



УДК 577.113.6

НОВЫЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ МЕЧЕНИЯ БИМОЛЕКУЛ – АКТИВИРОВАННОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ПИРЕНОВОГО БИХРОМОФОРА С ЭКСИМЕРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЕЙ

© 1997 г. К. В. Балакин, В. А. Коршун, И. А. Прохоренко, Г. В. Малеев, И. А. Куделина, С. В. Гонтарев*, Ю. А. Берлин[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии МЗ Белоруссии, Минск

Поступила в редакцию 30.07.96 г.

Исходя из 1-пиренилуксусной кислоты синтезированы N-[2-(1-пиренил)этил]-1-пиренилацетамид, бис[2-(1-пиренил)этил]амин и N,N-бис[2-(1-пиренил)этил]амид янтарной кислоты – вещества, молекулы которых содержат сближенные остатки пирена и обладают эксимерной флуоресценцией. Последнее соединение в виде пентафторфенилового эфира использовано в синтезе флуоресцентно 5'-меченного олигодезоксирибонуклеотида (5')CAGGAAACAGCTATGAC. Для N,N-бис[2-(1-пиренил)этил]амида янтарной кислоты наблюдалось изменение соотношения мономерной и эксимерной флуоресценции, а также интенсивности флуоресценции в водно-метанольном растворе в присутствии одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов, при ковалентном присоединении к олигонуклеотиду и при гибридизации полученного конъюгата с комплементарной нуклеотидной последовательностью.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды, пиреновый хромофор, эксимерная флуоресценция.

Производные полициклического ароматического углеводорода пирена находят разнообразное применение в качестве флуоресцентных меток [1, 2]. Пирен поглощает в УФ-области ($\epsilon_{\lambda_{\max}}^{\text{ex}} \sim 340$ нм, $\epsilon \sim 40000$) и флуоресцирует в коротковолновой видимой области ($\epsilon_{\lambda_{\max}}^{\text{em}} \sim 370\text{--}395$ нм). Положение максимумов поглощения и флуоресценции пирена слабо зависит от растворителя и почти не изменяется при введении в молекулу алкильных заместителей. В то же время интенсивность флуоресценции сильно зависит от среды (в том числе микроокружения) и присутствия тушителей, что объясняется большим временем жизни возбужденного состояния молекулы (во многих случаях более 100 нс) [1].

Интересным свойством пиренового флуорофора является эксимерная (*excited dimer*) флуоресценция, проявляющаяся при возможности сближенного стопочного расположения двух молекул пирена (обзор по эксимерам см. [3]). Пиреновый эксимер имеет широкий максимум эмиссии при ~ 470 нм. Эксимерная флуоресценция пирена в жидкой фазе проявляется при высокой концентрации пирена в растворе, при агрегации пиреновых производ-

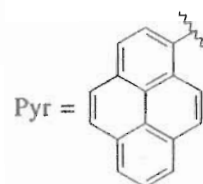
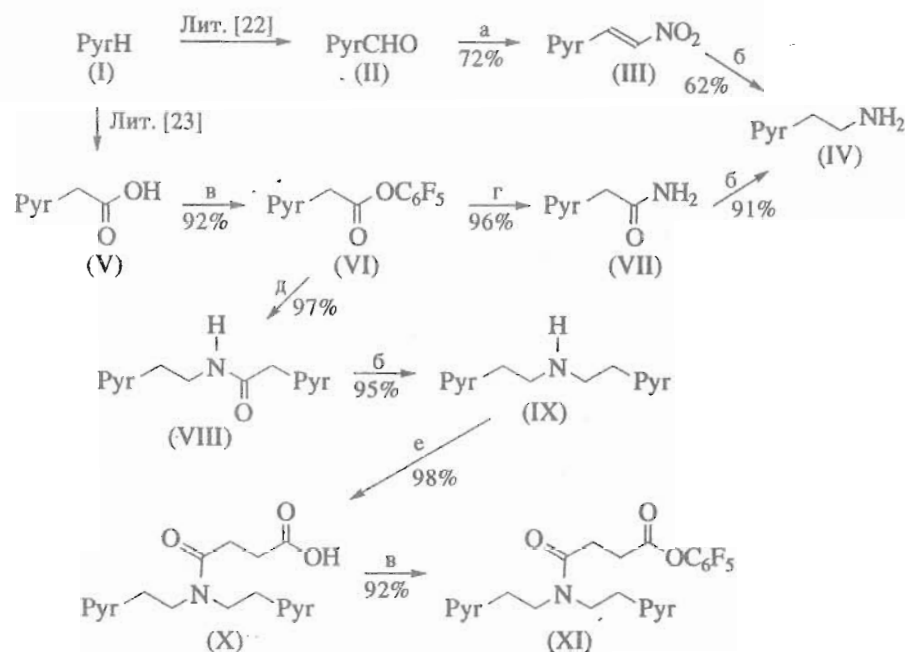
ных в коллоидном растворе или же для растворов соединений, в молекулах которых пиреновые остатки ковалентно соединены между собой посредством достаточно короткой и гибкой спейсерной группы (например, $(\text{CH}_2)_n$; $n = 2\text{--}10$), не препятствующей их копланарному сближению [4].

Еще одной особенностью пирена является его способность интеркалировать в ДНК-дуплексы, т.е. нековалентно встраиваться между двумя парами комплементарных оснований, участвуя в стэкинг-взаимодействиях. Интеркаляция была обнаружена в поисках объяснения резкого увеличения (в ~ 1000 раз) растворимости пирена и других полициклических ароматических углеводородов в воде в присутствии ДНК (см., например, [5–7]). К интеркаляции способны и различные производные пирена [8]. Отмечалось, что эксимерная флуоресценция 1,5-бис(1-пиренил)-3-[(2-гидроксиэтил)амино]пентаэна в водно-метанольном растворе уменьшается и далее совсем исчезает по мере увеличения концентрации присутствующей двухцепочечной ДНК [9], что, по мнению авторов, связано с интеркаляцией одного из пиреновых остатков в ДНК-дуплекс.

Пиреновые производные олигонуклеотидов используются для моделирования индукции канцерогенеза полициклическими ароматическими углеводородами [10, 11]. Метаболизм одного из самых опасных канцерогенов – бенз[*a*]пирена –

Сокращения: СРГ – стекло с определенным размером пор, Руг – пирен-1-ил. В обозначениях олигодезоксирибонуклеотидов префикс “d” всюду опущен.

