также олигомеров, содержащих в своем составе фрагмент, комплементарный участку TAR РНК, связывающейся с Tat-белком вируса иммунодефицита человека, и комплементарных гену 23S РНК *Helicobacter pylori*. Показано, что флуорофоры нековалентно взаимодействуют с НК и друг с другом, что может быть использовано для структурного исследования биополимеров. Полосы эмиссии новых флуоресцентных меток, bathochromно смещенные относительно излучения незамещенного пирена, позволяют использовать длины волн возбуждения, не вызывающие автофлуоресценцию живых клеток, и, таким образом, полученные метки потенциально являются перспективными зондами для исследований нуклеиновых кислот *in vitro*, в культурах клеток и *in vivo*.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на международных молодежных научных школах «Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School» (University of Southern Denmark, Odense, Denmark, 2005), «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2006), «Træf for Organisk Kemi Studerende (TOKS) IX» (Copenhagen's Lyngby, Denmark, 2007); международной конференции "Физико-химическая биология» (Новосибирск, 2006); международном симпозиуме «International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (ASMC 07)» (Санкт-Петербург, 2007); конференции Американского химического общества «234th ACS National Meeting» (Boston, MA, United States, 2007); международном симпозиуме «XIV Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components» (Český Krumlov, Czech Republic, 2008); международном симпозиуме «Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids

Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry» (Kyoto, Japan, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 статей в реферируемых журналах.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (137 ссылок). Работа изложена на 215 страницах, содержит 46 рисунков, 30 схем и 32 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

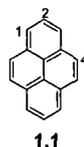
В рамках диссертации синтезированы три класса реагентов для модификации олигонуклеотидов: на основе *арабино*уридин-2'-карбамата, рибоуридина и LNA- нуклеозидов, содержащих остатки (фенилэтинил)пиренов (PEPy) и перилена. Флуоресцентные красители присоединяли по 2'-положению нуклеозидов, причем посредством 2'-*арабино*-карбаматного линкера флуорофоры направляли в большую бороздку дуплексов, а в случае 2'-*O*-метильного линкера и 2'-амино-LNA – в малую.

Синтезированные нами флуоресцентные красители проявили интересные спектральные и фотофизические свойства, существенно улучшенные по сравнению с пиреном (батохромный сдвиг максимумов поглощения и флуоресценции, высокие квантовые выходы флуоресценции при сохранении способности к образованию эксимеров). Таким образом, полученные флуоресцентные метки представляются перспективными красителями для гомогенной детекции гибридизации нуклеиновых кислот.

1. Синтез 1-, 2- и 4-(фенилэтинил)пиреновых 2'-карбаматных производных *арабино*уридина и амидофосфитных реагентов на их основе; спектральные свойства модифицированных олигонуклеотидов

Удобным методом введения заместителей по 2'-положению нуклеозидов является получение 2'-карбаматов. Карбаматные производные *арабино*уридина позволяют направлять метки в большую бороздку дуплексов НК, устойчивы в условиях автоматического твердофазного синтеза и аммиачного деблокирования. Ранее была обнаружена способность пиренилметильных остатков, присоединенных к *арабино*уридину через карбаматную группу, к образованию эксимеров в большой бороздке ДНК-дуплексов.

В данной работе мы продолжаем исследование пиренового флуорофора в составе 2'-*арабино*уридинового карбамата. Как известно, для пирена **1.1** возможно три монозамещенных изомера – с заместителями в положениях 1, 2 или 4. Поскольку 1-производные пирена наиболее доступны, первыми были синтезированы именно аналоги описанного ранее 1-фенилэтинилпирена (1-PEPy). Однако представляло интерес получить также производные 2- и 4-(фенилэтинил)пиренов и сравнить их спектральные и фотофизические свойства в составе нуклеозидов и олигонуклеотидов. Более того, для



того чтобы изучить влияние пространственного расположения красителей в составе олигонуклеотидов на их спектральные свойства, нами были синтезированы карбаматные производные *арабиноуридина*, содержащие 1-, 2- и 4-PEPy, в которых помимо положения функционализации пирена варьировался также тип замещения в фенильном кольце карбамата (*мета*- и *пара*-PEPy).

Ацетиленовые производные пирена (2- и 4-этинилпирены) труднодоступны, поэтому сначала нами был разработан улучшенный метод синтеза 2- и 4-этинилпиренов из дешевого пирена с целью их дальнейшего использования для получения производных 2- и 4-PEPy, а также для модификации нуклеозидов.

1.1 Синтез 2- и 4-этинилпиренов

Метод синтеза 2- и 4-этинилпиренов показан на схеме 1. Гидрирование предварительно очищенного пирена в этилацетате при повышенных температуре и давлении привело к смеси соединений **1.2** и **1.7** (~3.5:1). Мы обнаружили, что продукты гидрирования могут быть легко разделены хроматографией на оксиде алюминия. В расчете на исходный пирен выход 4,5,9,10-тетрагидропирена (**1.2**) составил 76%, а 1,2,3,6,7,8-гексагидропирена (**1.7**) – 20%. Ацилирование тетрагидропирена **1.2** уксусным ангидридом в присутствии хлорида алюминия привело к ацетилпроизводному **1.3**, ароматизация которого с помощью DDQ дает 2-ацетилпирен (**1.4**). Для превращения ацетильной группы кетона **1.4** в этинильную была использована реакция Вильсмейера–Хаака–Арнольда, дающая хлоракролеин **1.5**, который фрагментировали по Бодендорфу в ацетилен **1.6** (66% из **1.2**). Последовательность реакций **1.7** → **1.11** была известна, но нам удалось увеличить общий выход в этой цепочке превращений с 18 до 54%.

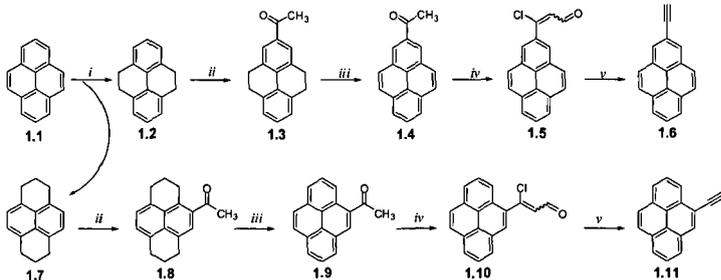


Схема 1. Реагенты и условия: (i) H_2 (160 атм), 10% Pd/C, EtOAc, 60°C, 24 ч; (ii) Ac_2O , $AlCl_3$, CH_2Cl_2 , 5°C; (iii) DDQ, толуол, 110°C, 1 ч; (iv) DMF, $POCl_3$; (v) KOH, диоксан, вода.

1.2 Получение арабинонуклеозидов, меченных 1-, 2- и 4-(фенилэтинил)пиренами через 2'-карбаматную связь

Арабиноуридин **1.14** является коммерчески доступным соединением, однако он довольно дорог, поэтому его синтезировали по литературной методике из уридина **1.12** (схема 2). Для защиты 3'- и 5'-гидроксильных нуклеозид **1.14** вводили в реакцию с 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксаном (реагентом Маркевича). Полученный защищенный нуклеозид **1.15**

обрабатывали 1,1'-карбонилдимидазолом (мочевина Штаба), после чего имидазолид **1.16** вводили во взаимодействие с 3- и 4-нодбензиламинами. Арилнодидная группировка полученных карбаматов **1.17** и **1.18** использовалась для сочетания с 1-, 2- и 4-этинилпиренами по Соногашире в присутствии тетракис(трифенилфосфин)палладия (0), иодида меди (I) и триэтиламина в DMF. Таким образом, нами были получены защищенные нуклеозиды **1.19–1.24**, содержащие 1-, 2- и 4-PEPy в *meta*- и *para*-положениях фенильного кольца карбамата. После снятия защиты Маркевича тригидрофторидом триэтиламония, 4,4'-диметокситриэтирования и фосфитилирования были получены амидофосфитные реагенты **1.37–1.42**.

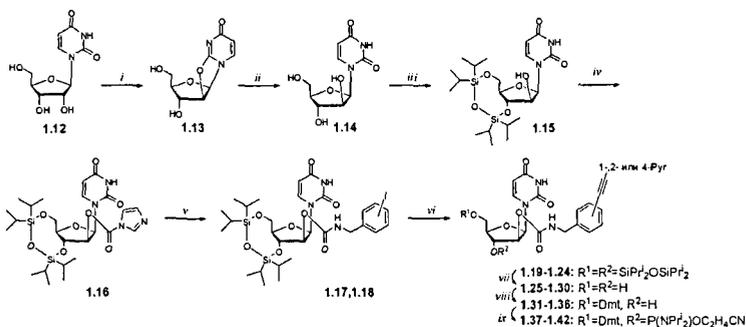


Схема 2. Реагенты и условия: (i) $(PhO)_2CO$, Na_2CO_3 , DMF; (ii) NaOH, EtOH; (iii) Im_2CO , CH_2Cl_2 ; (v) *m*-(*n*-нодбензиламин, THF-MeCN; (vi) 1-, 2- или 4-этинилпирен, $Pd(PPh_3)_4$, CuI, NEt₃, DMF; (vii) Et₃N-3HF, THF; (viii) DmtCl, Py; (ix) $(Pr'_2N)_2POC_2H_4CN$, тетразолид днизопропиламмония, DCM.

Таблица 1. Олигонуклеотидные производные, полученные в данном исследовании.

