



УДК 577.113.6

5-(1-ПИРЕНИЛЭТИНИЛ)-2'-ДЕЗОКСИУРИДИН, НОВОЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЕ НУКЛЕОЗИДНОЕ ПРОИЗВОДНОЕ

© 1996 г. В. А. Коршун, Е. В. Манасова, К. В. Балакин, И. А. Прохоренко,
А. Г. Бучацкий, Ю. А. Берлин[#]

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

Поступила в редакцию 02.07.96 г.

Новый флуоресцентный нуклеозид, 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксисуридин, содержащий остаток пиренового флуорофора, π -сопряженного с нуклеиновым основанием через тройную связь, синтезирован с помощью реакции Хека и охарактеризован спектрами флуоресценции.

Ключевые слова: модифицированные нуклеозиды, пиреновый флуорофор.

Получение флуоресцентно модифицированных нуклеиновых кислот имеет целью не только очевидную и едва ли не доминирующую уже альтернативу радиоактивного мечения, но и расширение возможностей структурно-функциональных исследований этого класса биополимеров благодаря использованию тонких спектральных эффектов, проявляющихся при внутри- и межмолекулярных взаимодействиях. В настоящее время существует множество методов присоединения флуоресцентных красителей к нуклеозидам, нуклеотидам и олигонуклеотидам [1–3]. Взаимодействие флуорофора с гетероциклическим основанием в составе нуклеозида может вызывать значительное уменьшение квантового выхода флуоресценции, что было показано на примере производных пирена [4]. Поэтому, стремясь уменьшить такое взаимодействие, флуорофор обычно присоединяют при помощи довольно длинного спейсера, разобщающего обе группировки и их системы электронов. В то же время с точки зрения изучения спектральных свойств значительный интерес представляют модифицированные нуклеозиды, в которых нуклеиновое основание π -сопряжено с флуорофором, – в этом случае ароматическая система гетероцикла становится составной частью флуоресцентного красителя, что приводит к дополнительным спектральным эффектам. Примеров синтеза подобных соединений известно совсем немного, причем в качестве флуоресцентной метки, как и в работе [4], использовался пирен [5, 6].

Известно, что введение 1-алкин-1-ильной группы в положение 5 пиримидинового нуклеозида не нарушает субстратных свойств dUTP в полимеразной реакции [7, 8] и даже способно увеличи-

вать стабильность комплексов нуклеиновых кислот [9–14]. В то же время тройная связь пригодна также для сопряжения π -электронных систем флуорофора и нуклеинового основания. Нашей целью являлся синтез таких π -сопряженных флуоресцентных производных нуклеозидов, пригодных для введения в олигонуклеотиды.

Для этого мы использовали реакцию сочетания алкинов с арилгалогенидами по Хеку в присутствии Pd(0) [15–17] в условиях, адаптированных к нуклеозидам [18–21]. Взаимодействие 5-иод-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксисуридина (I) [19] и 1-этинилпирена (II) [22] в этих условиях привело к соединению (III) с выходом 83% (схема). В результате дезацилирования этого диацетата действием водного аммиака был получен с выходом, близким к количественному, флуоресцентно модифицированный нуклеозид – 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксисуридин (IV).

Оказалось, что присоединение этинильной и нуклеозидэтинильной группы к пирену вызывает значительный батохромный сдвиг максимумов поглощения и увеличение их интенсивности (рисунков а). Интересно, что в случае 5-(1-пиренил)-2'-дезоксисуридина [6] положение пиренового максимума поглощения практически не изменяется, а величина ϵ уменьшается в несколько раз.

Способность к флуоресценции у пиренового остатка в составе нуклеозида (IV) сохраняется. Из рисунка б видно, что вещество (IV) в диоксане (кривая 2) флуоресцирует более чем на порядок интенсивнее, чем в метаноле (кривая 1), причем спектр флуоресценции метанольного раствора несколько более структурирован. Положение коротковолнового максимума флуоресценции (400 нм) не зависит от растворителя и сдвинуто в красную область по сравнению с положением соответствующего

[#] Автор для переписки.