[#] Автор для переписки.



Реагенты:

- (a) MeNO_2 , AcOH , NH_4OAc ;
- (б) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$;
- (в) $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, DCC , EtOAc , диоксан;
- (г) 25% водн. NH_3 ;
- (д) (IV), Et_2O , Py ;
- (е) $(\text{CH}_2\text{CO})_2\text{O}$, THF

Схема 1.

включает его биологическое окисление до диол-эпоксипроизводного пирена, который и является собственно канцерогеном из-за способности алкилировать нуклеиновые основания по экзоциклическим аминогруппам. Образующиеся ковалентные аддукты содержат 1,2-дизамещенный пиреновый остаток, флуоресценция которого в составе ДНК почти не отличается от флуоресценции самого пирена [12]. При модификации таким диолэпоксидом двух остатков дезоксигуанозина в GC-сайте двухцепочечной ДНК наблюдалась эксимерная флуоресценция [13].

Химическое присоединение пиреновых производных к нуклеиновым кислотам и их составляющим сопровождается нековалентным взаимодействием пиреновых остатков с нуклеиновыми основаниями, которое зависит от пространственной структуры биополимера и сказывается на интенсивности эмиссии пиренового флуорофора [14–21]. Так, значительное тушение флуоресценции отмечалось в результате ковалентного связывания пиренового остатка с нуклеозидом [16] и олигонуклеотидом [14–17, 19, 21]. Однако при гибридизации с комплементарной олигонуклеотидной последовательностью интенсивность флуоресценции олигонуклеотида, содержащего на 5'-конце 2'-O-(1-пиренилметил)уридин, возрастала в 20 раз [16]. В то же время для РНК, модифицированных по 3'-концу остатком 4-(1-пиренил)бутановой или 1-пиренилуксусной кислоты, была отмечена другая зависимость – при гибридизации с комплементарной РНК-последовательностью флуоресценция уменьшалась на порядок. Напротив, для короткого рибонуклеотида, содержащего на 5'-конце 5'-N-[4-(1-пиренил)бутирил]-5'-дезоксид-5'-амино-

цитидин, интенсивность флуоресценции при связывании с комплементарным олигорибонуклеотидом возрастала в 3.5 раза, а при взаимодействии с более длинным, структурированным олигорибонуклеотидом (рибозимом L-21 ScaI) – в 25 раз [19]. Наши наблюдения показали, что присоединение к 20-звенному олигонуклеотиду двух остатков пирена ведет к увеличению интенсивности флуоресценции в ~3–4 раза по сравнению с монофункционализированным конъюгатом [18]. Аналогично для полипиренмеченных олигонуклеотидов интенсивность эмиссии возрастала более чем аддитивно и наблюдалась эксимерная флуоресценция [21].

Цель данной работы – синтез соединения, которое содержит пиреновый бихромофор, способный к эксимерной флуоресценции, присоединение его к олигонуклеотиду и исследование изменения флуоресцентных свойств полученного конъюгата при его гибридизации с комплементарной нуклеотидной последовательностью.

В качестве структурной основы для бихромофора был выбран бис[2-(1-пиренил)этил]амин (IX) (схема 1) – вещество, в котором пиреновые полициклические системы соединены последовательно из шести ковалентных связей, обеспечивающей сближенное расположение пиреновых остатков, благоприятное для образования эксимера. По атому азота легко провести функционализацию вещества (IX), необходимую для присоединения его к олигонуклеотиду.

Амин (IX) проще всего может быть получен из амида (VIII), продукта ацилирования 2-(1-пиренил)этиламина (IV) 1-пиренилуксусной кислотой (V). В единственном ранее описанном случае амин (IV) получали из 1-формилпирена (II) через 1-(2-нитровинил)пирен (III) [24]. Нам не удалось достичь

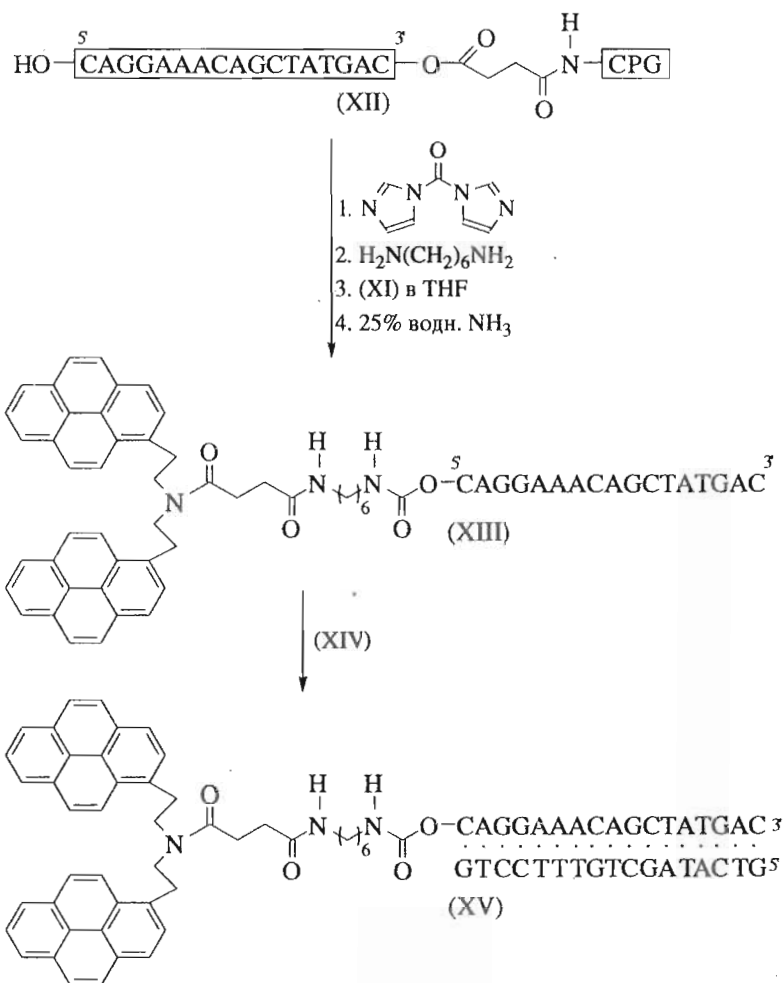


Схема 2.