Немодифицированные олигонуклеотиды							
#	Последовательность, 5'→3'						
1t	СТСССAGGCTCAAAT						
2a	АТТТGAGCCTGGGAG						
Модифицированные олигонуклеотиды							
Модифицированный мономер							
#	Последовательность, 5'→3'						
		1-PEPy		2-PEPy		4-PEPy	
		A	B	C	D	E	F
3	СТСССAGGCTCAAAT						
4	CTСССAGGCTCAAAT						
5	CTСССAGGCTCAAAT						
6	СТСССAGGCTCAAATCTGG						
7	АТТТGAGCCTGGGAG						
8	АТТТGAGCCTGGGAG						
9	АТТТGAGCCTGGGAG						
10	CCAGATTTGAGCCTGGGAG						
11	CCAGATTTGAGCCTGGGAG						
12	CCAGATTTGAGCCTGGGAG						

Амидофосфитные реагенты **1.37–1.42** использовались в автоматизированном твердофазном синтезе модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих в своем составе фрагмент, комплементарный участку 22–36 TAR (*trans*-activation responsive) РНК, связывающийся с Tat-белком вируса иммунодефицита человека (табл. 1). Эффективность конденсации с участием модифицирующих реагентов **1.37–1.42** составила 97–99%. Олигонуклеотиды были деблокированы по стандартной методике и выделены в денатурирующем полиакриламидном геле; структура синтезированных олигонуклеотидов доказана MALDI-TOF масс-спектрометрией.

1.3 Флуоресцентные свойства модифицированных дуплексов

Хорошо известно, что некоторые флуоресцентные красители при сближении и возбуждении способны образовывать эксимеры и эксиплексы, эмиссионные свойства которых резко отличаются от свойств исходных флуорофоров. При конструировании зондов особое значение имеют расстояние между флуорофорами и их взаимное расположение в третичной структуре конъюгатов. Так, безызлучательный перенос энергии наиболее эффективен при расстояниях между донором и акцептором в несколько десятков ангстрем, тогда как эксимеры образуются между флуорофорами, удаленными друг от друга на несколько ангстрем, причем плоскости флуорофоров параллельны и перекрываются. Поэтому мы уделили особое внимание изучению флуоресцентных свойств хромофоров не только в составе одноцепочечных олигонуклеотидов, но и в составе дуплексов с комплементарными матрицами.

Была изучена возможность образования межцепочечных эксимеров остатками 1- и 4-РЕРу, расположенными по принципу «+2», «+3» и «+4 зиппер»¹. В качестве критерия образования эксимера нами использовано отношение интенсивности эксимерной флуоресценции к интенсивности флуоресценции мономера I_{500}/I_{405} (табл. 2). Видно, что интенсивность эксимерной флуоресценции всегда уменьшается в порядке «+2 зиппер» > «+3 зиппер» > «+4 зиппер». В составе «+2 зиппера» более слабый эксимер образован двумя остатками *meta*-1-РЕРу (серия А), тогда как наибольшая интенсивность эксимерной флуоресценции отмечена для двух *para*-4-РЕРу (серия F). Дуплексы, модифицированные остатками 4-РЕРу, проявили более интенсивные эксимерные сигналы по отношению к флуоресценции мономера, чем дуплексы, содержащие 1-РЕРу. В то же время для 4-РЕРу интенсивность флуоресценции заметно ниже, чем 1-РЕРу (в данном случае ~ в 4 раза) (рис. 1). Для олигонуклеотидов и дуплексов, содержащих 2-РЕРу, эксимерная эмиссия не наблюдалась даже при сближенном расположении красителей.

Далее мы изучили все возможные комбинации *meta*- и *para*-красителей для 1- и 4-РЕРу-модифицированных серий олигонуклеотидов. Так конфигурация **В:А** оказалась более предпочтительной для эффективного образования эксимера 1-РЕРу, чем **А:В**. В отличие от пирен-

¹ “зиппер” (от англ. zipper – застежка-молния) – термин, введенный в обиход проф. Еспером Венгелем (Центр Нуклеиновых Кислот, Университет Южной Дании) для обозначения расположения меток в дуплексе, модифицированном в двух комплементарных цепях.

содержащего карбамата, эксимерная эмиссия детектирована не только для «+2» и «+3 зипперов», но и для «+4» аналога, что может объясняться тем, что длина остатка 1-PEPу примерно на 1 нм превышает длину молекулы пирена. Однако образование эксимера не наблюдалось для комбинированных дуплексов серий E:F и F:E.

Для подтверждения образования эксимера PEPу в большой бороздке дуплексов В-типа, нами были построены соответствующие молекулярные модели (рис. 2). Как видно, димеры PEPу располагаются не только в большой бороздке, но и частично экспонированы в среду растворителя.

Таблица 2. Флуоресцентные свойства дуплексов конституций «+2», «+3» и «+4 зиппер», содержащих *meta*- и *para*-1- и 4-PEPу.

Дуплекс	зип-пер	Схематическое изображение	Флуоресценция, I_{500}/I_{405}	Дуплекс	зип-пер	Схематическое изображение	Флуоресценция, I_{500}/I_{405}
3A:7A	+4			3E:7E	+4		
3A:8A	+3			3E:8E	+3		
3A:9A	+2			3E:9E	+2		
			0,1 0,2 0,3 0,4 0,5				0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5
3B:7B	+4			3F:7F	+4		
3B:8B	+3			3F:8F	+3		
3B:9B	+2			3F:9F	+2		
			0,1 0,2 0,3 0,4 0,5				0 0,2 0,4 0,6

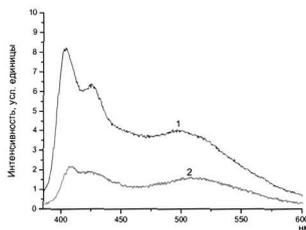
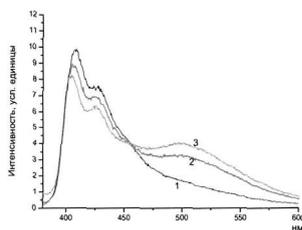


Рис. 1. Слева: спектры флуоресценции дуплексов 3B:7B (1), 3B:8B (2) и 3B:9B (3) в гибридационном буфере, концентрация каждого дуплекса 10^{-7} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 360 нм; справа: спектры флуоресценции дуплексов 3F:7F (1) и 3F:9F (2) в гибридационном буфере, концентрация каждого дуплекса 10^{-7} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 345 нм. 3: 5'-CTCCAGGCUCAAT-3', 7: 5'-AUTTGAGCCTGGGAG-3', 8: 5'-ATUTGAGCCTGGGAG-3', 9: 5'-ATTUGAGCCTGGGAG-3' (U = B,F).



Рис. 2. Молекулярные модели дуплексов 3B:9A (слева) и 3B:9B (справа). Остатки 1-PEPу показаны зеленым (*meta*-) и желтым (*para*-1-PEPу).



2. Синтез 1-(фенилэтилнил)пиреновых 2'-O-производных уридина и амидофосфитных реагентов на их основе; спектральные свойства модифицированных олигонуклеотидов

2.1 Синтез 2'-O-[3(4)-(пирен-1-илэтилнил)бензил]уридинов и введение их в состав синтетических олигонуклеотидов

Получение модифицированных олигонуклеотидов, флуоресценция которых высоко чувствительна к гибридизации с комплементарной последовательностью, является объектом интенсивных исследований, поскольку такие олигонуклеотидные зонды представляют собой удобный инструмент для гомогенной детекции НК. Способность двух сближенных молекул пирена к образованию эксимера является удобным свойством для детекции гибридизации. Однако коротковолновое поглощение незамещенного пирена и низкие квантовые выходы флуоресценции в составе НК являются препятствием для использования пирена в экспериментах в клеточных культурах и *in vivo*.

Принимая во внимание улучшенные спектральные и фотофизические свойства 1-PEPy по сравнению с пиреном (более высокий квантовый выход флуоресценции, длинноволновый сдвиг максимумов поглощения и эмиссии), нами были синтезированы и введены в олигонуклеотиды производные уридина, модифицированные остатками *meta*- и *para*-1-PEPy по 2'-положению через метиленовый линкер, направляющий остатки пиренов в малую бороздку дуплексов.

Путь синтеза целевых нуклеозидных производных во многом схож с методом, использованным для синтеза PEPy-меченных 2'-*арабино*-карбаматов (схема 3).

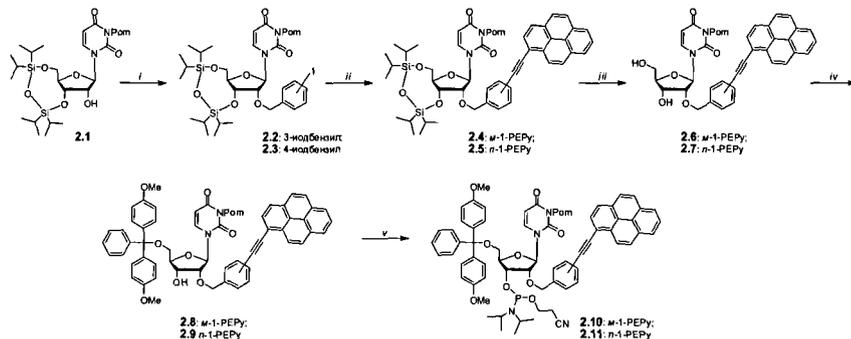


Схема 3. Реагенты и условия: (i) 3(4)-иодбензилбромид, THF-McCN; (ii) 1-этилнилпирен, Pd(PPh₃)₄, CuI, NEt₃, DMF; (iii) Et₃N·3HF, THF; (iv) DmtCl, Py; (v) (Pr₂N)₂POC₂H₄CN, тетразолид диизопропиламмония, DCM. Pom = пивалоил-оксиметил.