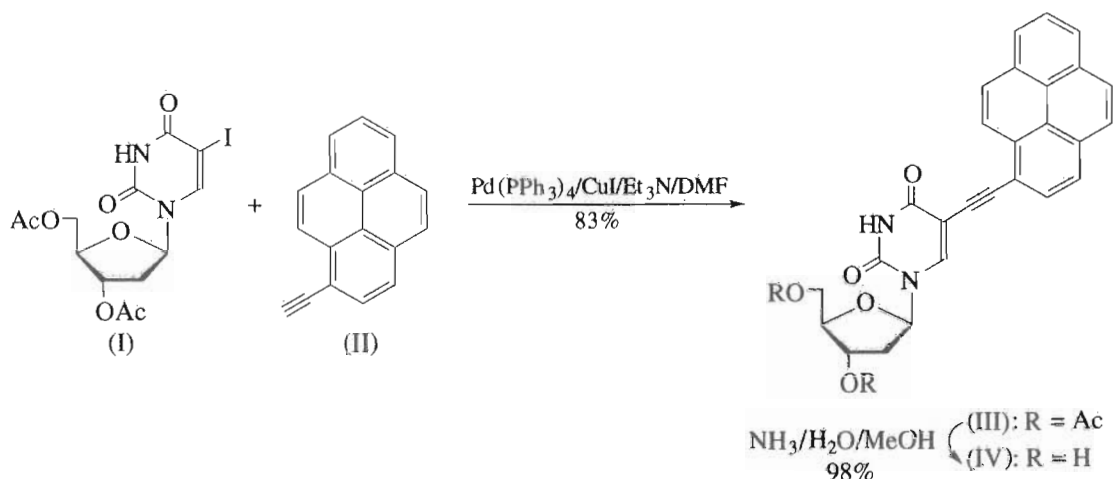


Схема.

максимума пирена вблизи 370 нм [23], что меньше сдвига длинноволнового максимума поглощения (335 → 392 нм).

Модифицированный нуклеозид (IV) может быть введен в состав олигонуклеотидов и использован в качестве флуоресцентной метки с потенциальной зависимостью спектра флуоресценции от микроокружения, в том числе от комплементарного взаимодействия нуклеиновых кислот.

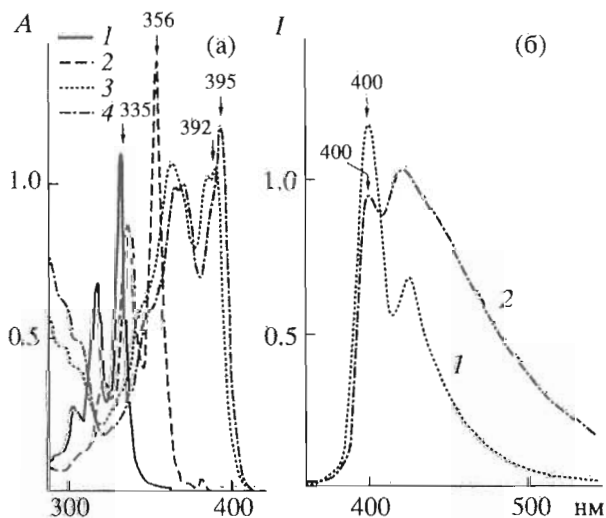
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы пирен, CuI, Pd(PPh₃)₄ (Aldrich); остальные реактивы и растворители –

отечественного производства квалификации ч. и ч. д. а. 3',5'-Ди-О-ацетил-5-йод-2'-дезоксисуридин [19] и 1-этинилпирен [22] синтезировали как описано в литературе.

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker AC-500 (шкала δ, внутренний стандарт – примесь протонов в дейтерированных растворителях; приведены КССВ в герцах). Масс-спектры получены на приборе Kratos MS 50 TC (ионизация бомбардировкой ускоренными атомами). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Beckman DU-65. Температуры плавления определяли на нагревательном столике Voetius (не исправлены). Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck); визуализацию пятен проводили в УФ-свете при 360 нм. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck), размер частиц 40–63 мкм. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi MPF-4.

5-(1-Пиренилэтинил)-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксисуридин (III). К раствору 4.382 г (10.0 ммоль) 5-йод-3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксисуридина (I), 2.489 г (11.0 ммоль) 1-этинилпирена (II) и 2.8 мл (20 ммоль) триэтиламина в DMF (25 мл) в атмосфере аргона последовательно прибавили 0.19 г (1.0 ммоль) CuI и 0.57 г (0.49 ммоль) Pd(PPh₃)₄ и реакционную массу перемешивали 2 ч при 60°C. Затем смесь разбавили 200 мл метилхлорида, промыли водой (5 × 300 мл), 3% водным раствором EDTA (2 × 200 мл) и снова водой (300 мл), высушили Na₂SO₄, упарили досуха и остаток хроматографировали на колонке (4.5 × 10 см) с силикагелем, используя в качестве элюента смесь CH₂Cl₂-эфир, 1 : 1. Выход нуклеозида (III) 4.452 г (83%), R_f 0.76 (CH₂Cl₂-MeOH, 9 : 1), т. пл. 130–132°C (этилацетат). Масс-спектр: (m/z)⁺ 536, рассчитано 536.54 (C₃₁H₂₄N₂O₇). ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃): 8.71–8.01 (м, 10H, ArH (пиримидиновый Н-6, с, 8.04)), 6.39 (дд, 1H, J_{1',2'α} 5.6, J_{1',2'β} 7.8, Н-1'),



Спектральные характеристики полученных соединений. (а) – УФ-спектры пирена (1), 1-этинилпирена (II) (2), нуклеозида (IV) (3) в MeOH, нуклеозида (IV) в диоксане (4); концентрации 2.5×10^{-5} М, $l = 1$ см. (б) – спектры флуоресценции нуклеозида (IV) в MeOH (1) и в диоксане (2) (уменьшено в 10 раз по оси интенсивности); концентрации 2.5×10^{-6} М; $\lambda_{\text{возб}}$ 340 нм, ϵ_{340} 18600 (MeOH), 13700 (диоксан).

5.30 (м, 1H, H-3'), 4.45 (д, 2H, $J_{4,5}$ 3.1, H-5'), 4.35 (м, 1H, H-4'), 2.62 (ддд, 1H, $^2J_{2\alpha,2\beta}$ 14.0, $J_{1,2\alpha}$ 5.6, $J_{2\alpha,3}$ 2.2, H-2'α), 2.30 (м, 1H, H-2'β), 2.21 (с, 3H, CH₃), 2.14 (с, 3H, CH₃).

5-(1-Пиренилэтинил)-2'-дезоксуридин (IV). К раствору 268 мг (0.5 ммоль) диацетата (III) в 10 мл MeOH прибавили 25% водн. NH₃ (3.0 мл), реакционную смесь оставили при 20°C на 20 ч и упарили досуха, остаток суспендировали в воде (10 мл), отфильтровали, промыли на фильтре водой и высушили в вакууме над P₄O₁₀. Выход 221 мг (98%), R_f 0.44 (CH₂Cl₂-MeOH, 9 : 1). После перекристаллизации из смеси 2-пропанол-диоксан-вода (4 : 1 : 1) т. разл. >350°C. УФ-спектр (MeOH): λ_{\max} 365, 389, 392 нм (ϵ 42900, 41100, 42200). Масс-спектр: (m/z)⁺ 453, рассчитано 452.47 (C₂₇H₂₀N₂O₅). ¹H-ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆): 11.74 (уш, с, 1H, NH), 8.63–8.04 (м, 10H, ArH (пиримидиновый H-6, с, 8.54)), 6.16 (кажущийся т, 1H, $J_{1,2\alpha} = J_{1,2\beta}$ 6.3, H-1'), 5.24 (д, 1H, J 3.9, 3'-OH), 5.21 (т, 1H, J 4.8, 5'-OH), 4.29 (м, 1H, H-3'), 3.83 (м, 1H, H-4'), 3.74–3.59 (м, 2H, H-5'), 2.28–2.16 (м, 2H, H-2').

Авторы благодарны И.А. Куделиной за регистрацию спектров флуоресценции. Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (грант 94-03-08828).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goodchild J. // Bioconjugate Chem. 1990. V. 1. P. 165–187.
2. Veaucauge S.L., Iyer R.P. // Tetrahedron. 1993. V. 49. P. 1925–1963.
3. Коршун В.А., Берлин Ю.А. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 565–616.
4. Yamana K., Gokota T., Ozaki H., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T. // Nucleosides Nucleotides. 1992. V. 11. P. 383–390.
5. Saito I., Ito S., Shinmura T., Matsuura T. // Tetrahedron Lett. 1980. V. 21. P. 2813–2816.
6. Netzel T.L., Zhao M., Nafisi K., Headrick J., Sigman M.S., Eaton B.E. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 9119–9128.
7. Confalone P.N. // J. Heterocycl. Chem. 1990. V. 27. P. 31–46.
8. Ötvös L., Szécsi J., Sági J., Kovács T. // Nucl. Acids Symp. Ser. No. 18, 1987. P. 125–129.
9. Biala E., Jones A.S., Walker R.T. // Tetrahedron. 1980. V. 36. P. 155–158.
10. Froehler B.C., Wadwani S., Terhorst T.J., Gerrard S.R. // Tetrahedron Lett. 1992. V. 33. P. 5307–5310.
11. Sági J., Szemző A., Ébinger K., Szabolcs A., Sági G., Ruff É., Ötvös L. // Tetrahedron Lett. 1993. V. 34. P. 2191–2194.
12. Wagner R.W., Matteucci M.D., Lewis J.G., Gutierrez A.J., Moulds C., Froehler B.C. // Science. 1993. V. 260. P. 1510–1513.
13. Colocci N., Dervan P.B. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 785–786.
14. Moulds C., Lewis J.G., Froehler B.C., Grant D., Huang T., Milligan J.F., Matteucci M.D., Wagner R.W. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 5044–5053.
15. Dieck H.A., Heck F.R. // J. Organometal. Chem. 1975. V. 93. P. 259–263.
16. Cassar L. // J. Organometal. Chem. 1975. V. 93. P. 253–257.
17. Sonogashira K., Tohda Y., Hagihara N. // Tetrahedron Lett. 1975. P. 4467–4470.
18. Robins M.J., Barr P.J. // Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. P. 421–424.
19. Robins M.J., Barr P.J. // J. Org. Chem. 1983. V. 48. P. 1854–1862.
20. Hobbs F.W., Jr. // J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 3420–3422.
21. Robins M.J., Vinayak R.S., Wood S.G. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. P. 3731–3734.
22. Gan L.-S.L., Acebo A.L., Alworth W.L. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 3827–3836.
23. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. М.: Наука, 1989. С. 74.

5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-Deoxyuridine, a Novel Fluorescent Nucleoside Analogue

V. A. Korshun, E. V. Manasova, K. V. Balakin, I. A. Prokhorenko,
A. G. Buchatskii, and Yu. A. Berlin

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

Abstract—5-(1-pyrenylethynyl)-2'-deoxyuridine, a novel fluorescent nucleoside containing a pyrene fluorophore π -conjugated with the nucleic base through a carbon-carbon triple bond, was synthesized by means of the Heck coupling and characterized by fluorescence spectra.

Key words: pyrene fluorophore.