



УДК 577.113.6.

СИНТЕЗ НОВОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ПСЕВДОНУКЛЕОЗИДА НА ОСНОВЕ 9,10-БИСФЕНИЛЭТИНИЛАНТРАЦЕНА И ЕГО ВВЕДЕНИЕ В ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ

© 1999 г. А. Д. Малахов, И. А. Прохоренко, С. В. Кузницова,
М. В. Скоробогатый, 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 30.07.99 г. Принято к печати 25.08.99 г.

Разработан метод функционализации флуоресцентного углеводорода 9,10-бисфенилэтинилантацена с образованием диоксибутильного производного, и на его основе получены амидофосфит и твердофазный носитель, которые использованы в синтезе олигонуклеотидов, содержащих новую для биополимеров флуоресцентную метку.

Ключевые слова: модифицированные олигонуклеотиды; 9,10-бисфенилэтинилантацен.

В последние годы интенсивно разрабатываются методы исследования нуклеиновых кислот и других биополимеров, основанные на резонансном переносе энергии флуоресценции и позволяющие выяснять разнообразные аспекты структуры и функции этих соединений [1–8]. Возможности такого подхода во многом определяются доступным для исследователя набором меток и методов получения на их основе биоконъюгатов. В связи с этим актуальным направлением исследования нуклеиновых кислот является создание новых флуоресцентных красителей и разработка эффективных методов введения флуорофоров в олиго- и полинуклеотиды.

Привлекательные объекты исследования в этой области – полиароматические флуорофоры (наиболее известен среди них тетрациклический углеводород пирен), сочетающие интересные спектральные свойства с высокой химической устойчивостью (в том числе в условиях олигонуклеотидного синтеза), хорошими возможностями функционализации и способностью к многообразным нековалентным взаимодействиям, отражающимся на спектрах. Варьирование спектральных свойств этих флуорофоров, позволяющее расширить возможности их применения, может быть достигнуто путем удлинения системы сопряжения, например, введением в молекулу ароматических заместителей, соединенных с полициклической системой через двойную или

тройную углерод-углеродную связь. Такими заместителями могут служить, например, арилэтильные группы. Известно, что 9,10-бисфенилэтинилантацен и родственные соединения более привлекательны, чем сам антрацен, по спектральным характеристикам, так как они флуоресцируют в интересной для исследования области 465–485 нм и имеют высокий квантовый выход эмиссии [9–11], однако функционализированные производные этого углеводорода, пригодные для ковалентного присоединения к биомолекулам, неизвестны.

Удобный способ получения меченых олигонуклеотидов включает в себя использование синтонов на основе содержащего краситель псевдонуклеозида, которым может быть замещено любое число нуклеозидных звеньев в заданных положениях олигонуклеотида. Для этих целей мы разработали метод синтеза нового псевдонуклеозида и модифицирующих реагентов (амидофосфит и твердофазный носитель) на основе 9,10-бисфенилэтинилантацена (схема).

Исходный 9,10-дибромантрацен (**Ia**) вводили в реакцию Соногаширы [12] последовательно с фенилацетиленом и диметилпропаргиловым спиртом, что привело к ацетонзащищенному производному 9-этинил-10-фенилэтинилантацена (**Ib**). После щелочного деблокирования 9-этинильной группы и сочетания образовавшегося алкина (**Ib**) с 4-(4-иодфенил)-1,3-бутандиолом [13] был получен целевой псевдонуклеозид 9-[4-(2,4-дигидроксибутил)фенилэтинил]-10-фенилэтинилантацен (**II**) (общий выход 25% считая на (**Ia**)). Это вещество содержит первичную и вторичную гидроксиль-

Сокращения: DMAP – 4-диметиламинопиридин; DMG – 4,4'-диметокситритил; LCAA-CPG – аминоалкилированное стекло с контролируемым размером пор.