Амидофосфитные реагенты 2.10–2.11 использовались в автоматизированном твердофазном синтезе дважды меченных флуоресцентных дезоксирибо- и 2'-O-Ме-рибо-олигонуклеотидов, комплементарных участку гена 23S РНК *Helicobacter pylori* (табл. 3). Синтезированные зонды содержат как две одинаковые метки, так и комбинированные *meta*-*para*-1-PEPy-красители, расположенные рядом друг с другом. Были также синтезированы 20-звенные ДНК- и РНК-мишени дикого и мутантного типов, содержащие некомплементарные нуклеотиды (мисматчи) в положениях 2143 и 2144 (серии DT и RT). Ввиду того, что мутации A2144G, A2143G и A2143C

приводят к устойчивости *Helicobacter pylori* к антибиотику кларитромицину, представлялась интересной задача их детекции при помощи полученных модифицированных зондов. Эффективность конденсации с участием модифицирующих реагентов составила 97–99%. Олигонуклеотиды были деблокированы по стандартной методике и выделены при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ; их структура подтверждена MALDI-TOF масс-спектрами.

Таблица 3. Олигонуклеотиды, полученные в данном исследовании.^a

Обозначение		Последовательность, 5'→3'
Фрагмент гена 23S РНК <i>H. pylori</i> (колирующая последовательность; дикий тип)		GAAAATTCTCTCTACCCGCGGCAAGCGGAAAGACCCCGTGGACCTTTAC
Модельные ДНК мишени	DT-WT	GCAAGACGGAAAGACCCCGT
	DT-A43G	GCAAGACGGCAAGACCCCGT
	DT-A43C	GCAAGACGGCAAGACCCCGT
	DT-A44G	GCAAGACGGASAGACCCCGT
Модельные РНК мишени	RT-WT	r(GCAAGACGGAAAGACCCCGU)
	RT-A43G	r(GCAAGACGGCAAGACCCCGU)
	RT-A43C	r(GCAAGACGGCAAGACCCCGU)
	RT-A44G	r(GCAAGACGGASAGACCCCGU)
9,10-ДНК зонды	DP-U ⁹ U ¹⁰	ACGGGTCTUUCGGTCTTGC
	DP-U ⁹ U ¹⁰	ACGGGTCTUUCGGTCTTGC
	DP-U ⁹ U ¹⁰	ACGGGTCTUUCGGTCTTGC
	DP-U ⁹ U ¹⁰	ACGGGTCTUUCGGTCTTGC
10,11-ДНК зонды	DP-U ¹⁰ U ¹¹	ACGGGTCTUUCGGTCTTGC
	DP-U ¹⁰ U ¹¹	ACGGGTCTUUCGGTCTTGC
	DP-U ¹⁰ U ¹¹	ACGGGTCTUUCGGTCTTGC
	DP-U ¹⁰ U ¹¹	ACGGGTCTUUCGGTCTTGC
2'-O-Ме- 9,10-РНК зонды	MP-U ⁹ U ¹⁰	2'-OMe-r(ACGGGGUUCUUCGGUUCUUCG)
	MP-U ⁹ U ¹⁰	2'-OMe-r(ACGGGGUUCUUCGGUUCUUCG)
	MP-U ⁹ U ¹⁰	2'-OMe-r(ACGGGGUUCUUCGGUUCUUCG)
	MP-U ⁹ U ¹⁰	2'-OMe-r(ACGGGGUUCUUCGGUUCUUCG)
2'-O-Ме- 10,11-РНК зонды	MP-U ¹⁰ U ¹¹	2'-OMe-r(ACGGGGUUCUUCGGUUCUUCG)
	MP-U ¹⁰ U ¹¹	2'-OMe-r(ACGGGGUUCUUCGGUUCUUCG)
	MP-U ¹⁰ U ¹¹	2'-OMe-r(ACGGGGUUCUUCGGUUCUUCG)
	MP-U ¹⁰ U ¹¹	2'-OMe-r(ACGGGGUUCUUCGGUUCUUCG)

^a DT = ДНК мишень; RT = РНК мишень; DP = ДНК зонд; MP = РНК зонд; A = нуклеотид, комплементарный модифицированному уридину зонда; B = мутантный нуклеотид мишени (B = C, G); U = 2'-O-[3-(пирен-1-илэтинил)бензил]уридин (*meta*-1-PEPy-модификация); U = 2'-O-[4-(пирен-1-илэтинил)бензил]уридин (*para*-1-PEPy-модификация).

2.2. Спектральные свойства конъюгатов, содержащих *meta*- и *para*-1-(фенилэтинил)пирены, присоединенные к уридину через 2'-O-метиленовый линкер

Нами изучена чувствительность флуоресценции меченых ДНК- и 2'-O-Ме-РНК-зондов к гибридизации с мишенями дикого и мутантного типов. Так одноцепочечные зонды серии DP, содержащие модификации в положениях 9 и 10, проявили более интенсивную флуоресценцию, чем 10,11-меченые аналоги; для 9,10- и 10,11-модифицированных олигонуклеотидов отчетливо видны мономерная и эксимерная полосы эмиссии (спектры не приведены). При гибридизации DP-зондов с комплементарными и мутантными ДНК-мишенями наблюдаются существенные

изменения величины соотношения интенсивностей эмиссии (I_{500}/I_{405}) – так $DP-U^9U^{10}$, $DP-U^9U^{10}$ и $DP-U^{10}U^{11}$ представляются эффективными для детекции **DT-A44G**; $DP-U^{10}U^{11}$ и $DP-U^{10}U^{11}$ позволяют детектировать **DT-A43C** (рис. 3). В свою очередь, РНК-зонды $MP-U^{10}U^{11}$ и $MP-U^{10}U^{11}$ выявляют мисматчи в **DT-A44G** и **DT-A44G(C)** (гистограммы не приведены).

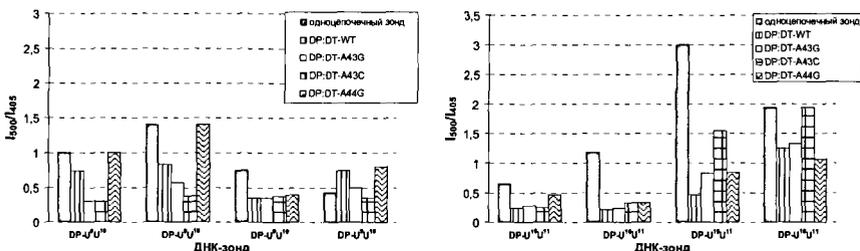


Рис. 3. Гистограмма величин I_{500}/I_{405} для однопочечных ДНК-зондов и их дуплексов с комплементарной и мутантными ДНК.

Гибридизация зондов серий **DP** с РНК не оказывает заметного влияния на флуоресценцию пары красителей. В то же время нечувствительными к образованию дуплексов с РНК оказались все 2'-*O*-Me-РНК-зонды, содержащие пары красителей в положениях 9 и 10, а также 10,11-меченые аналоги, содержащие два *meta*- или два *para*-1-PEPy. Интересное влияние гибридизации с РНК на флуоресцентные свойства отмечено только для **MP**-зондов, содержащих комбинацию *meta*-*para*-1-PEPy в положениях 10 и 11 (рис. 4). Так флуоресценция $MP-U^{10}U^{11}$ при 500 нм снижается в ~2 раза при образовании дуплекса с **RT-WT**, тогда как при наличии мисматчей в РНК-мишени интенсивность эксимерной эмиссии возрастает ~ в 4 раза. В случае зонда $MP-U^{10}U^{11}$ с обратным расположением красителей наблюдался противоположный эффект гибридизации на интенсивность эксимерной эмиссии: образование комплекса $MP-U^{10}U^{11}$ с **RT-WT** приводило к снижению интенсивности флуоресценции на ~40%, а в присутствии мисматчей она дополнительно снижалась в ~6 раз.

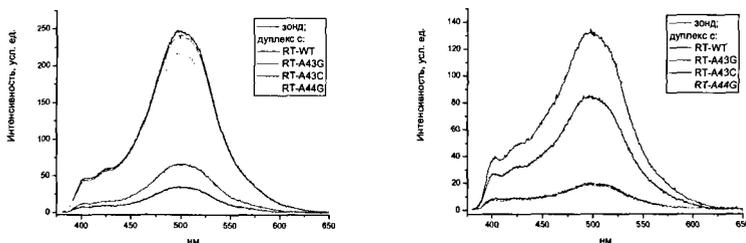


Рис. 4. Спектры флуоресценции олигонуклеотидов $MP-U^9U^{10}$ (слева) и $MP-U^{10}U^{11}$ (справа) и их дуплексов с комплементарной РНК. Спектры зарегистрированы в гибридизационном буфере, концентрация каждого олигонуклеотида 2×10^{-7} М, λ_{exc} 360 нм.

Таким образом, $MP-U^{10}U^{11}$ и $MP-U^{10}U^{11}$ позволяют детектировать наличие некомплементарных нуклеотидов в РНК-мишени, причем примечательным является то, что

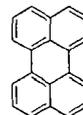
потенциально полезные флуоресцентные свойства отмечены только для комбинированных *meta*-*para*-1-PEPy-зондов, тогда как олигонуклеотиды, содержащие две одинаковые метки, оказались нечувствительными к гибридизации с РНК. Следует также отметить, что 2'-*O*-Me-РНК устойчива к действию нуклеаз, что потенциально позволяет использовать полученные зонды серии МР в экспериментах в культуре клеток и *in vivo*.

