



УДК 577.113.6.547.037

МЕТОД СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, МЕЧЕННЫХ ПИРЕНОМ

© 1998 г. К. В. Балакин, А. Д. Малахов, В. А. Коршун, Ю. А. Берлин[#]*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступило в редакцию 31.12.97 г. Принято к печати 14.01.98 г.

На основе 4-(1-пиренил)-1,3-бутандиола получены новые модифицирующие реагенты, использованные для синтеза меченных пиреном олигонуклеотидов.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды, пиреновый флуорофор.

Использование производных пирена в качестве флуоресцентной метки дает возможность регистрировать взаимодействия меченных таким образом соединений по изменению в спектре эмиссии, поскольку пиреновый флуорофор обладает значительным временем жизни возбужденного состояния [1] и поэтому чувствителен к присутствию тушителей. От микроокружения сильно зависит и легкость образования эксимера [2].

Изменение интенсивности флуоресценции и других характеристик спектра эмиссии пирена при образовании конъюгатов с олигонуклеотидами нашло применение для регистрации гибридизации нуклеиновых кислот в растворе [3–11] и изучения взаимодействия РНК с ферментом [12]. Пирен использовался также для сенсбилизации комплементарно-адресованной модификации ДНК ариламидами [13–15].

Наиболее простой путь синтеза пиренсодержащих олигонуклеотидных конъюгатов связан с использованием ненуклеотидных амидофосфитных реагентов в автоматическом синтезаторе. Известно несколько подобных реагентов [4, 11, 16–22], однако все они обладают различными недостатками (сложность синтеза или структурное несоответствие нуклеозидам).

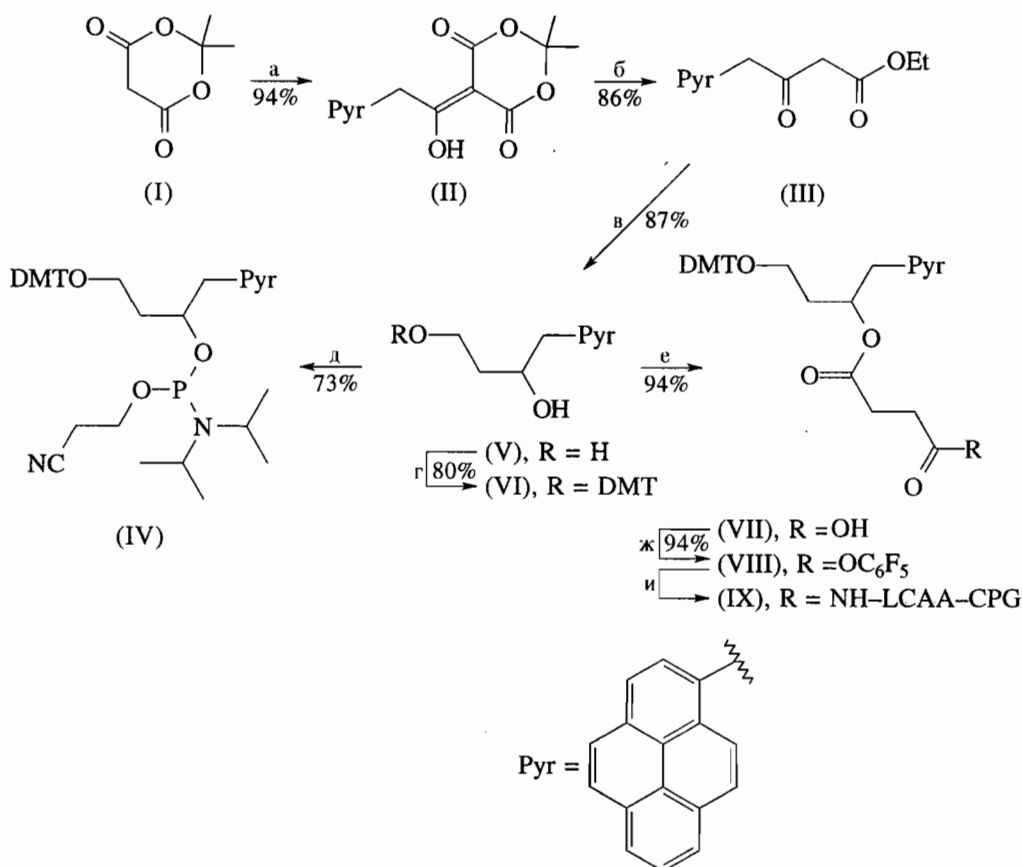
Мы разработали новые модифицирующие реагенты, позволяющие легко получать олигонуклеотиды, содержащие любое число пиреновых остатков в заданных положениях. Синтез реагентов представлен на схеме.

Пентафторфениловый эфир 1-пиренилуксусной кислоты [10] был использован для ацилирования изопропилиденмалоната (кислоты Мельдрума) (I) в синтезе β-кетозэфиров по методу Йонемичу [23] с образованием трикарбонильного соединения (II) (т.пл. 95–96°C). Этаноллиз енола (II) в присутствии трифторуксусной кислоты привел к β-кетозефиру (III) (индивидуальная кетоформа с т.пл. 83–84°C). Восстановление последнего в системе NaBH₄/THF/MeOH [24] дало рацемический 4-(1-пиренил)-1,3-бутандиол (V) с т.пл. 80–81°C. В этом веществе первичная и вторичная гидроксильные группы, соединенные цепочкой из трех атомов углерода, моделируют 5'- и 3'-гидроксилы природных нуклеозидов. Из псевдонуклеозида (V) были получены реагенты для амидофосфитного синтеза с помощью методов, используемых для нуклеозидов [25]. Диметокситриптирование первичного гидроксила привело к ключевому соединению (VI), из которого фосфитилированием был получен амидофосфит (IV), а при действии янтарного ангидрида – кислота (VII), с использованием которой (через активированный эфир (VIII)) модифицировали носитель для твердофазного олигонуклеотидного синтеза (LCAA-CPG, 500 Å, Pierce). Полученная подложка (IX) делает доступными олигонуклеотиды, содержащие пиреновую метку по 3'-концу, а с помощью реагента (IV) остаток пирена может быть введен в заданное внутреннее положение олигонуклеотида или по его 5'-концу. По эффективности конденсации в автоматическом синтезаторе амидофосфит (IV) не уступает обычным нуклеозидным фосфитам.