высоких выходов, о которых сообщалось [24] для превращений веществ (II) \rightarrow (III) \rightarrow (IV). В результате конденсации Анри альдегида (II) с нитрометаном в условиях, близких к описанным, мы выделили нитроолефин (III) с выходом лишь 72% и по данным ^1H -ЯМР-спектра (3J для этиленовых протонов составила 13.1 Гц) охарактеризовали его как *E*-изомер; впервые описанный 1-(2-нитровинил)пирен [25] имел т. пл. 177°C (наш образец плавился при 193–194.5°C) и, по-видимому, был *Z*-изомером. Восстановление нитроолефина (III) с помощью LiAlH_4 привело к смеси трудноидентифицируемых продуктов реакции, что согласуется с данными работы [26]. Применение в качестве восстанавливающего реагента комплекса $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ [27] позволило выделить целевой амин (IV) с выходом 62%. Позже оказалось, что амин (IV) может быть получен более эффективно (с выходом 91%) борновым восстановлением 1-пиренилацетамида (VII).

С другой стороны, 1-пиренилуксусная кислота (V) была превращена в пентафторфениловый эфир (VI) по стандартной методике [28] с выходом 92%. Обработка этого эфира водным раство-

ром аммиака привела с выходом 96% к 1-пиренилацетамиду (VII), который был использован в упомянутом выше синтезе амина (IV). В то же время активированный эфир (VI) при взаимодействии с амином (IV) был превращен в амид (VIII) с выходом 97%. Восстановление полученного амида до амина (IX) комплексом $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ протекало с выходом 95%. Ацилирование амина (IX) янтарным ангидридом в THF привело к кислоте (X) (98%), которую с выходом 92% превратили в пентафторфениловый эфир (XI).

Растворы амида (VIII) и амина (IX) в хлороформе в концентрации 10^{-6} М обладают эксимерной флуоресценцией (данные не приведены).

Активированное производное пиренового бихромофора (XI) было использовано в синтезе меченого олигонуклеотида (схема 2). При помощи автоматического ДНК-синтезатора был получен N,P-защищенный 5'-O-детритилированный олигонуклеотид (XII), прикрепленный по 3'-концу к CPG-подложке. Дальнейшие превращения проводились по модифицированному методу [29]. После синтеза подложка с олигонуклеотидом (XII)

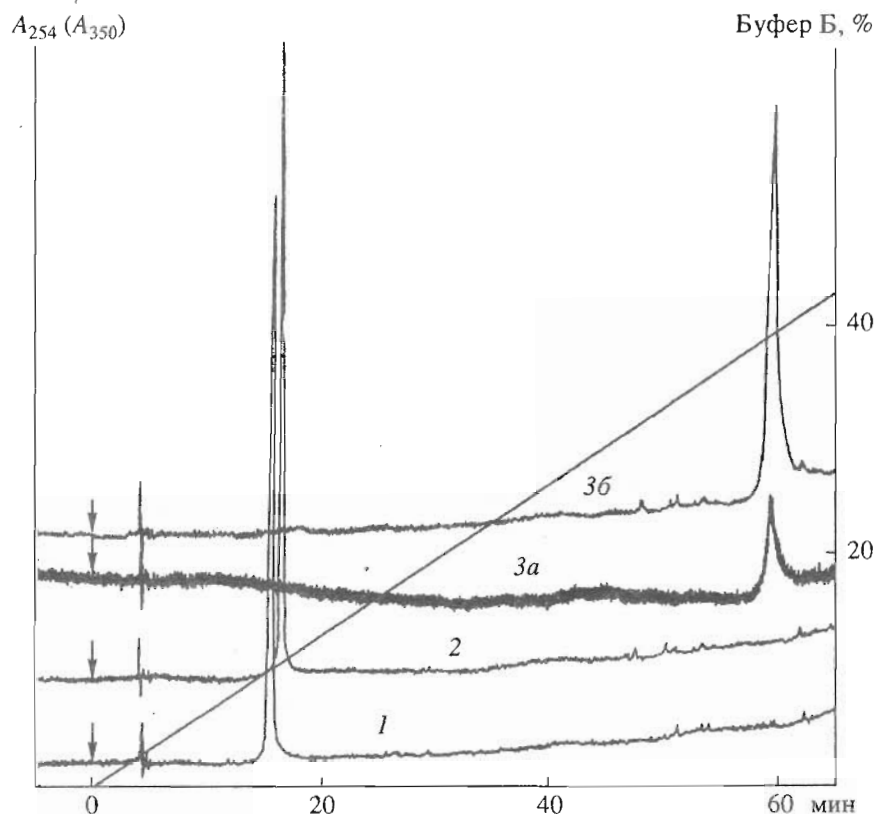


Рис. 1. Аналитическая офВЭЖХ немодифицированного олигонуклеотида (5') CAGGAAACAGCTATGAC (XVI) (1), его 5'-аминоалкилкарбамоильного производного $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NHC}(\text{O})-(5')\text{CAGGAAACAGCTATGAC}$ (XVII) (2) и конъюгата (XIII) (3). Детекция при 254 (1, 2, 3б) и 350 нм (3а). Стрелками показаны моменты введения образцов.

последовательно обрабатывалась растворами 1,1'-карбонилдиимидазола, 1,6-диаминогексана и активированного эфира (XI). После деблокирования был выделен меченный пиреновым бихромомфором олигонуклеотид (XIII), из которого гибридизацией с комплементарным олигонуклеотидом (5') GTCATAGCTGTTTCCTG (XIV) был получен дуплекс (XV). Аммиачное деблокирование N,P-защитного олигонуклеотида (XII) привело к немодифицированному олигонуклеотиду (5') CAGGAAACAGCTATGAC (XVI). После модификации олигонуклеотида (XII) наряду с целевым конъюгатом (XIII) было выделено аминоксилкарбамоильное производное $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NHC}(\text{O})-(5')\text{CAGGAAACAGCTATGAC}$ (XVII).

Введение в олигонуклеотид биспиренильной группировки приводит к резкому возрастанию гидрофобности конъюгата. Это хорошо иллюстрируется изменением подвижности в обращенно-фазовой ВЭЖХ: если введение аминоксилкарбамоильного остатка с образованием олигонуклеотида (XVII) лишь незначительно увеличивает время удерживания по сравнению с незамещенным олигомером (XVI) (с 15.5 до 16.5 мин), то время удерживания конъюгата (XIII) в тех же условиях составляет 59.4 мин (рис. 1).