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

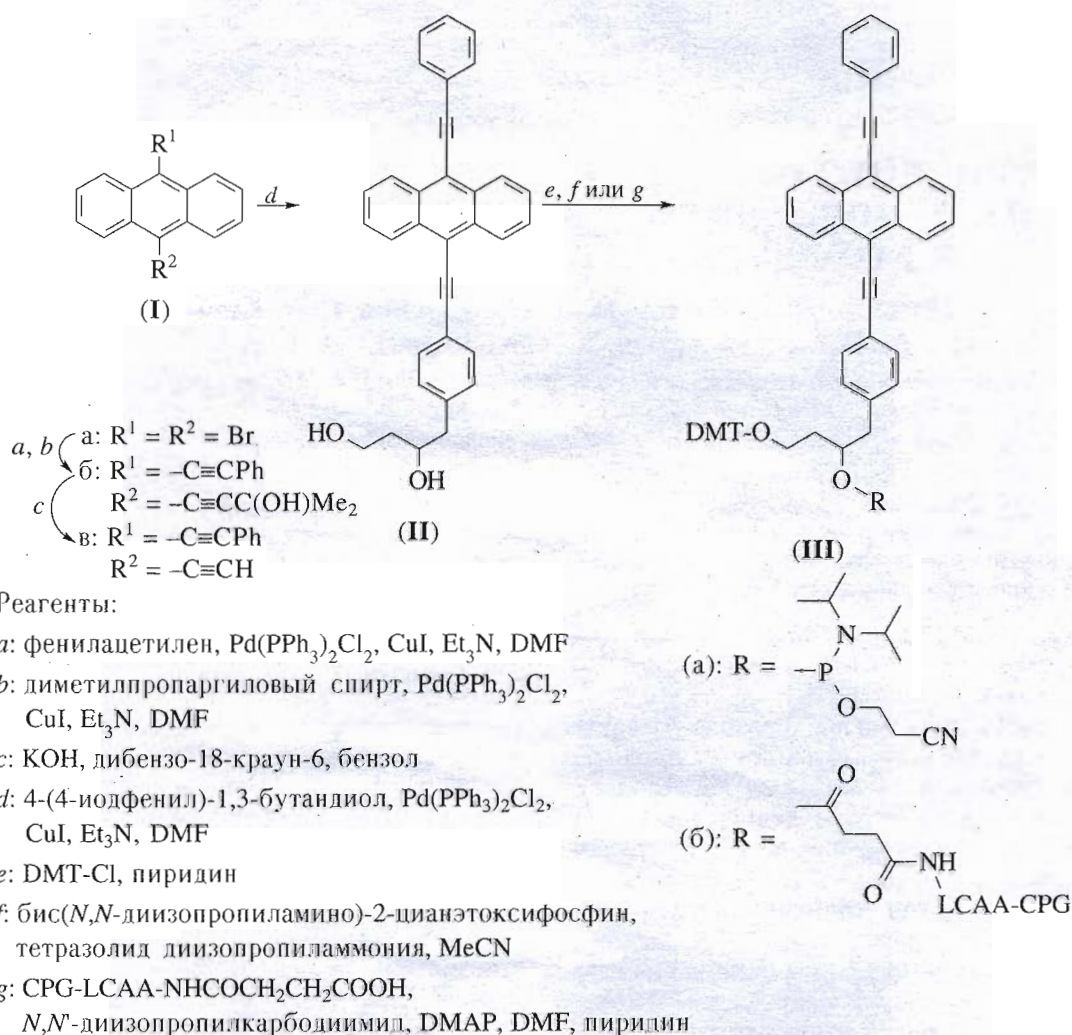


Схема.

ные группы, соединенные цепочкой из трех атомов углерода и структурно соответствующие 3'- и 5'-гидроксилам природных нуклеозидов.

Далее с помощью известных методов химии нуклеозидов [14, 15] псевдонуклеозид (II) был превращен в амидофосфит (IIIa) (выход 60% считая на вещество (II)) и носитель (IIIб) (содержание иммобилизованного звена 35 мкмоль/г). На основе этих модифицирующих реагентов в обычных условиях амидофосфитного синтеза была получена серия олигонуклеотидов, меченных 9,10-бисфенилэтилантраценом (таблица). При этом оказалось, что полученные на основе этого флуорофора амидофосфит и твердофазный носитель по эффективности конденсации в автоматическом синтезаторе не уступают обычным нуклеозидным синтонам.

Флуоресцентные олигонуклеотидные конъюгаты выделяли последовательно электрофорезом в 20% ПААГ и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Инте-

ресно, что терминальное расположение псевдонуклеозидного звена в олигонуклеотиде приводит к значительному возрастанию времени удерживания при обращенно-фазовой ВЭЖХ по сравнению с олигомерами с внутренними модифицированными остатками: так, время удерживания у конъюгата (IV) оказалось большим, чем не только у конъюгата (V), но и у конъюгатов (VI) и (VII).

Спектры флуоресценции полученных бисфенилэтилантраценовых конъюгатов практически не зависят от числа остатков красителя в молекуле (рис. 1) и не изменяются при гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами. Если же в результате образования дуплекса происходит сближение флуорофоров, находящихся в разных олигонуклеотидных цепях, то наиболее интересный эффект наблюдается в случае дуплекса (V) · (VIII), каждая из комплементарных цепей которого содержит по одному флуорофору: при

Олигонуклеотиды, модифицированные бисфенилэтинилантраценовым флуорофором

Номер	Нуклеотидная последовательность*	Время удерживания**, мин
(IV)	(5') ACG AGG AAA GCG TAA X	39.5
(V)	(5') ACG AGG XAA GCG TAA	26.9
(VI)	(5') ACG AGG XXA GCG TAA	32.5, 33.1, 33.6
(VII)	(5') ACG AGG XXX GCG TAA	37.1, 37.7, 38.3
(VIII)	(3') TGC TCC XTT CGC ATT	23.5
(IX)	(3') TGC TCC XXT CGC ATT	30.9

* X – остаток 9,10-бисфенилэтинилантрацена.