3. Синтез 2'-*N*-модифицированных красителями 2'-амино-LNA

3.1. 2'-*N*-(Перилен-3-ил)метил- и 2'-*N*-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA-нуклеозиды в составе модифицированных олигонуклеотидов

3.1.1. Синтез амидофосфитных реагентов

В последние годы флуоресцентно меченные олигонуклеотиды находят все более широкое применение для диагностики и исследований НК. Среди огромного разнообразия имеющихся флуорофоров полициклический ароматический углеводород перилен (3.1) представляется особенно интересным красителем для мечения биомолекул, так как он обладает высоким квантовым выходом флуоресценции, длинноволновой флуоресценцией по сравнению с пиреном и фотостабильностью.



3.1

Помимо введения флуоресцентных красителей, химическая модификация олигонуклеотидов также позволяет увеличить их аффинность по отношению к комплементарным ДНК и РНК. Эти свойства присущи конформационно-блокированным нуклеиновым кислотам

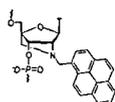
(LNA, 3.2; 2'-амино-LNA, 3.3; функционализированные LNA, 3.4–3.5), что стимулирует обширные исследования LNA-содержащих зондов как инструментов для диагностики и терапии, а также в качестве строительных блоков для наноструктур на основе НК.



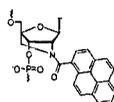
LNA
3.2



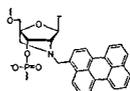
2'-амино-LNA
3.3



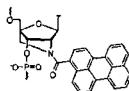
2'-*N*-(перилен-1-ил)метил-2'-амино-LNA
Мономер Z
3.4



2'-*N*-(перилен-1-ил)карбонил-2'-амино-LNA
3.5



2'-*N*-(перилен-3-ил)метил-2'-амино-LNA
Мономер X
3.6



2'-*N*-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA
Мономер Y
3.7

Недавно установлено, что олигонуклеотиды, меченные несколькими остатками 2'-*N*-(перилен-1-ил)карбонил-2'-амино-LNA, являются эффективными инструментами для гомогенной детекции гибридизации. Однако короткие длины волн поглощения и флуоресценции пирена являются препятствием для использования этих зондов в экспериментах *in vivo* по причине собственной флуоресценции клеток.

Нами осуществлены синтез и введение в олигонуклеотиды новых флуоресцентных нуклеозидов – 2'-*N*-(перилен-3-ил)метил- и 2'-*N*-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA (3.6 и 3.7,

соответственно). Синтез модифицированных амидофосфитных реагентов приведен на схеме 4. Исходный нуклеозид **3.8** вводили в реакцию восстановительного аминирования с перилен-3-карбальдегидом или ацилирования 3-периленкарбоновой кислотой. Полученные нуклеозиды **3.9** и **3.10** превращали в амидофосфиты **3.11** и **3.12** по стандартным методикам.

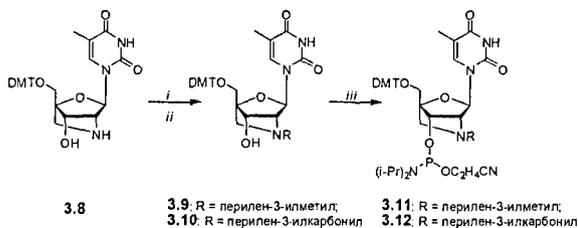


Схема 4. Реагенты и условия: (i) 3-формилперилен, NaBH(OAc)₃, 1,2-дихлорэтан; (ii) 3-периленкарбоновая кислота, HBTU, EtN(i-Pr)₂, DMF; (iii) ClP(NPr₂)OC₂H₄CN, DIPEA, DCM (**3.11**) или (Pr₂N)₂POC₂H₄CN, тетразолид диизопропиламмония, DCM (**3.12**).

Амидофосфитные реагенты **3.11** и **3.12** использовали в твердофазном олигонуклеотидном синтезе 9-звенных модифицированных олигомеров (табл. 4). Для изучения пирен-периленовой FRET пары также получены 22-звенные олигонуклеотиды, модифицированные 2'-N-(перилен-3-ил)метил- и описанным ранее 2'-N-(пирен-1-ил)метил-2'-амино-LNA в различных положениях вдоль цепи (табл. 6). Синтез олигонуклеотидов проводили по стандартным протоколам, за исключением модифицированных мономеров, для которых применяли процедуру двойной конденсации вручную (2×30 мин), используя гидрохлорид пиридина в качестве активатора. Эффективность конденсации с участием модифицирующих реагентов составила 95–99%. Олигонуклеотиды были деблокированы по стандартной методике и выделены при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ. Структура синтезированных олигонуклеотидов подтверждена MALDI-TOF масс-спектрами.

3.1.2. Влияние 2'-N-(перилен-3-ил)метил- и 2'-N-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA-нуклеозидов на стабильность дуплексов

Мы изучили термическую стабильность 9-звенных дуплексов, содержащих перилен-модифицированные LNA в одной цепи (табл. 4). Обе модификации заметно стабилизируют ДНК:ДНК и ДНК:РНК дуплексы, причем этот эффект становится еще более значительным для дважды меченных конъюгатов, содержащих метки, разделенные одной парой оснований. При этом стабильность дуплексов, содержащих перилен-3-карбонильную модификацию, заметно превышает таковую для перилен-3-метильного аналога.

Таблица 4. Термическая стабильность немодифицированных дуплексов и дуплексов, содержащих периленкарбонил-LNA.^a

#	Последовательность, 5'→3'	Дуплекс с комплементарной	
		ДНК	РНК
		T _m (ΔT _m /мод)/°C	T _m (ΔT _m /мод)/°C
1m	GTG ATA TGC	28.0	26.0
2m	GCA TAT CAC	28.0	24.5
3m	TTT ATA TAT CA ^{M₆C^L} G	31.5	29.5
4m	TT ^L T ATA TAT CA ^{M₆C^L} G	35.5	34.0
1X	GTG AXA TGC	31.0 (+3.0)	34.0 (+8.0)
2X	GCA XAT CAC	29.5 (+1.5)	31.5 (+7.0)
3X	GCA TAX CAC	28.5 (+1.5)	28.0 (+3.5)
4X	GTG AXA XGC	35.0 (+3.5)	37.5 (+5.8)
5X	GCA XAX CAC	33.0 (+2.5)	36.5 (+6.0)
1Y	GTG AYA TGC	31.0 (+3.0)	32.5 (+6.5)
2Y	GCA YAT CAC	35.0 (+7.0)	32.0 (+7.5)
3Y	GCA TAY CAC	34.5 (+6.0)	31.0 (+6.5)
4Y	GTG AYA YGC	43.5 (+7.8)	57.0 (+15.5)
5Y	GCA YAY CAC	42.0 (+7.0)	38.0 (+6.8)
6Y	GTG YYT TGC	32.5 (+0.5)	37.5 (+4.0)
7Y	GYG AYA YGC	43.0 (+5.0)	44.0 (+6.0)
8Y	GYG YTY TGC	38.5 (+2.3)	46.0 (+5.5)
9Y	TTY AYA YAY CA ^{M₆C^L} G	37.5 (+0.5)	42.0 (+2.0)
10Y	TT ^L T AYA YAY CA ^{M₆C^L} G	42.5 (+2.3)	47.0 (+4.3)

^a X = 2'-N-(перилен-3-ил)метил-2'-амино-LNA; Y = 2'-N-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA; T^L и M⁶C^L = тимин-1-ил- и 5-метилцитозин-1-ил-LNA, соответственно.

Затем была изучена селективность Уотсон-Криковского паро-образования для периленкарбонил-меченного олигонуклеотида 7Y по отношению к ДНК и РНК, содержащим некомплемментарные нуклеотиды в центральных положениях 4–6 (табл. 5). Как видно, присутствие мисматча в ДНК- и РНК-мишенях заметно снижает стабильность дуплексов, причем наибольший дестабилизирующий эффект наблюдается для мисматчей, расположенных напротив немодифицированных нуклеотидов, но не LNA-мономера в положении 5.

Таблица 5. Термическая стабильность модифицированных дуплексов, содержащих мутации в комплементарных ДНК и РНК.

7Y: мишень	T _m °C								
	B:	ДНК-мишень				РНК-мишень			
		A	C	G	T	A	C	G	U
5' - GYG AYA YGC									
3' - CAC TBT ACG	43.0	23.0	28.5	29.5	44.0	25.5	<10	24.0	
5' - GYG AYA YGC									
3' - CAC VAT ACG	25.5	29.0	32.5	43.0	30.5	29.0	30.5	44.0	
5' - GYG AYA YGC									
3' - CAC TAB ACG	<10	<10	28.5	43.0	36.5	28.0	30.0	44.0	

^a Температуры плавления дуплексов 7Y с комплементарными олигонуклеотидами: 28.0 °C и 26.0 °C для ДНК:ДНК и ДНК:РНК, соответственно.

3.1.3. Свойства конъюгатов, содержащих 2'-N-(перилен-3-ил)метил-2'-амино-LNA в качестве акцептора энергии для 2'-N-(перилен-1-ил)метил-2'-амино-LNA

Детекция гибридизации нуклеиновых кислот посредством измерения резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) является широко распространенным методом. Наиболее

популярными красителями для FRET являются ксантеновые флуорофоры – флуоресцеины и родамины. Эти красители часто присоединяют к НК посредством подвижных линкеров, что затрудняет интерпретацию измерений FRET, а кроме того эмиссия флуоресцеина зависит от pH раствора.

Ранее предложено использовать пирен и перилен в качестве донора и акцептора FRET для исследований НК. Показано, что эффективность переноса энергии для этой пары достигает ~100% при близком расположении меток.