В УФ-спектре конъюгата (XIII) имеются пиреновые полосы поглощения в области 320–360 нм, где его нуклеотидная часть не поглощает (рис. 2). Длинноволновый максимум поглощения пиренового хромофора в составе конъюгата в водном растворе находится при 349 нм, в то время как для бихромфора (X) он составляет 346 (в диоксане), 344 (в метаноле) и 343 нм (в смеси метанол–вода, 1 : 1). Этот небольшой bathochromный сдвиг при присоединении метки к олигонуклеотиду согласуется с данными работ [14, 15, 17].

Для бихромфора (IX) в метаноле величина ϵ составляет ~77000 при 344 нм и 35000–45000 в области 250–260 нм (УФ-спектр не приведен). Можно предположить, что при образовании конъюгата величина ϵ_{260} для его нуклеотидной части практически не изменяется и bathochromный сдвиг спектра поглощения бихромфора в составе конъюгата в области 250–260 нм по аналогии с ситуацией, наблюдаемой для области 320–360 нм, составляет не более 5–6 нм, так что вклад пиренового поглощения в величину ϵ_{260} конъюгата не должен превышать 45000. Рассчитанное значение ϵ_{260} для немодифицированного олигонуклеотида (XVI) составляет 173000; следовательно, для конъюгата (XIII) оно не должно превышать 218000. В этом случае максимальное значение

ϵ_{349} конъюгата может составить 40000 (расчет из соотношения A_{260}/A_{349} ; рис. 2), т.е. при присоединении к олигонуклеотиду поглощение остатка кислоты (X) в области 320–360 нм уменьшается вдвое. Логично предположить, что при этом уменьшается также пиреновое поглощение при 260 нм. Если принять, что уменьшение пиренового поглощения в области 250–260 нм пропорционально таковому в области 320–360 нм, то для конъюгата (XIII) расчет дает значения ϵ_{260} 210000 и ϵ_{349} 36000. Полученная величина ϵ_{260} была использована для определения концентрации конъюгата.

Представляло интерес выяснить, как влияет присоединение бифлуорофора к олигонуклеотиду и гибридизация полученного конъюгата с комплементарной последовательностью на люминесцентные свойства метки. В качестве растворителя для регистрации спектров флуоресценции была выбрана смесь вода–метанол (3 : 1), поскольку в такой системе можно получить растворы как кислоты (X), так и олигонуклеотидных производных (XIII) и (XV) в рабочих концентрациях 10^{-6} М (кислота (X) практически нерастворима в воде, а олигонуклеотиды – в органических растворителях). Оказалось, что свободная метка дает широкий эксимерный максимум в области 440–460 нм, а мономерная флуоресценция при ~ 375 нм практически отсутствует (рис. 3а, кривая 1). Из спектра конъюгата (XIII) (рис. 3а, кривая 3) видно, что ковалентное присоединение к олигонуклеотиду приводит к значительному увеличению интенсивности мономерной флуоресценции метки, а также к исчезновению эксимерной флуоресценции. Значительного изменения суммарной интенсивности флуоресценции в этом случае не происходит. Отсутствие полосы флуоресценции эксимера примечательно; оно свидетельствует о том, что взаимодействие по крайней мере одного из пиреновых остатков с одноцепочечным ДНК-олигомером приводит к невозможности стопочного расположения плоских пиреновых систем. При образовании дуплекса (XV) происходит дальнейшее увеличение интенсивности мономерной флуоресценции; при этом снова появляется эксимерная флуоресценция (рис. 3а, кривая 5), хотя и менее интенсивная, чем для свободной метки. Общая интенсивность флуоресценции при этом примерно в 1.5 раза больше, чем для бифлуорофора (X) или конъюгата (XIII).

Присутствие полосы эксимерной эмиссии свидетельствует о том, что комплементарная ассоциация двух олигонуклеотидов уменьшает специфическое взаимодействие пиреновых остатков с одноцепочечной ДНК, так что становится возможным образование эксимера. Для контроля были измерены спектры флуоресценции кислоты (X) в присутствии эквимольных количеств одноцепочечного олигонуклеотида (XVI) (рис. 3а, кривая 2) и

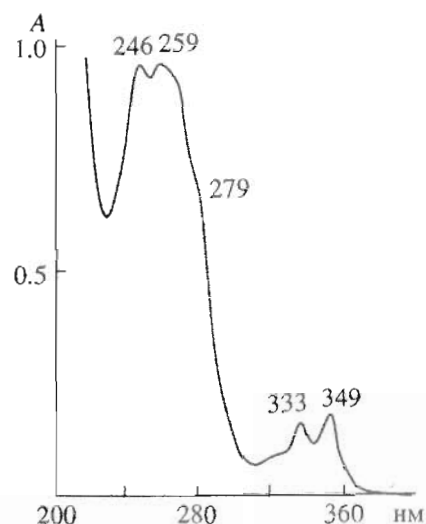


Рис. 2. Электронный спектр поглощения конъюгата (XIII) в воде. Указаны длины волн, соответствующие максимумам поглощения и плечу.

дуплекса (XVI) · (XIV) (рис. 3а, кривая 4). Любопытно, что в присутствии дуплекса интенсивность мономерной флуоресценции метки сильно возрастала, но заметно увеличивалась и эксимерная флуоресценция; суммарная интенсивность эмиссии увеличилась почти в 2 раза. Присутствие одноцепочечного олигонуклеотида немного увеличивало мономерную флуоресценцию и снижало эксимерную; суммарная интенсивность эмиссии практически не изменялась. В зависимости от условий наблюдались небольшие (до 5–6 нм) различия в положении обоих максимумов мономерной флуоресценции метки.

Для оценки влияния растворителя на флуоресценцию меченых олигонуклеотидов спектры конъюгата (XIII) и дуплекса (XV) были измерены не только в водном метаноле (см. выше), но и в воде (рис. 3б, соответственно кривые 2 и 1). Видно, что в водно-метанольном растворе интенсивность флуоресценции как конъюгата (XIII) (рис. 3б, кривая 3), так и дуплекса (XV) (рис. 3б, кривая 4) выше, чем в воде. При этом при переходе от воды к водному метанолу флуоресценция возрастала сильнее в случае дуплекса, чем конъюгата, так что в водном растворе сильнее флуоресцирует меченый олигонуклеотид, а в водно-метанольном растворе – дуплекс. Более того, в присутствии метанола для дуплекса (XV), как отмечено выше, существенно возрастает доля эксимерной флуоресценции, что свидетельствует об ослаблении взаимодействия метки с ДНК. Подобный эффект наблюдался ранее для другого растворителя – DMSO [14].