** Для аналитической ВЭЖХ использовалась колонка (4.5 × 250 мм) с обращенной фазой C-18 SOTA, линейный градиент (5 → 50%) MeCN в 0.1 M NH₄OAc за 60 мин. Три значения времени удерживания соответствуют различным диастереомерам.

этом происходит сильное тушение флуоресценции и появляется новая широкая полоса в области 530–630 нм (рис. 2, кривая 1), вероятно, связанная с образованием эксимера. Ранее сообщалось о детекции эксимерной эмиссии флуорофоров с наносекундным (как и у производных 9,10-бисфенилэтинилантрацена [10, 11]) временем жизни возбужденного состояния – *транс*-стильбена [16, 17] и перилена [18], присоединенных к нуклеиновым кислотам и сближенных в результате образования комплементарных комплексов. В случае дуплекса (VI) · (IX), где в двух комплементарных цепях противостоят друг другу две пары смежных флуорофоров, эксимерная полоса отсутствует, но в области 450–460 нм появляется небольшой максимум, природа которого пока не ясна (рис. 2,

кривая 2). В то же время флуоресценция дуплекса (VII) · (IX) (рис. 2, кривая 3), отличающегося от дуплекса (VI) · (IX) дополнительным модифицированным звеном в одной из цепей, вообще не отличается от флуоресценции одноцепочечных модифицированных олигонуклеотидов (V), (VI) и (VII) (рис. 1). По-видимому, в дуплексе (V) · (VIII) направленное сближение флуорофоров благоприятно для образования эксимера, тогда как в случае дуплексов (VI) · (IX) и (VII) · (IX) этому препятствуют возрастающие пространственные затруднения.

9,10-Бисфенилэтинилантрацен оказался эффективным акцептором энергии для 1-фенилэтинилпирена: мы обнаружили, что при гибридизации комплементарных последовательностей, содержа-

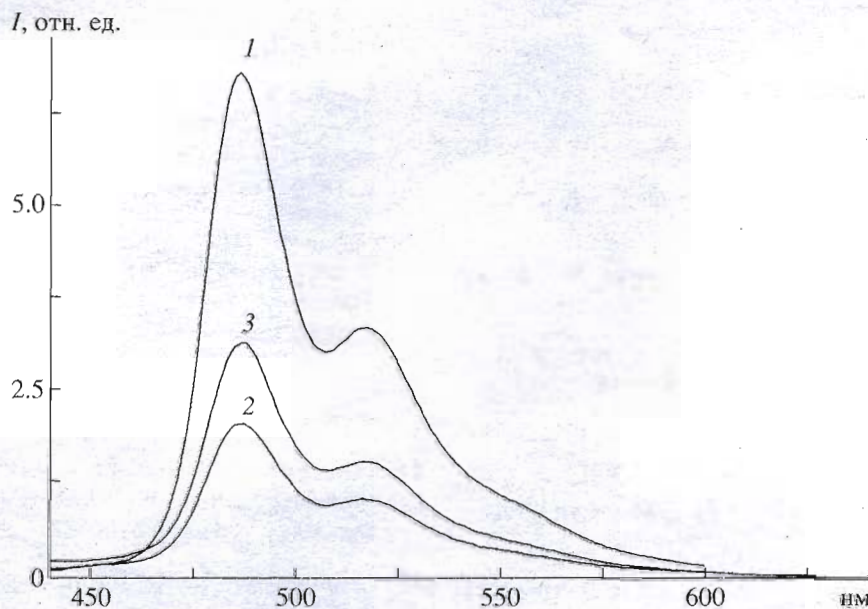


Рис. 1. Спектры флуоресценции модифицированных олигонуклеотидов (V) (1), (VI) (2) и (VII) (3) в буфере 0.1 M NaCl, 0.01 M К-фосфат, рН 7.0; λ_{возб} 430 нм. Концентрация олигонуклеотидов 1 × 10⁻⁷ M.