В данной работе мы продолжили исследование FRET-пары пирен-перилен для детекции гибридизации НК. Так нами исследована эффективность переноса энергии FRET для 22-звенных дуплексов, содержащих остатки 2'-N-(перилен-3-ил)метил- (X) и 2'-N-(пирен-1-ил)метил-2'-амино-LNA (Z) в комплементарных цепях (отдельные примеры приведены в табл. 6). Мы предположили, что короткий амидный линкер снизит подвижность флуорофоров в составе дуплексов и таким образом позволит четко установить, каким образом расстояние между красителями влияет на эффективность переноса энергии.

Следует отметить, что введение пары модифицированных мономеров X и Z оказывало незначительное влияние на термическую стабильность дуплексов по сравнению с немодифицированным аналогом **5m:6m** (таблица 6, $\Delta T_m = +0.5...+1.5^\circ\text{C}$). Исключением является лишь дуплекс **2Z:7X** ($T_m = 59.5^\circ\text{C}$, $\Delta T_m = +5^\circ\text{C}$). Такой эффект, по-видимому, вызван контактным взаимодействием между остатками пирена и перилена, приводящим также к образованию эксиплекса (спектр не приведен). Кривые плавления модифицированных комплексов являются монофазовыми, сигмоидальными; их вид не отличается от вида кривых плавления немодифицированных дуплексов.

В спектрах флуоресценции одноцепочечных олигонуклеотидов **1Z–6Z** и их дуплексов с немодифицированной комплементарной ДНК наблюдается типичная мономерная эмиссия пирена с $\lambda_{\text{max}} \sim 379$ нм и ~ 398 нм ($\lambda_{\text{возб}} 340$ нм), в то время как одноцепочечные **6X** и **7X**, а также их дуплексы с немодифицированной ДНК проявляют типичную мономерную флуоресценцию перилена при $\lambda_{\text{max}} \sim 451$ нм и ~ 480 нм и плечо при ~ 520 нм.

При $\lambda_{\text{возб}} 340$ нм для дуплексов, содержащих мономеры X и Z в комплементарных цепях, наблюдались две составляющие спектра флуоресценции, первая из которых представляла собой мономерную флуоресценцию пирена, а вторая соответствовала мономерной эмиссии перилена; при этом эффективность FRET почти линейно увеличивалась от 7% до ~90% при сближении донора и акцептора энергии (**6Z:7X** в сравнении с **6Z:6X**, **1Z:7X**) (табл. 6).

Таблица 6. Термическая стабильность дуплексов, содержащих периленметил- и пиренметил-LNA в двух комплементарных цепях и эффективность переноса энергии (E_A).

#	Последовательность	T_m (°C)	E_A	#	Последовательность	T_m (°C)	E_A
5m	5'-GAA CGT ATA TAT ATA TAG CAC G	54.5	—	6Z	5'-GAA CGT ATA TAT ATA ZAG CAC G	56.0	89%
6m	3'-CTT GCA TAT ATA TAT ATC GTG C			6X	3'-CTT GCA TAT ATA TAT <u>A</u> XC GTG C		
1Z	5'-GAA CGZ ATA TAT ATA TAG CAC G	56.0	10%	1Z	5'-GAA CGZ ATA TAT ATA TAG CAC G	55.0	87%
6X	3'-CTT GCA TAT ATA TAT <u>A</u> XC GTG C			7X	3'-CTT GCA <u>X</u> AT ATA TAT ATC GTG C		
2Z	5'-GAA CGT AZA TAT ATA TAG CAC G	56.0	13%	2Z	5'-GAA CGT AZA TAT ATA TAG CAC G	59.5	67%
6X	3'-CTT GCA TAT ATA TAT <u>A</u> XC GTG C			7X	3'-CTT GCA <u>X</u> AT ATA TAT ATC GTG C		
3Z	5'-GAA CGT ATA ZAT ATA TAG CAC G	56.0	13%	3Z	5'-GAA CGT ATA ZAT ATA TAG CAC G	56.0	25%
6X	3'-CTT GCA TAT ATA TAT <u>A</u> XC GTG C			7X	3'-CTT GCA <u>X</u> AT ATA TAT ATC GTG C		
4Z	5'-GAA CGT ATA TAZ ATA TAG CAC G	56.0	26%	4Z	5'-GAA CGT ATA TAZ ATA TAG CAC G	56.0	10%
6X	3'-CTT GCA TAT ATA TAT <u>A</u> XC GTG C			7X	3'-CTT GCA <u>X</u> AT ATA TAT ATC GTG C		
5Z	5'-GAA CGT ATA TAT AZA TAG CAC G	56.0	58%	6Z	5'-GAA CGT ATA TAT ATA ZAG CAC G	55.5	7%
6X	3'-CTT GCA TAT ATA TAT <u>A</u> XC GTG C			7X	3'-CTT GCA <u>X</u> AT ATA TAT ATC GTG C		

Методами молекулярной динамики и минимизации энергии установлено, что во всех случаях структура с минимальной энергией включает расположение остатков пирена и перилена в малой бороздке дуплексов, причем для всех дуплексов, кроме **2Z:6X**, флуорофоры располагаются в направлении 3'-конца ковалентно модифицированного олигонуклеотида (рис. 5). В результате флуорофоры дуплексов **1Z:6Z:6X** и **1Z:7X** ориентированы в направлении друг друга, тогда как в **3Z:7X**, **4Z:7X** и **6Z:7X** – напротив, друг от друга.

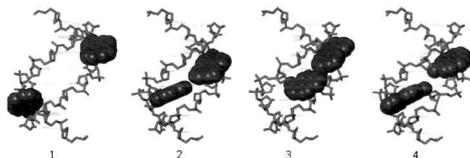


Рис. 5. Структуры модифицированных дуплексов с наименьшей энергией, полученные методом молекулярного моделирования: **4Z:6X** (1), **1Z:7X** (2), **2Z:7X** (3), **3Z:7X** (4). Нуклеиновые основания изображены зеленым, сахарофосфатный остов – красным, флуорофоры – синим.

3.1.4. Спектральные свойства *in vitro* конъюгатов, содержащих 2'-N-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA

Мы изучили спектральные свойства олигонуклеотидов и дуплексов, содержащих 2'-N-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA в одной цепи (табл. 7). УФ/видимые спектры модифицированных конъюгатов демонстрируют две полосы поглощения в видимой области при $\lambda_{\max} \approx 448-456$ нм и $\lambda_{\max} \approx 422-429$ нм. Спектры флуоресценции конъюгатов периленкарбонил-2'-амино-LNA, содержащих одну метку, наблюдаются в области 440–590 нм и представляют собой широкие, неструктурированные полосы эмиссии, характерные для арилкарбонил-2'-амино-LNA (спектры не приводятся). При образовании дуплексов максимумы флуоресценции смешиваются на 2–4 нм в коротковолновую область; при этом интенсивность флуоресценции меняется незначительно. Квантовые выходы флуоресценции моно-меченых олигонуклеотидов и дуплексов весьма высоки ($\Phi_f = 0.49-0.61$), однако при введении в последовательность второго остатка периленкарбонил-LNA приводит к существенному тушению флуоресценции – величины Φ_f снижаются до 0.03–0.24.

Гибридизация трижды модифицированного зонда **7Y** с комплементарными ДНК и РНК приводит к ~14-кратному увеличению интенсивности эмиссии при 490 нм (рис. 6). Яркая зеленая

флуоресценция дуплексов **7Y**:ДНК/РНК легко видна невооруженным глазом вплоть до концентраций раствора менее 0.5 мкМ. Подобный эффект гибридизации на флуоресценцию трижды-меченных конъюгатов (тушение флуоресценции одноцепочечного олигонуклеотида и ее заметное возрастание при гибридизации) был ранее отмечен для пиренкарбонил-LNA, являясь по всей видимости общим свойством для LNA-ПАУ-содержащих зондов подобной структуры.

Таблица 7. Спектральные и фотофизические свойства модифицированных олигонуклеотидов, содержащих 2'-N-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA в одной цепи (*ОДН*) и их дуплексов с ДНК (*ДНК*) и РНК (*РНК*).^a

#	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$, нм			$\lambda_{\max}^{\text{f}}$, нм			Φ_f			FB		
	<i>ОДН</i>	<i>ДНК</i>	<i>РНК</i>	<i>ОДН</i>	<i>ДНК</i>	<i>РНК</i>	<i>ОДН</i>	<i>ДНК</i>	<i>РНК</i>	<i>ОДН</i>	<i>ДНК</i>	<i>РНК</i>
1Y	452; 426	448; 422	449; 422	488	484	486	0.61	0.49	0.50	13.4	17.1	16.5
4Y	453; 427	449; 423	449; 423	490	479	480	0.11	0.24	0.24	5.4	14.6	13.7
6Y	453; 427	452; 427	452; 426	492	490	490	0.06	0.06	0.03	4.5	4.4	2.4
7Y	454; 429	449; 423	449; 423	492	483	481	0.04	0.25	0.23	3.4	28.8	25.5
8Y	455; 429	451; 425	448; 423	490	485	493	0.03	0.2	0.21	2.4	17.8	21.8
9Y	456; 429	451; 425	451; 426	492	488	488	0.03	0.09	0.1	4.7	12.9	14.3

^a Измерения проведены в гибридизационном буфере при 293 К, в присутствии кислорода воздуха. $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ – максимумы поглощения; $\lambda_{\max}^{\text{f}}$ – максимумы флуоресценции; Φ_f – квантовый выход флуоресценции ($\pm 5\%$), измеренный относительно перилена в циклогексане ($\Phi_f = 0.93$); FB = яркость флуоресценции ($\text{FB} = \Phi_f \times \epsilon_{\max}$).