Вопрос о природе взаимодействия пиреновых остатков с олигонуклеотидами в составе конъюгатов обсуждался в литературе: были высказаны предположения о стэкинге с нуклеиновыми основаниями [14, 16, 17] и об интеркаляции в дуплекс

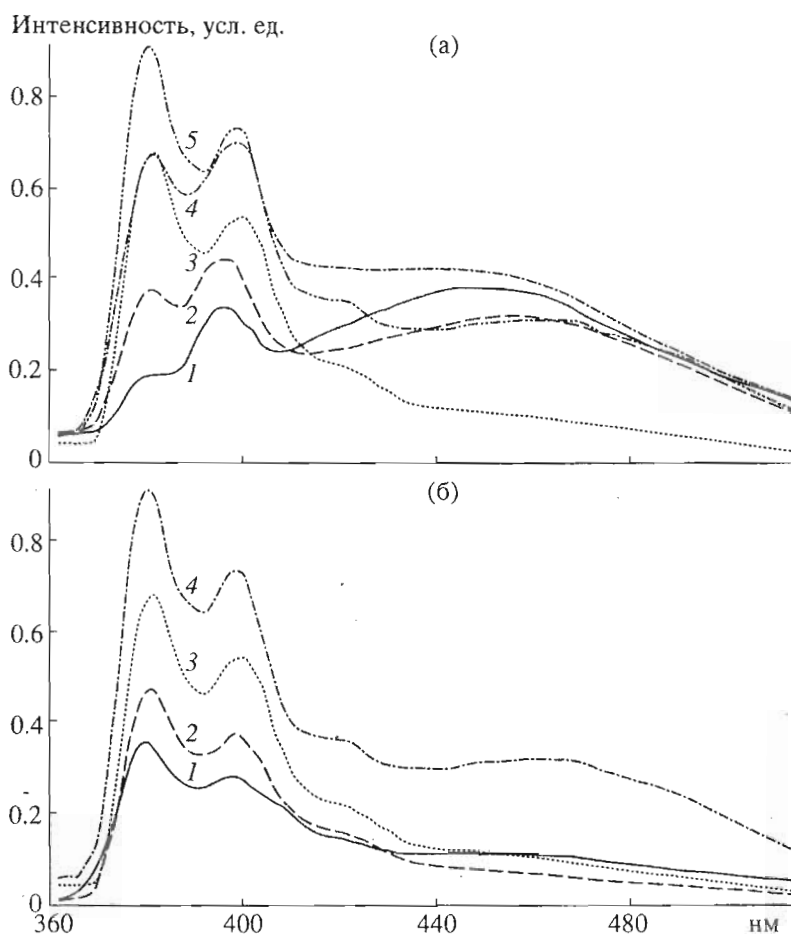


Рис. 3. Спектры флуоресценции пиренового бихромофора (X) и его олигонуклеотидных производных (XIII) и (XV). Концентрация веществ везде 10^{-6} М. а) в 25% водном метаноле: 1 – кислота (X), 2 – кислота (X) в присутствии олигонуклеотида (XVI), 3 – конъюгат (XIII), 4 – кислота (X) в присутствии дуплекса (XIV) · (XVI), 5 – дуплекс (XV). б) 1 – дуплекс (XV) в воде, 2 – конъюгат (XIII) в воде, 3 – конъюгат (XIII) в 25% водном метаноле, 4 – дуплекс (XV) в 25% водном метаноле.

[14, 15, 17]; допускается также возможность расположения пирена в бороздке дуплекса [17, 19]. Однако свидетельства в пользу того или иного способа взаимодействия носят лишь косвенный характер. По-видимому, в зависимости от природы линкера, места присоединения метки к олигонуклеотиду, растворителя и т.д., состояния с различной молекулярной геометрией (и видами взаимодействий) реализуются с различной вероятностью. Полученные нами данные по флуоресценции пиренового бифлуорофора и его олигонуклеотидных производных позволяют сделать вывод о том, что в данном случае имеет место сильное (препятствующее образованию эксимера) взаимодействие метки с одноцепочечной ДНК, даже если метка и олигонуклеотид не связаны ковалентно, а присутствуют в растворе в концентрации 10^{-6} М. При образовании дуплекса или в присутствии метанола взаимодействие бифлуорофора с ДНК уменьшается и в той или иной степени проявляется эксимерная флуоресценция. Таким образом, гипотеза

авторов работы [9] о решающем вкладе интеркаляции в исчезновение эксимерной флуоресценции пиренового бифлуорофора не подтверждается. Примечательно, что наблюдавшиеся нами пределы колебаний интенсивности флуоресценции пиренового бихромофора в зависимости от взаимодействий с ДНК значительно уступают описанным в литературе [14, 16, 19] перепадам интенсивности эмиссии для одиночного пиренового хромофора.

Пиреновый бифлуорофор на основе кислоты (X) может найти применение в качестве чувствительного к окружению эксимеробразующего зонда при структурно-функциональных исследованиях биомолекул.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы пирен, нитрометан, 1,1'-карбонилдиимидазол (Fluka), пентафторфенол, DCC (Aldrich); остальные реактивы и растворители – отечественного производства квалификации ч. и ч. д. а. Эфират фторида бора ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$)

перед использованием перегоняли. Тетрагидрофуран перегоняли над натрий-бензофенонкетилем и хранили над натрием. За ходом реакций следили с помощью ТСХ. Растворы продуктов реакции в органических растворителях высушивали Na_2SO_4 и упаривали на ротаторном испарителе в вакууме водоструйного насоса при температуре бани 30°C .

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали на приборе Bruker AC-500 в CDCl_3 (внутренний стандарт – примесь CHCl_3 ; приведены химические сдвиги (δ) в м. д. и КССВ в герцах). Масс-спектры получали на приборах Varian MAT-44S (ионизация электронным ударом – ЭУ) и Kratos MS 50 TC (ионизация бомбардировкой ускоренными атомами – БУА). Температуры плавления определяли на нагревательном столике Voetius (не исправлены). Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60 F_{254} (Merck); пятна визуализировали в УФ-свете при 360 нм. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck), размер частиц 40–63 мкм. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Beckman DU-65; величины ϵ приведены в $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Олигонуклеотиды получали на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380B. Целевой модифицированный олигонуклеотид (XIII) выделяли ВЭЖХ на хроматографе Beckman 153. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4.