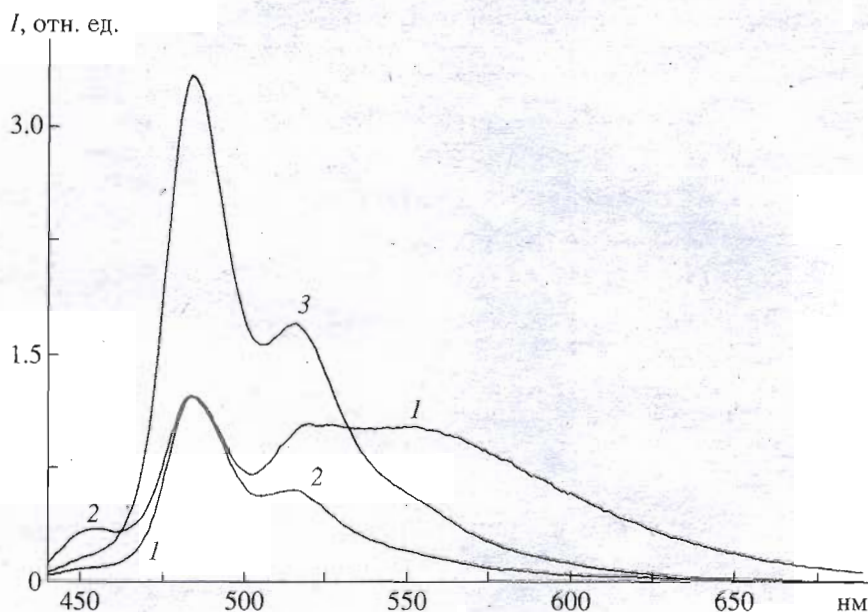


Рис. 2. Спектры флуоресценции дуплексов (V) · (VIII) (1), (VI) · (IX) (2) и (VII) · (IX) (3) в буфере 0.1 М NaCl, 0.01 М К-фосфат, pH 7.0; $\lambda_{\text{возб}}$ 430 нм. Концентрация дуплексов 1×10^{-7} М.

щих остатки 1-фенилэтинилпирена и 9,10-бисфенилэтинилантрацена, наблюдается резонансный перенос энергии флуоресценции и с помощью этой донорно-акцепторной пары можно эффективно детектировать образование комплементарных комплексов и другие элементы высших структур.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Selvin P.R. // *Meth. Enzymol.* 1995. V. 246. P. 300–334.
- Clegg R.M. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995. V. 6. P. 103–110.
- Glazer A.N., Mathies R.A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997. V. 8. P. 94–102.
- Прохоренко И.А., Коршун В.А., Берлин Ю.А. // *Биоорган. химия.* 1999. Т. 25. С. 838–847.
- Tyagi S., Kramer F.R. // *Nature Biotechnol.* 1996. V. 14. P. 303–308.
- Ortiz E., Estrada G., Lizardi P.M. // *Mol. Cell. Probes.* 1998. V. 12. P. 219–226.
- Sokol D.L., Zhang X., Lu P., Gewirtz A.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 11538–11543.
- Chen X., Zehnbauser B., Gnirke A., Kwok P.-Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 10756–10761.
- Haugland R.P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* Sixth Edition. Eugene, OR: Molecular Probes, Inc., 1996.
- Bunker C.E., Sun Y.-P. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 10865–10870.
- Swager T.M., Gil C.J., Wrighton M.S. // *J. Phys. Chem.* 1995. V. 99. P. 4886–4893.
- Sonogashira K. // *Comprehensive Org. Synthesis* / Eds Trost B.M., Fleming I. Oxford, New York: Pergamon Press, 1991. V. 3. P. 521–549.
- Korshun V.A., Prokhorenko I.A., Gontarev S.V., Skorobogatyi M.V., Balakin K.V., Manasova E.V., Malakhov A.D., Berlin Y.A. // *Nucleosides Nucleotides.* 1997. V. 16. P. 1461–1464.
- 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.
- Damha M.J., Giannaris P.A., Zabarylo S.V. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 3813–3821.
- Lewis F.D., Wu T., Burch E.L., Bassani D.M., Yang J.-S., Schneider S., Jager W., Letsinger R.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 8785–8792.
- Letsinger R.L., Wu T. // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. P. 811–812.
- Shimadzu A., Ohtani H., Ohuchi S., Sode K., Masuko M. // *Nucl. Acids Symp. Ser. № 39.* 1998. P. 45–46.

Synthesis of a New Fluorescent 9,10-Bisphenylethynylanthracene-derived Pseudonucleoside and Its Introduction into Oligonucleotides

A. D. Malakhov, I. A. Prokhorenko, S. V. Kuznitsova,
M. V. Skorobogatyĭ, V. A. Korshun, and Yu. A. Berlin[#]

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

The functionalization of the fluorescent hydrocarbon 9,10-bisphenylethynylanthracene to afford its dihydroxybutyl derivative was developed. Based on this pseudonucleoside, the phosphoramidite and a solid-phase carrier were obtained and used for the preparation of oligonucleotides containing a new fluorescent label for biopolymers.

Key words: 9,10-bisphenylethynylanthracene, modified oligonucleotides

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