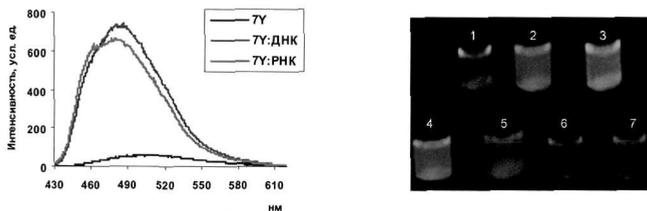


Рис. 6. Слева: спектры флуоресценции модифицированного олигонуклеотида **7Y** и его дуплексов с комплементарными немодифицированными ДНК и РНК. Спектры зарегистрированы в гибридизационном буфере, концентрация каждого олигонуклеотида 1×10^{-7} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 425 нм. Справа: Фотографии флуоресценции в гибридизационном буфере: **7Y** (1, 1×10^{-7} М); **7Y**:ДНК (2, 1×10^{-7} М), **7Y**:РНК (3, 1×10^{-7} М); **7Y**:ДНК (4–6, концентрация: 1×10^{-7} М, 0.5×10^{-7} М, 0.1×10^{-7} М, соответственно); гибридизационный буфер (7). Фотографии сняты на цифровую камеру с использованием лабораторной УФ-лампы ($\lambda_{\text{возб}}$ 365 нм). **7Y**: 5'-G**Y**G**A**Y**A**YGC-3', **ДНК**: 5'-GCATATCAC-3', **РНК**: 5'-r(GCAUAUCAC)-3'.

Затем были исследованы флуоресцентные свойства дуплексов, образованных конъюгатом **7Y** с ДНК и РНК, содержащими некомплементарные нуклеотиды в положениях 4–6 (рис. 7). Спектры флуоресценции зарегистрированы для дуплексов, характеризующихся значениями температуры плавления $T_m \geq 22^\circ\text{C}$ (табл. 5). Как видно, в присутствии мисматчей интенсивность флуоресценции модифицированных дуплексов заметно снижается; наиболее высокое значение фактора дискриминации мисматча (отношение интенсивности флуоресценции комплементарного дуплекса к интенсивности дуплекса, содержащего мисматч) для **7Y** равно восьми (при мисматчах T/G, A/A, A/G и при A/G, A/A в ДНК и РНК, соответственно). Следует отметить, что наблюдаемый уровень дискриминации сравним, а иногда выше, чем таковой для ряда FRET-биосенсоров, молекулярных маяков (molecular beacons) и других флуоресцентных зондов. Таким

образом, 2'-N-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA представляется эффективной флуоресцентной меткой для детекции точечных мутаций в растворе.

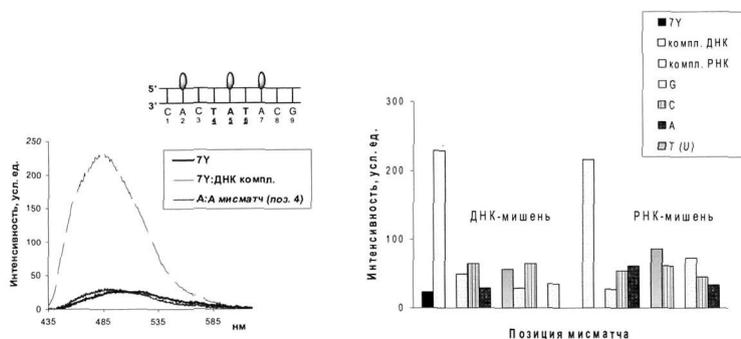


Рис. 7. Слева: спектры флуоресценции модифицированного олигонуклеотида 7Y и его дуплексов с комплементарной и содержащей мисматч ДНК; справа: интенсивности флуоресценции дуплексов 7Y с комплементарными и содержащими мисматч ДНК/РНК. Условия регистрации спектров флуоресценции описаны в комментариях к рис. 6. Схематически показано положение модификаций (2'-N-(перилен-3-ил)карбонил-2'-амино-LNA-нуклеозиды представлены овалами).

3.2. Синтез 2'-N-(фенилэтинил)пиренметил- и 2'-N-(фенилэтинил)пиренкарбонил- 2'-амино-LNA и амидофосфитных реагента на их основе (флуорофор присоединен к LNA через арильную группу); свойства модифицированных олигонуклеотидов

Флуоресцентные олигонуклеотиды, меченные LNA, проявляют высокую аффинность в отношении ДНК и РНК, что делает их потенциальными строительными блоками для самосборки наноструктур. Недавно было выяснено, что введение модификаций пирен-LNA в две цепи ДНК-ДНК дуплексов приводит к высокой температуре плавления, а также к эффективному образованию межпепточного эксимера пирена. Подобные свойства делают такие конъюгаты интересными объектами для развития нанотехнологии на основе НК, так как самосборка молекулярных конструкций из меченых олигонуклеотидов может быть детектирована посредством мониторинга флуоресценции пирена.

Принимая во внимание улучшенные спектральные характеристики (фенилэтинил)пиренов по сравнению с пиреном, мы синтезировали и ввели в олигонуклеотиды пять модифицированных мономеров: 2'-N-(фенилэтинил)пиренметил- и 2'-N-(фенилэтинил)пиренкарбонил-2'-амино-LNA. 2'-Амино-LNA функционализировали 1- и 2-PEPу, причем присоединение красителя к LNA осуществлялось как через бензильную, так и бензоильную группы.

Модифицированные амидофосфитные реагенты 3.15–3.16 и 3.20–3.21, синтез которых приведен на схеме 5, использовали в твердофазном олигонуклеотидном синтезе модифицированных олигомеров (табл. 8). Для мономеров W¹-W⁴ применяли процедуру двойной конденсации вручную (2×30 мин); эффективность конденсации с их участием при этом составила

92–95%. Олигонуклеотиды были деблокированы по стандартной методике и метки выделены при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ; их структура подтверждена MALDI-TOF масс-спектрами.

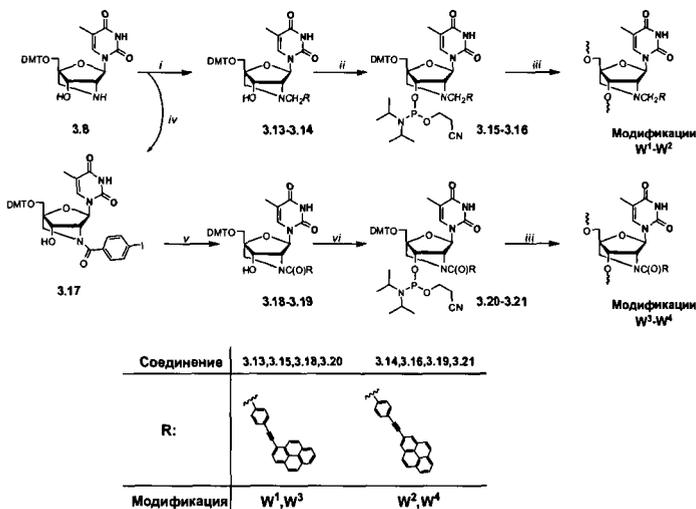


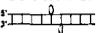
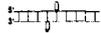
Схема 5. Реагенты и условия: (i) 4-(пирен-1(2)-илэтил)бензальдегид, NaBH(OAc)₃, 1,2-дихлорэтан; (ii) CIP(NPr₂)OC₂H₄CN, DIPEA, DCM; (iii) олигонуклеотидный синтез; (iv) 4-нодбензойная кислота, HATU, DIEA, DMF; (v) 1-, 2- или 4-этилпирен, Pd(PPh₃)₄, CuI, NEt₃, DMF; (vi) (Pr₂N)₂POC₂H₄CN, тетразолид диизопропиламмония, DCM.

Мы изучили термическую стабильность 9-звенных дуплексов, содержащих модификации W¹–W⁴ в одной и двух комплементарных цепях (табл. 8). Как видно модификации W¹–W⁴ оказывали значительный стабилизирующий эффект на комплексы с немодифицированными ДНК и РНК, наибольшие значения которого отмечены для (фенилэтил)пиренкарбонил- (PEPус-) меченых дуплексов 1W³:ДНК/РНК. Введение модификации в комплементарную ДНК приводит к еще более значительной стабилизации дуплексов по сравнению с аналогами, содержащими метку в одной цепи, причем стабильность PEPус-содержащих комплексов опять же значительно превышает таковую для PEPу-метильных модификаций W¹–W². Стабильность дуплексов конституции «+1 zipper» во всех случаях превышала таковую для «–1» аналогов. Дуплексы, содержащие PEPус-нуклеотиды W³–W⁴, проявили необычно высокую термическую стабильность – так значение T_m для 1W⁴:2W⁴ составило 66.0°C, что является удивительно высокой величиной для 9-звенной двухцепочечной ДНК. Мы связываем наблюдаемую высокую стабильность дуплексов, содержащих модификации W¹–W⁴ в двух комплементарных цепях, с межцепочечным взаимодействием остатков ПАУ (стэкинг-взаимодействие).

Спектры флуоресценции олигонуклеотидов и дуплексов, содержащих одну модификацию W¹ или W², похожи; максимумы флуоресценции 1- и 2-PEPу-LNA расположены при 390 нм и 425 нм, соответственно. В свою очередь, спектры флуоресценции олигонуклеотидов и дуплексов, содержащих PEPус-модификации W³ и W⁴, заметно уширены, что весьма характерно для

красителей, присоединенных к LNA через амидную связь. При гибридизации зондов с немодифицированными комплементарными ДНК и РНК максимумы флуоресценции смещаются на 2–5 нм в коротковолновую область; при этом гибридизация оказывает незначительное влияние на вид спектров флуоресценции красителей. При гибридизации олигонуклеотида $1W^1$ с модифицированными комплементарными ДНК $2W^1$ и $3W^1$ наблюдается эмиссия эксимера, которая более интенсивна для «+1 зиппера» $1W^1:2W^1$, тогда как в случае 2-PEPy-меченных дуплексов, в которых модификации введены в обе цепи, флуоресценция эксимера отсутствует (рис. 8).