(E)-1-(2-нитровинил)пирен (III). К раствору 1.416 г (6.15 ммоль) 1-формилпирена (II) [22] и 0.95 г (12.3 ммоль) ацетата аммония в 25 мл безводной уксусной кислоты прибавили 1.00 мл (18.4 ммоль) нитрометана и смесь кипятили с обратным холодильником, следя за превращением вещества (II) с R_f 0.30 в продукт реакции (III) с R_f 0.45 в бензоле. Через 3.5 ч реакционную массу охладили, разбавили водой (100 мл), выпавший осадок отфильтровали, промыли водой и высушили. Фильтрат проэкстрагировали CH_2Cl_2 (2 × 25 мл), экстракт промыли водой (2 × 50 мл), высушили, упарили, объединили с осадком и флэш-хроматографировали на силикагеле, элюируя бензолом. Получили 1.125 г (72% в расчете на вступивший в реакцию альдегид (II)) соединения (III) в виде темно-оранжевого порошка; т. пл. $193\text{--}194.5^\circ\text{C}$ (петролейный эфир) (т. пл. $195.5\text{--}196^\circ\text{C}$ [22]), R_f 0.45 (бензол). Масс-спектр (ЭУ), m/z (%): 189 (34), 202 (68), 215 (40), 226 (100), 273 (92); рассчитано 273.29 ($\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{NO}_2$). ^1H -ЯМР: 9.13 (д, 1H, J 13.1, CHNO_2), 8.45–8.00 (м, 9H, AgH), 7.84 (д, 1H, J 13.1, PyrCH).

2-(1-Пиренил)этиламин (IV). Метод А. К суспензии 1.08 г (30 ммоль) NaNH_4 в 50 мл THF при перемешивании и охлаждении на ледяной бане (0°C) в течение 15 мин прикапали 4.2 мл (35 ммоль) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, баню удалили и содержимое колбы перемешивали при 20°C еще 15 мин. Затем прибавили 1.650 г (6.04 ммоль) нитроолефина (III) и кипятили смесь в течение 6 ч. Реакционную массу

охладили на ледяной бане до 0°C и осторожно при перемешивании разложили прибавлением 45 мл 1 н. HCl, разбавили 500 мл воды, проэкстрагировали 100 мл эфира, водный слой подщелочили 50 мл 2 н. NaOH и проэкстрагировали CH_2Cl_2 (3 × 50 мл). Органическую фазу отделили, промыли водой (100 мл), высушили, упарили и остаток хроматографировали на силикагеле (элюент – бензол– $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--Et}_3\text{N}$, 15 : 3 : 2). Выход амина (IV) 920 мг (62%).

Метод Б. К борану, полученному из 97 мг (2.62 ммоль) NaNH_4 и 344 мкл (2.80 ммоль) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ в 10 мл THF (см. метод А), присыпали 170 мг (0.66 ммоль) амида (VII) и кипятили смесь в течение 1.5 ч. Реакционную массу охладили до 0°C и осторожно при перемешивании разложили прибавлением 10 мл 4 н. HCl, после чего кипятили 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры к смеси осторожно прибавили 2.4 г (60 ммоль) растертого в порошок NaOH и перемешивали реакционную массу 5 мин. Органическую фазу отделили, промыли 10 мл насыщенного водного раствора NaCl, высушили, упарили и остаток флэш-хроматографировали на силикагеле (элюент – $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{--MeOH}$, 5 : 1). Получили 146 мг (91%) амина (IV) в виде светло-желтого аморфного порошка, R_f 0.50 (бензол–MeOH–THF, 5 : 5 : 1). Масс-спектр (ЭУ), m/z (%): 189 (65), 201 (12), 215 (100), 230 (32), 245 (52); рассчитано 245.32 ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}$). ^1H -ЯМР: 8.33–7.88 (м, 9H, AgH), 3.71 (т, 2H, J 6.6, CH_2N), 3.60 (т, 2H, J 6.6, PyrCH_2).

Пентафторфениловый эфир 1-пиренилуксусной кислоты (VI). К раствору 1.562 г (6.0 ммоль) 1-пиренилуксусной кислоты (V) [23] в 100 мл смеси EtOAc–диоксан (2 : 1) прибавили раствор 1.158 г (6.29 ммоль) пентафторфенола в 10 мл диоксана, а затем при охлаждении на ледяной бане (0°C) прибавили по каплям раствор 1.287 г (6.24 ммоль) DCC в 10 мл EtOAc в течение 10 мин. Через 2 ч охлаждение убрали и перемешивание продолжили еще 16 ч. Осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровали, фильтрат упарили и флэш-хроматографировали на силикагеле (элюент – бензол–петролейный эфир, 1 : 1). Получили 2.349 г (92%) эфира (VI) в виде желтоватого порошка; т. пл. $177.5\text{--}179^\circ\text{C}$ (бензол–петролейный эфир), R_f 0.31 (бензол–петролейный эфир, 2 : 3). Масс-спектр (ЭУ), m/z (%): 95 (100), 189 (76), 216 (97), 426 (38); рассчитано 425.34 ($\text{C}_{24}\text{H}_{13}\text{F}_5\text{O}_2$). ^1H -ЯМР: 8.27–7.99 (м, 9H, AgH), 4.65 (с, 2H, CH_2).

1-Пиренилацетамид (VII). К раствору 1.600 г (3.76 ммоль) эфира (VI) в 15 мл THF при интенсивном перемешивании прибавили 0.63 мл (9 ммоль) 25% водного раствора NH_3 . Через 5 мин выпавший осадок отфильтровали, промыли 15 мл THF и высушили. Получили 790 мг (82%) продукта реакции в виде белого порошка. Объединенные фильтраты упарили вдвое и оставили на 2 ч при -18°C .

получив дополнительно 80 мг вещества. Фильтрат упарили и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – CH_2Cl_2 -ТНФ, 1 : 1). Суммарный выход амида (VII) 940 мг (96%); т. пл. 248–250°C (ТНФ) (т. пл. 246–247°C [30]), R_f 0.20 (бензол-ТНФ, 1 : 1). Масс-спектр (ЭУ), m/z (%): 189 (68), 215 (100), 259 (99); рассчитано 259.30 ($\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{NO}$). ^1H -ЯМР: 8.25–7.95 (м, 9H, ArH), 5.26 (уш. д, 2H, NH_2), 4.34 (с, 2H, CH_2).