Амидофосфит (IV) и носитель (IX) были использованы для синтеза серии меченных пиреном олигодезоксирибонуклеотидов (5') ATGTCCAGGATCCCC-(Pm)_n (n = 1–5; Pm – пиреновый псевдонуклеотид). Показано, что форма кривой в спектре флуоресценции конъюгата в водном растворе

Сокращения: DMAP – 4-диметиламинопиридин, DMT – 4,4'-диметокситриптил, LCAA-GPG – аминоалкилированное стекло с определенным размером пор.

[#] Автор для переписки (e-mail: yuber@ibch.siobc.ras.ru).



Реагенты:

- а) $\text{PyrCH}_2\text{CO}_2\text{C}_6\text{F}_5$, Et_3N , THF;
- б) EtOH, TFA;
- в) NaNH_4 , THF, MeOH;
- г) DMTCl, пиридин;
- д) $(\text{Pr}_2\text{N})_2\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, MeCN, тетразолид диизопропиламмония;
- е) $(\text{CH}_2\text{CO})_2\text{O}$, DMAP, пиридин;
- ж) $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$, DCC, EtOAc, пиридин;
- и) LCAA-CPG, Et_3N , CHCl_3 .

ре (5×10^{-7} М) определяется числом пиреновых остатков. При этом у пентапиренилированного олигонуклеотида наблюдалась в основном эксимерная эмиссия, что благодаря сдвигу максимума эмиссии (370–395 нм) в длинноволновую область (около 470 нм) повышает эффективность визуальной детекции.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 97-03-32927а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989.
2. Winnik F.M. // Chem. Rev. 1993. V. 93. P. 587–614.
3. Koenig P., Reines S.A., Cantor C.R. // Biopolymers. 1977. V. 16. P. 2231–2242.
4. Mann J.S., Shibata Y., Meehan T. // Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. P. 554–558.
5. Yamana K., Gokota T., Ozaki H., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T. // Nucleosides Nucleotides. 1992. V. 11. P. 383–390.
6. Ebata K., Masuko M., Ohtani H., Kashiwasake-Jibu M. // Photochem. Photobiol. 1995. V. 62. P. 836–839.
7. Tong G., Lawlor J.M., Tregear G.W., Haralambidis J. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 12151–12158.
8. Li Y., Bevilacqua P.C., Mathews D., Turner D.H. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 14394–14399.
9. Yguerabide J., Talavera E., Alvarez J.M., Afkir M. // Anal. Biochem. 1996. V. 241. P. 238–247.

10. Балакин К.В., Коршун В.А., Прохоренко И.А., Малеев Г.В., Куделина И.А., Гонтарев С.В., Берлин Ю.А. // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. С. 33–41.
11. Yamana K., Takei M., Nakano H. // *Tetrahedron Lett.* 1997. V. 38. P. 6051–6054.
12. Preuss R., Dapprich J., Walter N.G. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. P. 600–613.
13. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Докл. АН*. 1995. Т. 344. С. 122–125.
14. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гуйнутдинов Т.И., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. С. 191–199.
15. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукъянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. С. 553–560.
16. Berlin Y.A., Korshun V.A., Boreskov Y.G. // *Nucleic Acids Symp. Ser.* № 25. 1991. P. 85–86.
17. Korshun V.A., Pestov N.B., Birikh K.R., Berlin Y.A. // *Bioconjugate Chem.* 1992. V. 3. P. 559–562.
18. Burmeister J., Azzawi A., von Kiedrowski G. // *Tetrahedron Lett.* 1995. V. 36. P. 3667–3668.
19. Prokhorenko I.A., Korshun V.A., Petrov A.V., Gontarev S.V., Berlin Y.A. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1995. V. 5. P. 2081–2084.
20. Ren R.X.-F., Chaudhuri N.C., Paris P.L., Rumney S., IV, Kool E.T. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 7671–7678.
21. Chaudhuri N.C., Ren R.X.-F., Kool E.T. // *Synlett.* 1997. P. 341–347.
22. Frazer J.D., Horner S.M., Woski S.A. // *Tetrahedron Lett.* 1998. V. 39. P. 1279–1282.
23. Oikawa Y., Sugano K., Yonemitsu O. // *J. Org. Chem.* 1978. V. 43. P. 2087–2088.
24. Soai K., Oyamada H. // *Synthesis.* 1984. P. 605–607.
25. Caruthers M.H., Barone A.D., Beaucage S.L., Dodds D.R., Fisher E.F., McBride L.J., Matteucci M., Stabinsky Z., Tang J.-Y. // *Meth. Enzymol.* 1987. V. 154. P. 287–313.

A Method of Synthesis of Pyrene-labeled Oligonucleotides

K. V. Balakin, A. D. Malakhov, V. A. Korshun, and Yu. A. Berlin[#]

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

On the basis of 4-(1-pyrenyl)-1,3-butanediol, new modified reagents were obtained and employed in the synthesis of pyrene-labeled oligonucleotides.

Key words: modified oligonucleotides, pyrene fluorophore

[#] To whom correspondence should be addressed (e-mail: yuber@ibch.siobc.ras.ru).