Таблица 8. Термическая стабильность дуплексов, содержащих модификации W^1-W^4 в одной и двух комплементарных цепях.

	$T_m (\Delta T_m / \text{Мод}) / ^\circ\text{C}$			
	5'-GTG AWA TGC Дуплексе с комплементарной		5'-GTG AWA TGC 3'-GCA TAW CAC  " +1 зиппер "	5'-GTG AWA TGC 3'-GCA WAT CAC  " -1 зиппер "
	ДНК	РНК		
W^1	33.5 (+5.5)	33.5 (+7.5)	50.0 (+11.0)	39.5 (+5.8)
W^2	33.5 (+5.5)	34.5 (+8.5)	52.0 (+12.0)	38.0 (+5.0)
W^3	40.5 (+11.5)	36.0 (+10.0)	64.0 (+18.0)	63.0 (+17.5)
W^4	40.5 (+11.5)	37.0 (+11.0)	66.0 (+19.0)	62.0 (+17.0)

При гибридизации олигонуклеотида $1W^1$ с модифицированными комплементарными ДНК $2W^1$ и $3W^1$ наблюдается образование эксимера PEPy, сигнал эмиссии которого наиболее интенсивен для «+1 зиппера» $1W^1:2W^1$, тогда как в случае 2-PEPy-меченных дуплексов, содержащих модификации в двух комплементарных цепях, флуоресценция эксимера полностью отсутствовала (рис. 8).

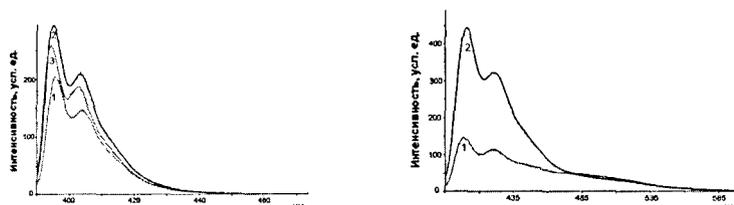


Рис. 8. Спектры флуоресценции конъюгатов, содержащих модификацию W^1 : (слева) одноцепочечный $1W^1$ (1) и его дуплексы с комплементарными немодифицированными ДНК (2) и РНК (3); (справа) дуплексы $1W^1:2W^1$ (1) и $1W^1:3W^1$ (2). Спектры зарегистрированы в гибридизационном буфере, концентрация каждого олигонуклеотида 1.5×10^{-7} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 375 нм. $1W^1$: 5'-GTGAW \underline{W} ATGC-3', ДНК: 5'-GCATATCAC-3', РНК: 5'-(GCAUAUCAC)-3', $2W^1$: 5'-GCAW \underline{W} ATCAC-3', $3W^1$: 5'-GCATAW \underline{W} CAC-3'.

3.3. 2'-N-(Фенилэтил)пиренкарбонил-2'-амино-LNA-нуклеозиды в олигонуклеотидах

3.3.1. Синтез мономеров, олигонуклеотидов и термическая стабильность дуплексов

Итак, олигонуклеотидные зонды, меченные PEPy, представляют собой перспективные зонды для различных исследований НК, характеризующиеся более высокими квантовыми выходами флуоресценции и длинноволновой эмиссией по сравнению с пиреном, а также способные к образованию эксимеров в составе дуплексов. Однако недавно было показано, что

пирен, содержащий более одного фенилэтинильного заместителя, проявляет улучшенные спектральные и фотофизические свойства по сравнению с моно-(фенилэтинил)пиреновым красителем, включая bathochromные сдвиги максимумов абсорбции и эмиссии (~ 25 нм и 30 нм по сравнению с I-PEPy) и еще более высокие квантовые выходы флуоресценции.

В следующей части исследования нами синтезированы шесть новых флуорофоров на основе PEPy, содержащих от одной до трех фенилэтинильных групп. Красители присоединяли к LNA посредством амидной связи: для введения остатков PEPy в LNA осуществляли конденсацию соответствующих PEPy-карбоновых кислот с 2'-амино-LNA-нуклеозидом.

Сначала нами были разработаны методы получения исходных кислот (схема 6). Ацилирование 2'-амино-LNA (3.8) PEPy-карбоновыми кислотами 3.35–3.40 в присутствии NBTU приводило к нуклеозидам 3.41–3.46, модифицированным (фенилэтинил)пиренкарбонильными (PEPy) группами, которые превращали в амидофосфиты 3.47–3.52 по стандартной методике (схема 7). Структуры промежуточных соединений подтверждены ¹H-, ¹³C- и ³¹P-ЯМР-спектрами и масс-спектрами высокого разрешения, для кристаллических соединений определены температуры плавления.

Амидофосфитные реагенты 3.47–3.52 использовали в твердофазном олигонуклеотидном синтезе 9- и 13-звенных модифицированных олигомеров (табл. 9). Олигонуклеотидный синтез проводили по стандартным методикам, за исключением модифицированных мономеров, для которых применяли процедуру двойной конденсации вручную (2×30 мин). Эффективность конденсации с участием модифицирующих реагентов составила 85–95%. Олигонуклеотиды были деблокированы по стандартной методике и метки выделены при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ; их структура подтверждена MALDI-TOF масс-спектрами.

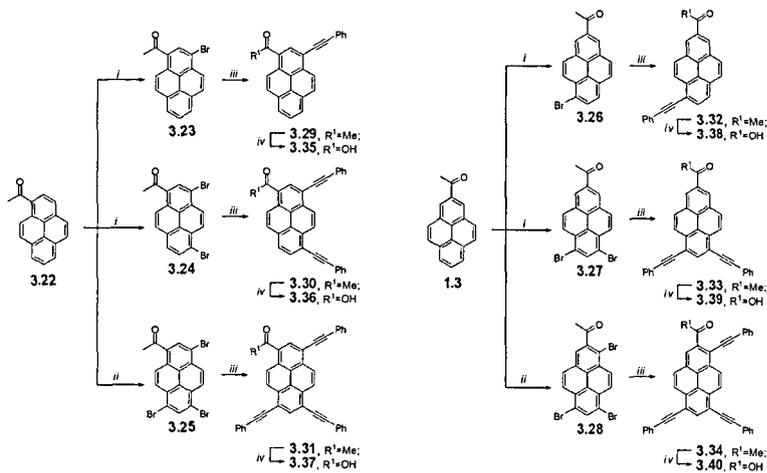


Схема 6. Реагенты и условия: (i) Br₂, CCl₄, 60 °С; (ii) Br₂, PhNO₂, 120 °С; (iii) фенилацетилен, [PdCl₂(PPh₃)₂], PPh₃, CuI, Net₃, THF, 70 °С; (iv) NaOH, Br₂, 1,4-диоксан, вода, 0 °С.

3.3.2. Спектральные и фотофизические свойства 2'-N-(фенилэтинил)пиренкарбонил-2'-амино-LNA в составе олигонуклеотидов

Нами изучены спектральные и фотофизические свойства модифицированных олигонуклеотидов и дуплексов, содержащих моно-, бис- и трис-РЕРус-LNA M^1 – M^6 . Репрезентативные спектры поглощения и флуоресценции, а также фотографии эмиссии 9-звенных олигонуклеотидов, содержащих мономеры M^1 – M^6 , показаны на рисунке 9. Максимумы поглощения конъюгатов трис-РЕРус расположены при $\lambda_{\text{max}} \approx 449$ – 461 нм, 421 – 435 нм и 310 – 340 нм, тогда как их флуоресценция наблюдается в области 440 – 540 нм (при $\lambda_{\text{max}} \approx 465$ нм). Таким образом, батохромный сдвиг флуоресценции трис-РЕРус по сравнению с пиреном составляет ~ 100 нм. Такой значительный длинноволновый сдвиг флуоресценции приводит к ярким зеленому и голубому цветам флуоресценции растворов конъюгатов M^5 и M^6 , соответственно (рис. 9).

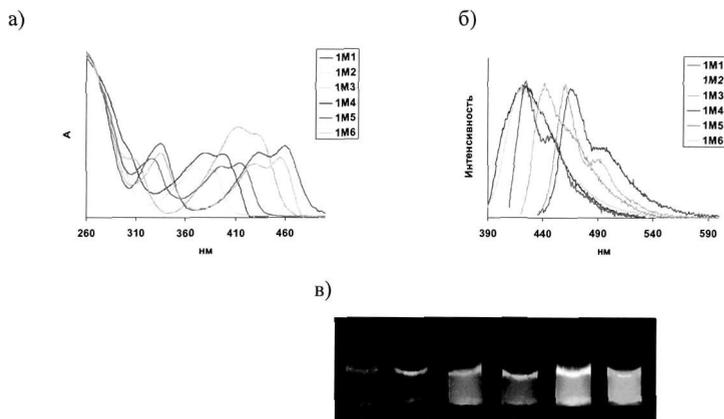


Рис. 9. Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) 9-звенных олигонуклеотидов, содержащих модификации M^1 – M^6 . Концентрация каждого олигонуклеотида 1×10^{-6} М (а) и 1×10^{-7} М (б); $\lambda_{\text{возб}}$ 375 нм (M^1), 370 нм (M^2), 415 нм (M^3), 395 нм (M^4), 425 нм (M^5), 420 нм (M^6). Спектры нормализованы по поглощению при 260 нм (а) или по максимумам эмиссии (б). в) Фотографии флуоресценции в гибридационном буфере (слева направо): M^1 , M^2 , M^3 , M^4 , M^5 , M^6 . Концентрация каждого олигонуклеотида 2×10^{-6} М. Фотографии сделаны при помощи цифровой камеры; для возбуждения флуоресценции использовалась лабораторная УФ-лампа (λ_{max} 365 нм). M : 5'-GTGAMATGC-3' ($M = M^1$ – M^6).