N-[2-(1-Пиренил)этил]-1-пиренилацетамид (VIII). К раствору 470 мг (1.92 ммоль) амина (IV) в 25 мл смеси пиридин-эфир (1 : 1) при интенсивном перемешивании прибавили 820 мг (1.93 ммоль) эфира (VI). Через 15 мин образовавшийся осадок отфильтровали, промыли 20 мл эфира и высушили. Получили 750 мг (80%) амида (VIII) в виде белого порошка. Объединенные фильтраты упарили и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – CH_2Cl_2), получив дополнительно 160 мг амида (VIII). Суммарный выход 910 мг (97%); т. пл. 254–255°C (бензол- CH_2Cl_2), R_f 0.38 (бензол- EtOAc , 1 : 1). Масс-спектр (БУА), m/z : 487 ($[M + H]^+$), рассчитано 487.60 ($\text{C}_{36}\text{H}_{25}\text{NO}$). ^1H -ЯМР: 8.25–7.05 (м, 18H, ArH), 5.18 (уш. т, 1H, NH), 4.25 (с, 2H, CH_2CO), 3.63 (к, 2H, J 6.6, CH_2N), 3.30 (т, 2H, J 6.6, $\text{PygCH}_2\text{CH}_2$).

Бис[2-(1-пиренил)этил]амин (IX). К суспензии 230 мг (6.15 ммоль) NaNH_4 в 25 мл ТНФ при 0°C и перемешивании в течение 15 мин прибавили по каплям 760 мкл (6.20 ммоль) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, баню удалили и содержимое колбы перемешивали при комнатной температуре еще 15 мин. Затем прибавили 600 мг (1.23 ммоль) амида (VIII) и кипятили смесь 1 ч. Реакционную массу охладили до 0°C и осторожно при перемешивании разложили добавлением 15 мл 4 н. HCl , после чего кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры к смеси осторожно присыпали 3.5 г (87.5 ммоль) растертого в порошок NaOH и перемешивали реакционную массу 5 мин. Органическую фазу отделили, промыли 20 мл насыщенного водного раствора NaCl , высушили, упарили и остаток флэш-хроматографировали на силикагеле (элюент – CH_2Cl_2 - EtOAc , 4 : 1). Получили 554 мг (95%) амина (IX) в виде светло-желтого порошка; т. пл. 133–134°C (бензол-ТНФ), R_f 0.24 (CH_2Cl_2 - MeOH , 19 : 1). Масс-спектр (БУА), m/z : 474 ($[M + H]^+$), рассчитано 473.62 ($\text{C}_{36}\text{H}_{27}\text{N}$). ^1H -ЯМР: 8.28–7.73 (м, 18H, ArH), 3.55 (т, 4H, J 6.5, CH_2N), 3.21 (т, 4H, J 6.5, PygCH_2).

N,N-Бис[2-(1-пиренил)этил]амид янтарной кислоты (X). К раствору 450 мг (0.95 ммоль) амина (IX) в 25 мл ТНФ прибавили 114 мг (1.14 ммоль) янтарного ангидрида и перемешивали 1.5–2 ч. Реакционную смесь упарили, остаток перекристаллизовали из смеси ТНФ-бензол (1 : 2); получили 420 мг (78%) соединения (X) в виде белого порошка. Фильтрат упарили, остаток хроматографиро-

вали на колонке с силикагелем (элюент – CH_2Cl_2 - EtOAc , 5 : 2), выделив дополнительно 114 мг вещества. Суммарный выход 534 мг (98%); т. пл. 203–204°C (ТНФ-бензол), R_f 0.31 (CH_2Cl_2 - MeOH , 19 : 1). Масс-спектр (БУА), m/z : 574 ($[M + H]^+$), 556 ($[M + H - \text{H}_2\text{O}]^+$), рассчитано 573.69 ($\text{C}_{40}\text{H}_{31}\text{NO}_3$). ^1H -ЯМР: 8.36–7.60 (м, 18H, ArH), 3.84 (т, 2H, J 7.1, CH_2N), 3.64 (т, 2H, J 7.1, PygCH_2), 3.39 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.33 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$).

Пентафторфениловый эфир N,N-бис[2-(1-пиренил)этил]-4-амино-4-оксобутановой кислоты (XI). К раствору 100 мг (0.18 ммоль) кислоты (X) и 35 мг (0.19 ммоль) пентафторфенола в 5 мл ТНФ при 0°C в течение 2 мин прибавили по каплям раствор 76 мг (0.19 ммоль) DCC в 3 мл ТНФ. Через 10 мин охлаждение убрали, перемешивание продолжили еще 5 ч; выпавший осадок N,N'-дициклогексилмочевины отфильтровали и промыли 5 мл ТНФ. Объединенные фильтраты упарили, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент – CH_2Cl_2). Выход эфира (XI) в виде белого порошка 119 мг (92%); т. пл. 162–163°C (гексан- CH_2Cl_2). R_f 0.13 (CH_2Cl_2). Масс-спектр (БУА), m/z : 739 ($[M + H]^+$), рассчитано 739.74 ($\text{C}_{46}\text{H}_{30}\text{F}_5\text{NO}_3$). ^1H -ЯМР: 8.36–7.60 (м, 18H, ArH), 3.86 (т, 2H, J 7.2, CH_2N), 3.64 (т, 2H, J 7.2, PygCH_2), 3.43 (м, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.79 (т, 2H, J 6.8, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_6\text{F}_5$), 2.37 (т, 2H, J 6.8, CH_2CON).

Флуоресцентно меченный олигонуклеотид (XIII). N,P-Защищенный олигонуклеотид (XII) синтезировали стандартным амидофосфитным методом в масштабе 0.5 мкмоль на CPG -носителе (Millipore, 500 Å) с удельной нагрузкой 37 мкмоль/г по первому нуклеозидному звену. После удаления 5'-концевой диметокситритильной группы (1% CF_3COOH в CH_2Cl_2) аликвоту носителя с олигонуклеотидом (5.0 мг) обработали в автоматическом режиме раствором 50 мг (0.43 ммоль) 1,1'-карбонилдиимидазола в 1.0 мл MeCN в течение 30 мин, промыли MeCN (2×1.0 мл), затем обработали раствором 23 мг (0.2 ммоль) 1,6-диаминогексана в 1.0 мл MeCN в течение 30 мин и промыли MeCN (3×1.0 мл). Далее в ручном режиме носитель обработали 150 мкл 0.1 М раствора активированного эфира (XI) в ТНФ в течение 16 ч и промыли MeCN (3×1.5 мл). Снятие модифицированного олигонуклеотида с носителя и деблокирование провели обработкой 0.7 мл 25% водного NH_3 в течение 16 ч при 55°C, полученный раствор упарили, остаток переосадили 1.5 мл ацетона из 150 мкл 1 М LiClO_4 , растворили в 1 М LiClO_4 (500 мкл), проэкстрагировали *n*-бутанолом (2×500 мкл), олигонуклеотидный материал осадили ацетоном и целевой конъюгат (XIII) выделили в виде нескольких порций электрофорезом в 20% ПААГ или обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке SOTA C18E (4.5×220 мм; сорбент 5 мкм) в градиенте MeCN (5 → 40%) в 0.1 М NH_4OAc . Для аналитической

ВЭЖХ (рис. 1) использовали ту же колонку; буфер А: 5% MeCN в 0.1 М NH₄OAc, буфер Б: 5% 0.1 М NH₄OAc в MeCN.

Дуплекс (XV). Комплементарный модифицированному олигонуклеотид (XIV) был очищен электрофорезом в 20% ПААГ. Эквимольные количества олигонуклеотидов (XIII) и (XIV) в воде (2.5×10^{-6} М каждый) выдерживали 5 мин при 95°C, затем в течение 1 ч охлаждали до 20°C и разбавляли водой до концентрации 10^{-6} М.

Авторы выражают благодарность Д.В. Дементевой и Э.В. Бочарову (ИБХ РАН) за регистрацию ЯМР-спектров, Ю.П. Козьмину и А.В. Сулиме (ИБХ РАН) за регистрацию масс-спектров.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 94-03-08828).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989.
2. Haugland R.P. // Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes; Eugene, OR, 1992–1994.
3. Бараишков Н.Н., Сахно Т.В., Нурмухаметов Р.Н., Хахель О.А. // Успехи химии. 1993. Т. 62. С. 579–593.
4. Векшин Н.Л. // Итоги науки и техники. Сер. Радиационная химия. Фотохимия. 1989. Т. 7.
5. Cho N., Asher S.A. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 6349–6356.
6. Wolfe A., Shimer G.H., Jr., Meehan T. // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 6392–6396.
7. Geacintov N.E., Prusik T., Khosroffian J.M. // J. Am. Chem. Soc. 1976. V. 98. P. 6444–6452.
8. Bair K.W., Tuttle R.L., Knick V.C., Cory M., McKee D.D. // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 2385–2393.
9. Kitamura M., Nimura A., Yamana K., Shimidzu T. // Nucl. Acids Symp. Ser. № 25. 1991. P. 67–68.
10. Lee H., Hinz M., Stezowski J.J., Harvey R.G. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. P. 6773–6776.
11. Lee H., Luna E., Hinz M., Stezowski J.J., Kiselyov A.S., Harvey R.G. // J. Org. Chem. 1995. V. 60. P. 5604–5613.
12. Zou Y., Liu T.-M., Geacintov N.E., Van Houten B. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 13582–13593.
13. Eriksson M., Kim S.K., Sen S., Gräslund A., Jernström B., Nordén B. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 1639–1644.
14. Koenig P., Reines S.A., Cantor C.R. // Biopolymers. 1977. V. 16. P. 2231–2242.
15. Telser J., Cruickshank K.A., Morrison L.E., Netzel T.L. // J. Am. Chem. Soc. 1989. V. 111. P. 6966–6976.
16. Yamana K., Gokota T., Ozaki H., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T. // Nucleosides Nucleotides. 1992. V. 11. P. 383–390.
17. Mann J.S., Shibata Y., Meehan T. // Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. P. 554–558.
18. Korshun V.A., Pestov N.B., Birikh K.R., Berlin Yu.A. // Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. P. 559–562.
19. Kierzek R., Li Y., Turner D.H., Bevilacqua P.C. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 4985–4992.
20. Li Y., Bevilacqua P.C., Mathews D., Turner D.H. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 14394–14399.
21. Tong G., Lawlor J.M., Tregear G.W., Haralambidis J. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 12151–12158.
22. Marcus E., Fitzpatrick J.T. // J. Org. Chem. 1959. V. 24. P. 1031–1032.
23. Deck L.M., Daub G.H. // J. Org. Chem. 1983. V. 48. P. 3577–3580.
24. Whaley W.M., Meadow M., Robinson C.N. // J. Org. Chem. 1954. V. 19. P. 973–977.
25. Bograchov E. // J. Am. Chem. Soc. 1944. V. 66. P. 1612.
26. Mourad M.S., Varma R.S., Kabalka G.W. // J. Org. Chem. 1985. V. 50. P. 133–135.
27. Kabalka G.W., Guindi L.H.M., Varma R.S. // Tetrahedron. 1990. V. 46. P. 7443–7457.
28. Kisfaludy L., Schön I. // Synthesis. 1983. P. 325–327.
29. Wachter L., Jablonski J.-A., Ramachandran K.L. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 7985–7994.
30. Bahmann W.E., Carmack M. // J. Am. Chem. Soc. 1941. V. 63. P. 2494–2499.

Derivative of the Pyrene Dichromophore with Excimer Fluorescence

K. V. Balakin*, V. A. Korshun*, I. A. Prokhorenko*, G. V. Maleev*, I. A. Kudelina*, S. V. Gontarev**, and Yu. A. Berlin*

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia

**Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health, ul. K. Zetkin 4, Minsk, 220050 Belarus

Abstract—*N*-[2-(1-pyrenyl)ethyl]-1-pyrenylacetamide, bis[2-(1-pyrenyl)ethyl]amine, and *N,N*-bis[2-(1-pyrenyl)ethyl]succinamide were synthesized from 1-pyrenylacetic acid. These compounds contain adjacent pyrene residues and display excimer fluorescence. The latter compound, as a pentafluorophenyl ester, was used to prepare fluorescently labeled oligodeoxyribonucleotide (5')CAGGAAACAGCTATGAC. For *N,N*-bis[2-(1-pyrenyl)ethyl]succinamide, the excimer-to-monomer fluorescence ratio and intensity of fluorescence in water-methanol solutions changed in the presence of single-stranded and double-stranded oligonucleotides, upon attachment to an oligonucleotide, and upon hybridization of the resulting conjugate with the complementary nucleotide sequence.

Key words: modified oligonucleotides, pyrene chromophore, excimeric fluorescence.