Помимо длинноволнового сдвига максимумов поглощения и флуоресценции, расширение системы π -сопряжения пирена увеличило квантовые выходы флуоресценции флуорофоров и значительно улучшило их способность к образованию внутри- и межцепочечных эксимеров. Кроме того, продемонстрирована полезность бис- и трис-РЕРус-модификаций в составе олигонуклеотидных зондов для детекции гибридизации НК. Например, интересные спектральные свойства продемонстрировал конъюгат M^4 , при гибридизации которого с комплементарными ДНК и РНК интенсивность эмиссии при 415 нм возрастала в 3 и 4 раза, соответственно. Квантовые выходы флуоресценции соответствующих дуплексов при этом достигали крайне высоких значений для пирена на НК ($\Phi_f = 1.00$ и 0.75 для M^4 :ДНК и M^4 :РНК, соответственно). Кроме того, олигонуклеотид M^4 проявил высокую селективность Уотсон-Криковского паро-

образования в отношении комплементарных ДНК и РНК. Конъюгат $1M^4$ не образовывал дуплексов при температуре выше 10°C со всеми мишенями, содержащими мисматчи, за исключением ДНК, содержащей некомплемтарные нуклеотиды в положении 6 (табл. 10). Спектральные свойства этих дуплексов позволяют предположить, что бис-РЕРус интеркалирует в двойную спираль в том случае, когда напротив модификации расположен неспаренный нуклеотид, так как интенсивность флуоресценции M^4 совершенно не зависит от природы мисматча (рис. 10).

Таблица 10. Термическая стабильность модифицированных дуплексов, образованных олигонуклеотидом $1M^4$ и ДНК и РНК, содержащими мисматчи.^a

	$T_m / ^\circ\text{C}$								
	ДНК-мишень				РНК-мишень				
	В:	A	C	G	T	A	C	G	U
$1M^4$ мишень	5' - GTG AM ⁴ A TGC								
	3' - CAC BAT ACG	< 10	< 10	< 10	32.5	30.0	< 10	< 10	< 10
	5' - GTG AM ⁴ A TGC								
	3' - CAC TBT ACG	32.5	33.0	33.0	36.0	< 10	< 10	< 10	30.0
	5' - GTG AM ⁴ A TGC								
	3' - CAC TAB ACG	< 10	< 10	< 10	32.5	< 10	< 10	< 10	30.0

^a Температуры плавления комплементарных модифицированных дуплексов выделены жирным; температуры плавления немодифицированных дуплексов: 28.0°C и 26.0°C для $1M^4$:ДНК и $1M^4$:РНК, соответственно.



Рис. 10. а) Спектры флуоресценции олигонуклеотида $1M^4$ и его дуплексов с комплементарными немодифицированными ДНК и РНК; б) интенсивности флуоресценции дуплексов $1M^4$ с комплементарной и содержащими мисматчи ДНК. Спектры зарегистрированы в гибридационном буфере, концентрация каждого олигонуклеотида 1×10^{-7} М, $\lambda_{\text{возб}}$ 395 нм. $1M^4$: 5'-GTGAM⁴ATGC-3', ДНК: 5'-GCATATCAC-3', РНК: 5'-г(CCAUAUCAC)-3'.

ВЫВОДЫ

1. Разработан ряд новых флуоресцентных красителей – фенилэтинильных производных пирена: функционализированные 2- и 4-фенилэтинилпирены, а также различные бис- и трис(фенилэтинилпирены). Эти красители демонстрируют длинноволновый сдвиг максимумов эмиссии и увеличенные квантовые выходы флуоресценции по сравнению с пиреном, но сохраняют способность к образованию эксимеров (кроме 2-фенилэтинилпиреновых соединений).
2. Синтезированы рибо-, арабино- и конформационно-блокированные (LNA) нуклеозиды, модифицированные по 2'-положению флуоресцентными производными полициклических ароматических углеводов (перилена, различных моно-, бис- и

трис(фенилэтинил)пиренов), и амидофосфитные реагенты, позволяющие вводить эти нуклеозиды в состав олигонуклеотидов.

3. Синтезированы олигонуклеотиды, содержащие различные флуоресцентные нуклеозиды в заданных положениях. Изучены гибридизационные, спектральные и фотофизические свойства полученных конъюгатов; продемонстрирована возможность их применения в качестве ДНК-зондов для детекции гибридизации с ДНК и РНК в растворе, а также для детекции однонуклеотидных замен в ДНК-мишени.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **I.V. Astakhova**, A.D. Malakhov, I.A. Stepanova, A.V. Ustinov, S.L. Bondarev, A.S. Paramonov, V.A. Korshun. 1-Phenylethynylpyrene (1-PEPy) as refined excimer forming alternative to pyrene: case of DNA major groove excimer. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1972–1980.
2. D. Lindegaard, A.S. Madsen, **I.V. Astakhova**, A.D. Malakhov, B.R. Babu, V.A. Korshun, J. Wengel. Pyrene–perylene as a FRET pair coupled to the N2'-functionality of 2'-amino-LNA. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 94–99.
3. **I.V. Astakhova**, V.A. Korshun, J. Wengel. Novel long-wave emission fluorochrome based upon perylen-3-ylcarbonyl-functionalized 2'-amino-LNA. *Collection Symp. Ser.* **2008**, *10*, 307–308.
4. **I.V. Astakhova**, V.A. Korshun, J. Wengel. (Phenylethynyl)pyrenes attached to 2'-amino-LNA: novel fluorescent dyes with the advantages of long-wave emission, high fluorescence quantum yields and excimer formation. *Collection Symp. Ser.* **2008**, *10*, 491–495.
5. V.V. Filichev, **I.V. Astakhova**, A.D. Malakhov, V.A. Korshun., E.B. Pedersen. DNA glue: 1-, 2- and 4-ethynylpyrenes in the structure of twisted intercalating nucleic acids (TINAs), DNA duplexes/triplexes and interstrand excimer formation. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, No. 52, 347–348.
6. **И.В. Астахова**, В.А. Коршун. 2- и 4-Фенилэтинилпирены – новые флуоресцентные метки для ДНК. *Биоорганическая химия* **2008**, *34*, 570–572.
7. V.V. Filichev, **I.V. Astakhova**, A.D. Malakhov, V.A. Korshun., E.B. Pedersen. 1-, 2- and 4-Ethynylpyrenes in the structure of twisted intercalating nucleic acids: structure, thermal stability, and fluorescence relationship. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9968–9980.
8. **I.V. Astakhova**, V.A. Korshun, K. Jahn, J. Kjems, J. Wengel. Perylene attached to 2'-amino-LNA: synthesis, incorporation into oligonucleotides and remarkable fluorescence properties *in vitro* and in cell culture. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1995–2007.
9. **I.V. Astakhova**, V.A. Korshun, J. Wengel. Highly fluorescent conjugated pyrenes in nucleic acid probes: (phenylethynyl)pyrenecarbonyl-functionalized locked nucleic acid. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11010–11026.

Тезисы конференций

1. **I.V. Astakhova**, A.D. Malakhov, A.V. Ustinov, N.N. Dioubankova, V.A. Korshun. Excimer forming 1-, 2- and 4-phenylethynylpyrenes as fluorescent labels for DNA major groove. *Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School*. University of Southern Denmark, Odense, Denmark, **2005**, P-05.

2. **И.В. Астахова, А.Д. Малахов, В.А. Коршун.** Эксимер 1-фенилэтинилпирена в большой бороздке ДНК. *XVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии»*. Москва, **2006**, 56.
3. **И.В. Астахова, А.В. Устинов, С.Л. Бондарев, А.А. Турбан, А.Д. Малахов, В.А. Коршун.** Фенилэтинилпирены как эксимеробразующие флуоресцентные метки для ДНК. *Международная конференция «Физико-химическая биология»*. Новосибирск, **2006**, 121.
4. **I.V. Astakhova, A.D. Malakhov, V.A. Korshun.** (Phenylethynyl)pyrenes as fluorescent probes for DNA. *Træf for Organisk Kemi Studerende (TOKS) IX*. Copenhagen's Lyngby, Denmark, **2007**, P-13.
5. **I. Astakhova, A. Malakhov, A. Ustinov, S. Bondarev, V. Korshun, J. Wengel.** Novel multilabeled oligonucleotides containing 1-phenylethynylpyrene *ara*-2'-uridine-carbamate and LNA: synthesis and photochemical properties (*lecture*). *International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (ASMC 07)*. St. Petersburg, Russia, **2007**, T29.
6. **A. Madsen, D. Lindegaard, I. V. Astakhova, A. D. Malakhov, B. R. Babu, V. A. Korshun.** Pyrene-perylene as a FRET pair coupled to the N2'-functionality of 2'-amino-LNA. *234th ACS National Meeting*. Boston, MA, United States, **2007**, 336.

Заказ № 44-а/03/09 Подписано в печать 19.03.2009 Тираж 90 экз. Усл. п.л. 1,5



ООО "Цифровичок", тел. (495) 649-83-30; (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru