



УДК 577.113.6

СИНТЕЗ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА 5-(1-ПИРЕНИЛЭТИНИЛ)-2'-ДЕЗОКСИУРИДИНСОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ*

© 2000 г. А. Д. Малахов, Е. В. Малахова, С. В. Кузницова, И. В. Гречишникова,
И. А. Прохоренко, 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

Поступила в редакцию 25.06.99 г. Принята к печати 05.07.99 г.

Получены новые реагенты для флуоресцентного мечения олиго- и полинуклеотидов – 3'-амидофосфит 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридина и твердофазный носитель, несущий этот же нуклеозид. Синтезированы олигонуклеотиды, содержащие одно или несколько модифицированных звеньев, и показано, что флуоресценция этих зондов изменяется при гибридизации с комплементарной последовательностью.

Ключевые слова: 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридин; модифицированные олигонуклеотиды; гибридизация; флуоресцентная детекция.

За последние годы были разработаны методы исследования и гомогенного анализа нуклеиновых кислот, основанные на внутри- и межмолекулярном взаимодействии флуорофоров. Применение таких методов охватывает изучение структуры и физико-химических свойств комплексов нуклеиновых кислот с помощью переноса энергии флуоресценции (см. обзор [3]), детекцию специфических нуклеотидных последовательностей на основе молекулярных маяков [4–9] или переноса энергии [10–14], секвенирование нуклеиновых кислот с использованием праймеров, меченных донорно-акцепторной парой красителей [15–20], детекцию гибридизации нуклеиновых кислот по изменению соотношения эксимерной и мономерной флуоресценции пиреновых меток [21–33]. В связи с этим разработка новых способов сайт-специфического введения флуоресцентных меток в олиго- и полинуклеотиды становится все более актуальной проблемой. Пиреновый флуорофор представляет особый интерес, поскольку даже в виде одиночной метки он может быть использован для детекции различных взаимодействий с участием нуклеиновых кислот [34–42]. В данном сообщении мы описываем региоспецифическое введение

в олигонуклеотиды остатков флуоресцентного нуклеозида 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридина (VI), синтезированного нами ранее [1], и спектральные свойства полученных конъюгатов.

Промежуточным веществом в синтезе модифицированного нуклеозида (VI) являлся 1-этинилпирен (III) [1], для получения которого был известен ряд методов, однако они не удовлетворяли нас из-за сложности процедуры [43, 44], невысокого выхода конечного вещества и трудности очистки исходного 1-бромпирена [45, 46]. Поэтому мы разработали иной подход к синтезу этинилпирена (III), положив в основу двухстадийный метод Бодендорфа, предназначенный для мягкого превращения ацетиларенов в этиниларены [47–50] (схема 1). 1-Ацетилпирен (I), полученный с высоким выходом ацилированием пирена по Фриделю–Крафтсу [51], был превращен действием реагента Вильсмайера (POCl₃/DMF) в 3-(1-пиренил)-3-хлор-2-пропеналь в виде смеси Z- (IIa) и E- (IIб) изомеров. На этой стадии в качестве примеси был выделен и идентифицирован 1-(1-хлорвинил)пирен (IV).

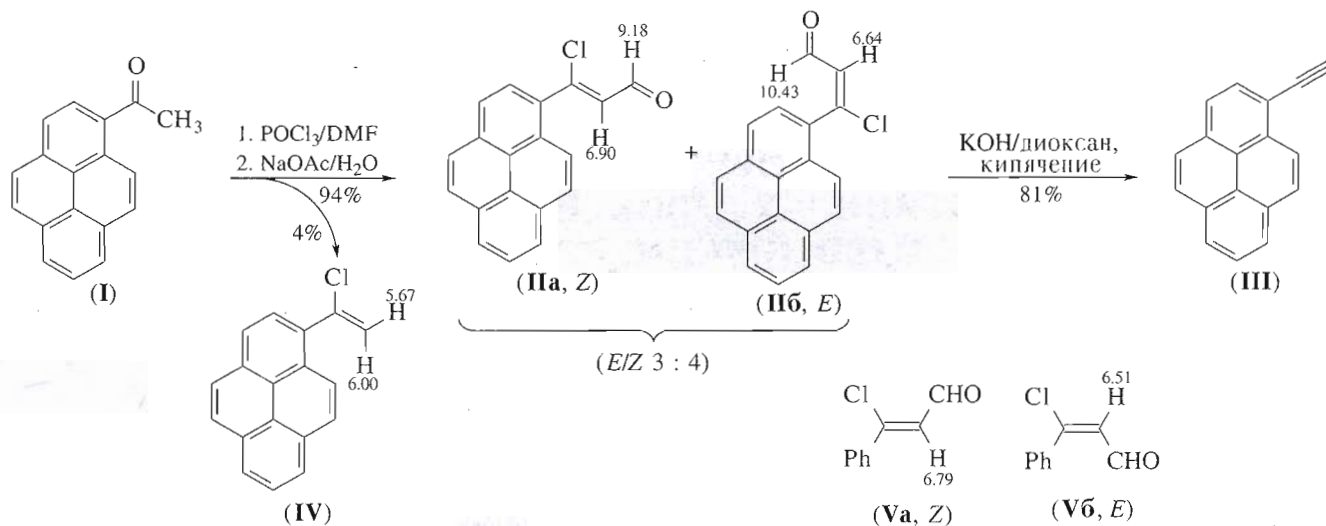
E- и Z-Изомеры пиренилакролеинов (II) неразличимы при ТСХ на силикагеле в различных системах растворителей, поэтому полученное вещество было охарактеризовано лишь ¹H-ЯМР-спектром как смесь изомеров. В этом спектре кроме мультиплета девяти ароматических протонов в области 8.39–8.02 м. д. имеются два дублета (при 10.43 и 9.18 м. д.), соответствующие альдегидным протонам (суммарная интенсивность 1H), и два дублета винильных протонов (при 6.90 и 6.64 м. д.),

* Флуоресцентные нуклеозиды. III. Предыдущие сообщения см. [1, 2].

Префикс “d” в обозначениях олигодезоксинуклеотидов опущен.

Сокращения: DIC – N,N'-диизопропилкарбодиимид; DMAP – 4-(диметиламино)пиридин; DMT – 4,4'-диметокситритил; LCAA-CPG – аминоалкилированное стекло с определенным размером пор.

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



Приведены величины химических сдвигов протонов в ^1H -ЯМР-спектрах.

Схема 1.

также суммарно соответствующих ^1H . Методом двойного резонанса было найдено, что сигналы при 10.43 и 6.64 м. д. принадлежат протонам одного геометрического изомера, а сигналы при 9.18 и 6.90 м. д. – протонам второго. Это подтверждают значения КССВ и интегральной интенсивности сигналов.

Для однозначного отнесения сигналов был проведен расчет химических сдвигов винильных протонов для модельных соединений – *E*- и *Z*-изомеров 3-фенил-3-хлор-2-пропеналя (**V**; схема 1) – по формуле $\delta = 5.28 + \sigma_{\text{gem}} + \sigma_{\text{cis}} + \sigma_{\text{trans}}$, где δ – химический сдвиг винильного протона, а σ_{gem} (1.03 для CHO), σ_{cis} (0.14 для Cl и 0.39 для Ph) и σ_{trans} (0.09 для Cl и 0.06 для Ph) – эмпирические эффективные константы экранирования для *gem*-, *cis*- и *trans*-заместителей при двойной связи относительно этого протона [52]. Для *Z*-изомера (**Va**) рассчитанное значение для сигнала винильного протона (6.79 м. д.) на 0.28 м. д. больше, чем в случае *E*-изомера (**Vb**) (6.51 м. д.). Логично предположить, что подобное соотношение будет наблюдаться для пиренилакролеинов (**IIa, б**), у которых разница в сдвигах винильных протонов составляет 0.26 м. д. Таким образом, слабополюсный сигнал при 6.90 м. д. следует приписать *Z*-изомеру (**IIa**), а сигнал, сдвинутый в сильное поле (6.64 м. д.), – *E*-изомеру (**IIб**). Из полученных данных можно вычислить константы экранирования для пирен-1-ильного заместителя при двойной связи: σ_{cis} 0.50 и σ_{trans} 0.19*. Видно, что пиренильный заме-

ститель вызывает тем больший слабополюсный сдвиг сигнала винильного протона, чем ближе в пространстве к пиреновому полициклу находится этот протон. Влияние пиренильного заместителя сильнее, чем фенильного, для которого σ_{cis} 0.39 и σ_{trans} 0.06 [52].

Различие в расстоянии до пиренового остатка в соединениях (**IIa**) и (**IIб**) определяет, по-видимому, и характер расположения сигналов альдегидных протонов в ^1H -ЯМР-спектре (см. схему 1). Если предположить, что именно изображенные на этой схеме *trans*-конформации замещенных акролеинов (речь идет о взаимном расположении C=C- и C=O-связей) термодинамически более выгодны, то в этом случае альдегидный протон в *E*-изомере (**IIб**) оказывается приближенным к пиреновому ядру, а в *Z*-изомере (**IIa**), напротив, сильно удаленным от него. Это согласуется с большой разницей химических сдвигов: сигнал альдегидного протона *E*-изомера сдвинут на 1.25 м. д. в слабое поле по сравнению с сигналом этого протона в *Z*-изомере. Из структур (**IIa**) и (**IIб**) видно также, что в *Z*- и *E*-изомерах разница в расстояниях до пиренового остатка у винильных протонов значительно меньше, чем у альдегидных, причем ближе к пирену расположен винильный протон *Z*-изомера. Этому соответствуют меньшая разница химических сдвигов винильных протонов (0.26 м. д.) по сравнению с альдегидными протонами и обратный характер взаимного расположения их сигналов для двух геометрических изомеров (в более слабом поле находится сигнал винильного протона *Z*-изомера).

Щелочная обработка альдегида (**II**) привела к 1-этинилпирену (**III**) (схема 1). При оптимизации

* Для пиренильного заместителя в алкене (**IV**) (схема 1) были получены значения σ_{cis} 0.63 и σ_{trans} 0.25; наблюдаемое спин-спиновое взаимодействие винильных протонов при этом незначительно ($^2J < 1$ Гц).

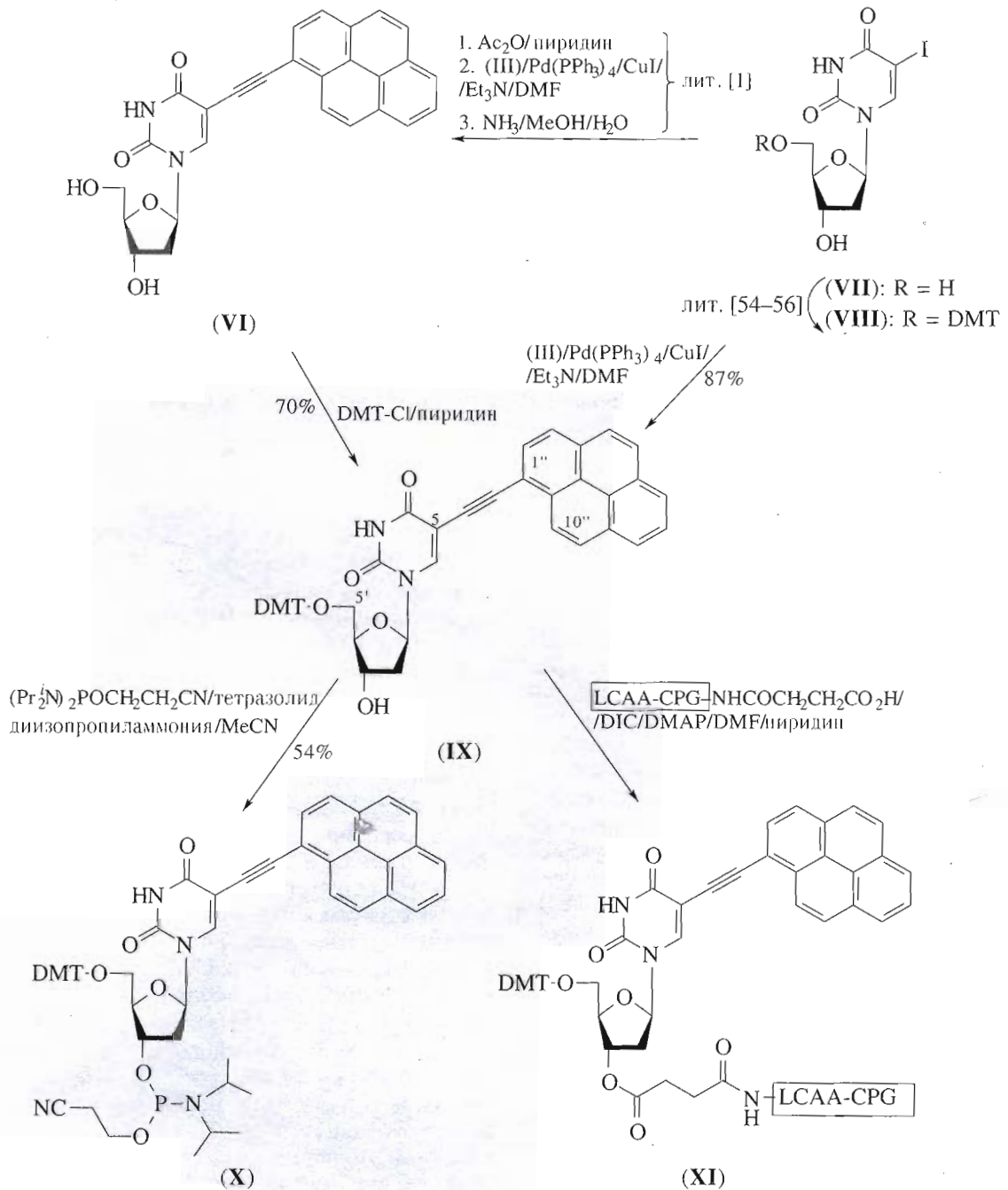


Схема 2.

этой стадии варьировали растворитель (диоксан, диглим, DMSO) и основание (водный или твердый NaOH или KOH, Pr^tONa), а также соотношение альдегид–основание. Наилучшие результаты были получены при кипячении альдегида в безводном диоксане с 2.5 моль мелко растертого KOH; добавка дибензо-18-крауна-6 не увеличивала скорости реакции и выхода алкина. Реакцию следует проводить в атмосфере аргона; в противном случае целевой алкин (III) может содержать примесь

продукта окислительной димеризации – 1,4-бис(1-пиренил)бутадина-1,3 (ср. [2]). Таким образом, 1-этинилпирен (III) был получен из 1-ацетилпирена (I) в две стадии с общим выходом 76%.

5'-O-(4,4'-Диметокситритил)-5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксисуридин (IX), ключевое соединение в синтезе модифицирующих реагентов – амидофосфита (X) и носителя (XI) (схема 2), был получен двумя путями, в основе которых лежит сочетание этинилпирена (III) с 5-иод-2'-дезоксисуридином

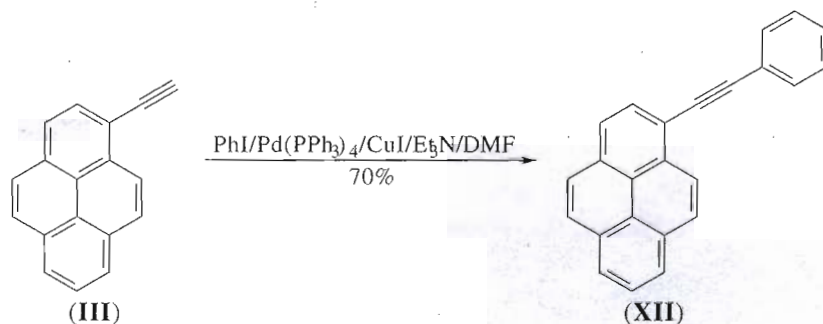


Схема 3.

(VII) или его диметокситритильным производным (VIII). Прямое взаимодействие веществ (VII) и (III) в условиях реакции Хека–Соногаширы [53], сразу приводящее к нуклеозиду (VI), оказалось непригодным для препаративных масштабов из-за малой растворимости пиренилэтинильного производного (VI) и связанной с этим трудности выделения его из реакционной смеси. Эта проблема может быть решена посредством предварительного ацетилирования в соединении (VII) гидроксильных групп, деблокируемых после проведения реакции сочетания [1]. Диметокситритилирование нуклеозида (VI) DMT-Cl в безводном пиридине привело с выходом 70% к 5'-монозамещенному продукту (IX). Объемистый пиреновый заместитель затрудняет тритилирование – реакция требует больше времени, а выход ее продукта ниже, чем при тритилировании обычных нуклеозидов. При использовании этого пути вещество (IX) получается из 5-иод-2'-дезоксисуридина (VII) в четыре стадии. Второй путь отличается последовательностью стадий тритилирования и сочетания, что позволяет превратить 5-иод-2'-дезоксисуридин (VII) в соединение (IX) в две стадии. Сначала диметокситритилирование нуклеозида (VII) [54–56] с высоким выходом привело к 5'-монозамещенному нуклеозиду (VIII), растворимость которого достаточна для проведения реакции сочетания. Затем нуклеозид (VIII) алкинизировали пиренилацетиленом (III) в стандартных условиях (см. обзор [53]) – в DMF в присутствии Pd(PPh₃)₄, CuI и триэтиламина (схема 2) при комнатной температуре в течение 16 ч. Продукт реакции (IX), подобно соединению (VIII), хорошо растворим в органических растворителях и легко может быть выделен колоночной хроматографией.

Для получения модифицирующего реагента (X) одноатомный спирт (IX) фосфитилировали 2-цианэтоксидиизопропиламинофосфинном в присутствии тетразолида диизопропиламмония в качестве катализатора [57], получив после хроматографической очистки целевое соединение с выходом 54%. После хроматографии на силикагеле вещество переосаждали гексаном из толуола, за-

тем лиофилизировали из бензольного раствора и хранили при –20°C под аргоном; в этих условиях оно устойчиво в течение по крайней мере двух лет. На основе монозамещенного нуклеозида (IX) по методу [58] был получен также носитель (XI) для твердофазного ДНК-синтеза с нагрузкой якорного нуклеозида 56.5 мкмоль/г.

В качестве модельного соединения сочетанием 1-этинилпирена (III) с иодбензолом был синтезирован 1-(фенилэтинил)пирен (XII) – аналог соединения (VI), содержащий вместо нуклеозидного фенильный остаток (схема 3).

С использованием амидофосфита (X) и твердофазного носителя (XI) были синтезированы модифицированные олигонуклеотиды (XIV) и (XVI)–(XIX), содержащие одну, две или три замены тимидинового звена на остаток 5-пиренилэтинильного производного 2'-дезоксисуридина (VI) и соответствующие фрагменту гена гипотетического фактора транскрипции *fet5+* делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [59] (5')ACGAGGAAAGCGTAA (XIII) или комплементарной ему последовательности (XV) (таблица).

Синтон (X) использовали в такой же концентрации (0.1 М в ацетонитриле) и в таком же синтетическом цикле, как и обычные нуклеотиды. В этих условиях эффективность конденсации с участием модифицирующего реагента и первой из последующих конденсаций, определенная по оптическому поглощению катиона DMT⁺ [60], была немного ниже (90–95%), чем для стандартных нуклеотидов (99–99.9%). Если число модифицированных звеньев, вводимых в олигонуклеотид, невелико (1–3), изменять условия синтеза не требуется, однако при получении последовательностей с высоким содержанием таких звеньев выход на стадии конденсации, вероятно, может быть повышен, если использовать более концентрированный раствор модифицирующего реагента и увеличивать продолжительность конденсации.

После аммиачного деблокирования (сам нуклеозид (VI) в этих условиях, по-видимому, устойчив, поскольку контрольная обработка аммиаком не

привела к образованию ТСХ-детектируемых продуктов превращения) модифицированные олигонуклеотиды (XIV) и (XVI)–(XIX) были выделены электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ. На примере конъюгата (XVIII) было показано, что при освещении УФ-светом (λ 254 нм) визуальное регистрируется флуоресценция как в геле (около 5 пмоль в полосе), так и в водном растворе (~0.5 нмоль/мл). Модификации снижают электрофоретическую подвижность олигонуклеотидов, что иллюстрирует серия олигомеров одинаковой длины с возрастающим числом модифицированных звеньев: (XV) > (XVII) > (XVIII) > (XIX). Этот эффект естественно отнести на счет чисто стерических факторов, определяющих взаимодействие мигрирующего полианиона с поперечно сшитой полиакриламидной матрицей.

Как и следовало ожидать, введение гидрофобного пиренового остатка из-за его большого сродства к обращенной фазе увеличивает время удерживания конъюгатов при обращенно-фазовой ВЭЖХ (таблица). Эта характеристика у олигонуклеотида с одним модифицированным звеном мало зависит от положения звена в цепи (конъюгаты (XVI) и (XVII)), но заметно варьирует с изменением нуклеотидного состава конъюгата ((XIV) и (XVI)). Возможно, вклад пиренового остатка в подвижность конъюгата зависит от степени его экранирования олигонуклеотидной частью, т.е. от пространственной структуры конъюгата, которая в свою очередь определяется его нуклеотидной последовательностью. Увеличение числа пиреновых остатков в молекуле (конъюгаты (XVII)–(XVIII)–(XIX)) приводит к резкому возрастанию времени удерживания, что ранее уже наблюдалось для полипиренилированных олигонуклеотидов [61].

На рис. 1 приведены УФ-спектры конъюгатов (XVII)–(XIX), содержащих различное число модифицированных нуклеозидов. Увеличение интенсивности длинноволнового поглощения, характерного для флуорофора, по сравнению с поглощением олигонуклеотидной части в области

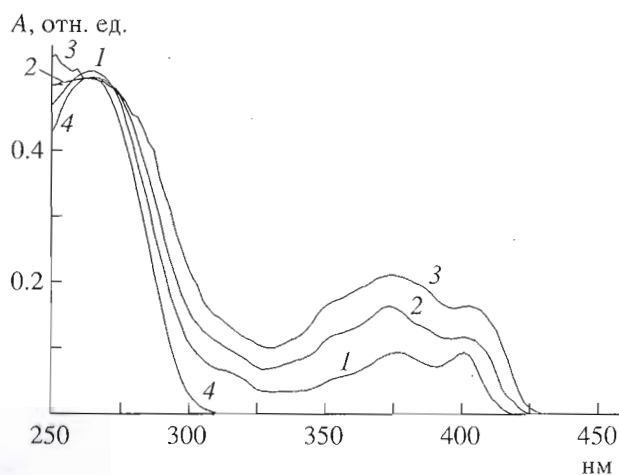


Рис. 1. УФ-спектры модифицированных олигонуклеотидов (XVII) (1), (XVIII) (2), (XIX) (3) и немодифицированного (XV) (4) в воде (нормированы при 264 нм).

260–265 нм подтверждает наличие в этих олигонуклеотидах соответственно одного, двух или трех модифицированных звеньев. Пиренилзамещенный нуклеозид вносит вклад в поглощение олигонуклеотида вблизи 260 нм, о чем можно судить по виду спектральных кривых – классический максимум в этой области, характерный для олиго- и полинуклеотидов и все еще сохраняющийся в случае монопиренильного производного (XVII) (кривая 1), практически сглаживается при введении двух и трех модифицированных звеньев из-за увеличения вклада коротковолновой пиреновой компоненты (кривые 2 и 3). Интересно, что с ростом числа пиренилированных нуклеозидных остатков изменяется также соотношение интенсивностей поглощения на двух максимумах флуорофора в спектрах конъюгатов: поглощение в области 375 нм возрастает сильнее, чем в области 400 нм.

Поскольку стерически жесткие 1-алкин-1-ильные заместители в положении 5 пиримидинов на-

Первичная структура и время удерживания синтезированных олигонуклеотидов при ВЭЖХ

Номер соединения	Нуклеотидная последовательность*	Время удерживания**, мин
(XIII)	(5')ACGAGGAAAGCGTAA	10.2
(XIV)	(5')ACGAGGAAAGCGU ^P AA	14.6
(XV)	(3')TGCTCCTTTCGCATT	11.8
(XVI)	(3')U ^P GCTCCTTTCGCATT	16.2
(XVII)	(3')TGCTCCU ^P TTCGCATT	16.0
(XVIII)	(3')TGCTCCU ^P U ^P TTCGCATT	20.6
(XIX)	(3')TGCTCCU ^P U ^P U ^P CGCATT	27.6

* U^P – 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксиридидин.

** Условия приведены в "Эксперимент. части".

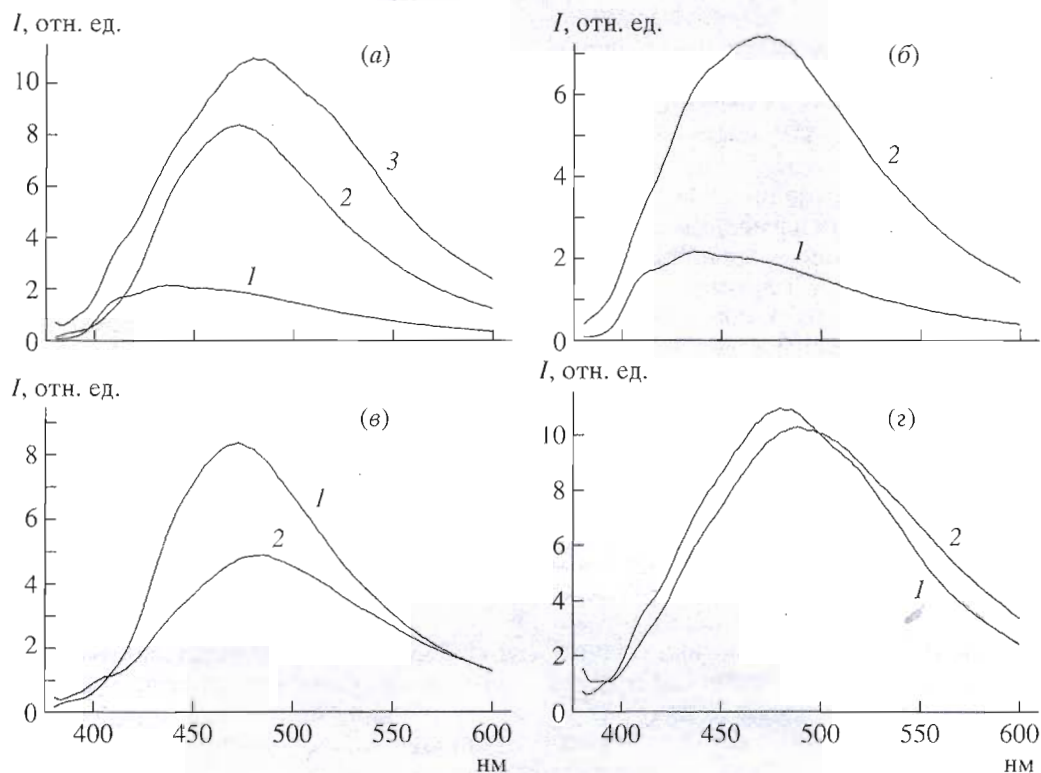


Рис. 2. Спектры флуоресценции модифицированных олигонуклеотидов и дуплексов в буфере 0.1 M NaCl, 0.01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7.0; $\lambda_{\text{возб}}$ 370 нм. (а): (XVII) (1), (XVIII) (2), (XIX) (3); (б): (XVII) (1), (XVII)-(XIII) (2); (в): (XVIII) (1), (XVIII)-(XIII) (2); (г): (XIX) (1), (XIX)-(XIII) (2). Концентрации олигонуклеотидов (XVIII), (XIX) и дуплексов (XVIII)-(XIII), (XIX)-(XIII) 5×10^{-8} M, олигонуклеотида (XVII) и дуплекса (XVII)-(XIII) 1×10^{-6} M.

правлены в большую бороздку дуплекса, они не дестабилизируют комплексы нуклеиновых кислот (см. обзоры [62, 63]). Представляло интерес выяснить, взаимодействуют ли друг с другом флуорофоры в соседних положениях нуклеотидной цепи и изменяются ли спектры флуоресценции конъюгатов при гибридизации с комплементарной последовательностью.

В спектре флуоресценции олигонуклеотида (XVII) в водном буфере (кривая 1 на рис. 2а) 5-(1-пиренилэтинил)-2'-деоксиуридиновому остатку отвечает широкая полоса со слабовыраженным максимумом в области 436 нм. Напротив, в органических растворителях спектры нуклеозида (VI) довольно значительно структурированы (два выраженных максимума) [1]. Из спектров, представленных на рис. 2а, видно, что введение второго пиренилированного звена рядом с первым резко усиливает флуоресценцию (кривая 2): интенсивность эмиссии для конъюгата (XVIII) примерно в три раза больше, чем для мономодифицированного олигомера (XVII), хотя концентрация при этом снижена в 20 раз (в используемом диапазоне концентраций веществ концентрационное тушение невелико, так что эмиссия приблизительно пропорциональна концентрации; спектры

возбуждения модифицированных олигонуклеотидов различаются незначительно (данные не приведены)). При этом происходит также значительный bathochromный сдвиг максимума эмиссии до 472 нм. Введение третьего модифицированного остатка (конъюгат (XIX)) дополнительно усиливает флуоресценцию и сдвигает максимум эмиссии до 479 нм (кривая 3).

На рис. 2б-г видны изменения спектров флуоресценции меченых олигомеров после гибридизации с комплементарным олигонуклеотидом (XIII). Наиболее выражены изменения у мономодифицированного олигонуклеотида (XVII): при связывании его в дуплекс интенсивность эмиссии возрастает в 3-4 раза, а максимум флуоресценции сдвигается с 436 до 469-473 нм (рис. 2б). Напротив, для дважды модифицированного олигомера (XVIII) интенсивность флуоресценции при гибридизации даже несколько уменьшается и bathochromный сдвиг эмиссионного максимума не столь значителен - с 472 до 484 нм (рис. 2в). Интенсивность флуоресценции трижды модифицированного олигонуклеотида (XIX) при гибридизации практически не изменяется, и bathochromный сдвиг максимума составляет всего лишь 9 нм (с 479 до 488 нм) (рис. 2г).

Таким образом, максимальный отклик спектра флуоресценции на гибридизацию наблюдается для одиночной метки в составе олигонуклеотида (XVII) – возрастание интенсивности в несколько раз и батохромный сдвиг максимума примерно на 35 нм (рис. 2б, кривая 2). Такая чувствительность 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридинового остатка к структурному окружению делает этот нуклеозид потенциально полезным для зондирования различных взаимодействий нуклеиновых кислот, таких как образование комплементарных комплексов и связывание с ферментами или другими белками.

Примечательна также способность 5-(1-пиренилэтинил)урацильного флуорофора к усилению флуоресценции при сближенном расположении нескольких остатков. Вопрос о природе флуоресценции дважды и трижды модифицированных ДНК-олигомеров остается открытым. С одной стороны, широкие полосы в области 470–480 нм в спектрах флуоресценции конъюгатов (XVIII) и (XIX) свидетельствуют об эксимерной флуоресценции пирена (или алкилпиренов) [64]. Однако судя по тому, что у дуплекса мономодифицированного олигомера (XVII) максимум эмиссии находится в этой же области, образование эксимера не является единственно возможным объяснением значительного батохромного сдвига. Похожее явление (сильный батохромный сдвиг максимума эмиссии при гибридизации монопиренилированного олигонуклеотида с комплементарной последовательностью) ранее было объяснено образованием эксиплекса пирена с нуклеиновыми основаниями [42]. Эта гипотеза вполне приемлема в нашем случае, поскольку, с одной стороны, в дуплексе (а иногда и в одноцепочечном олигомере) соседние основания находятся в стэкинге друг с другом, а с другой стороны, собственно флуорофором в 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксинуридине является сопряженная пиренилэтинилурацильная система, что подтверждается УФ-спектрами и спектрами флуоресценции [1]. Таким образом, в модифицированных дуплексах флуорофор заведомо находится в стэкинге (преорганизованном состоянии, удобном для образования эксиплексов) с соседними основаниями.

Полученные данные свидетельствуют о том, что 5-(1-пиренилэтинил)урацильные флуорофоры в составе конъюгатов взаимодействуют как с соседними нуклеозидами, так и друг с другом; при смежном расположении это может проявляться во взаимном экранировании пиреновых остатков от растворителя и ионов-тушителей в водном растворе.

О спектральных свойствах арилэтинилпиренов известно немного: приводятся квантово-химический расчет люминесцентных свойств 1-фенилэтинилпирена (XII) [65] и упоминание о его флуоресцентных метаболитах [66]; недавно была

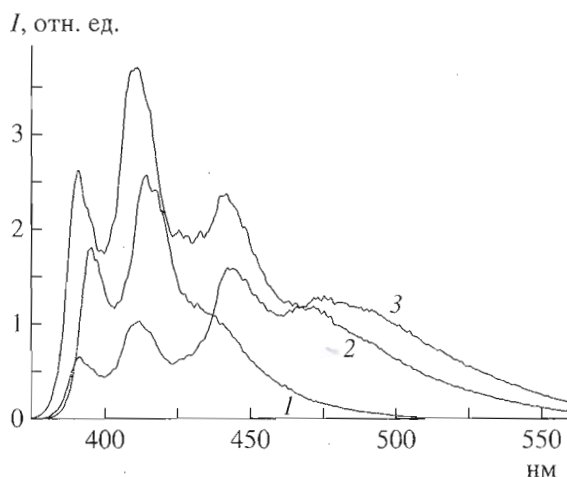


Рис. 3. Спектры флуоресценции 1-фенилэтинилпирена (XII) в THF; концентрация 1×10^{-4} (1), 1×10^{-2} (2) и 5×10^{-2} М (3); $\lambda_{\text{возб}}$ 337 нм.

описана эксимерная флуоресценция 1,6-(бис)алкилэтинильных производных пирена [67]. Нас интересовало, способен ли модельный 1-фенилэтинилпирен (XII) образовывать эксимеры в растворе. Спектры возбуждения соединения (XII) не зависят от концентрации (данные не приведены). На рис. 3 представлены спектры флуоресценции этого вещества в THF (этот растворитель хорошо подходит для приготовления растворов производных пирена в высоких концентрациях). При малых концентрациях (10^{-4} М и ниже) спектр похож на пиреновый, немного сдвинутый в красную область (кривая 1). При концентрации 10^{-2} М появляется характерный пик при 440–444 нм, аналог которого в спектре пирена отсутствует, и становится заметен широкий максимум при 475 нм, похожий на сигнал пиренового эксимера (кривая 2). При дальнейшем увеличении концентрации в 5 раз (кривая 3) картина становится еще более выраженной (общая интенсивность флуоресценции несколько снижается из-за эффекта внутреннего фильтра). Таким образом, фенилэтинилпирен (XII) четко проявляет флуоресценцию концентрационного эксимера, однако для этого требуются концентрации на 1–2 порядка больше, чем для раствора самого пирена. Это может быть связано с влиянием фенилэтинильного заместителя, фенильная группа в котором в основном состоянии должна располагаться перпендикулярно плоскости пиренового полицикла и препятствовать сближению с возбужденной молекулой. Природа пика при 440–444 нм неясна; его появление может быть связано с существованием возбужденных димеров с различной ориентацией или степенью перекрытия пиреновых плоскостей. Итак, арилэтинильные производные пирена способны давать эксимеры, и поэтому флуоресценция 5-(1-пире-

нилэтинил)-2'-дезоксисуридина в составе олигонуклеотидов в благоприятных структурных условиях также может содержать некоторый вклад эксимерной эмиссии.

Таким образом, остаток 5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксисуридина (**VI**) в составе олигонуклеотидов является перспективной меткой для исследования взаимодействий с участием нуклеиновых кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы 1,3-диизопропилкарбодимид (DIC), 4-(диметиламино)пиридин (DMAP), 5-йод-2'-дезоксисуридин, POCl_3 (Fluka); диметокситритилхлорид, CuI , PdCl_2 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (Aldrich); остальные реактивы и растворители – отечественного производства квалификации “ч.” и “ч. д. а.”. Ацетонитрил (“ос. ч.”) перегоняли над P_4O_{10} , затем кипятили и перегоняли над CaH_2 ; пиридин (“ч.”) выдерживали над KOH , перегоняли последовательно над нингидрином и CaH_2 ; DMF (“ч. д. а.”) высушивали азеотропной отгонкой воды с бензолом и перегоняли в вакууме; триэтиламин (“ч.”) выдерживали над KOH и перегоняли последовательно над фталевым ангидридом, KOH и CaH_2 ; диоксан (“ч. д. а.”) выдерживали над KOH и перегоняли над натрием; петролейный эфир (“ч.”, т. кип. 70–100°C) и гексан (“ч.”) пропускали через слой нейтрального (здесь и далее) оксида алюминия (Merck, II степени активности, размер частиц 40–100 мкм) и перегоняли; этилацетат, метилхлорид и хлороформ (все “ч. д. а.”) пропускали через слой оксида алюминия и перегоняли; бензол (“ч. д. а.”) встряхивали с конц. H_2SO_4 , пропускали через слой оксида алюминия и перегоняли; метанол (“ос. ч.”) использовали без дополнительной очистки. PPh_3 (“ч. д. а.”) перекристаллизовывали из петролейного эфира. 1-Ацетилпирен [51], 5'-О-диметокситритил-5-йод-2'-дезоксисуридин [53–55], 2-цианэтоксисдизопропиламинофосфин и тетразолид диизопропиламмония [57] синтезировали как описано в литературе. За ходом реакций следили с помощью ТСХ на пластинках Kieselgel 60 F_{254} (Merck); пятна визуализировали в УФ-свете при 256 нм. Для колоночной хроматографии использовали силикагель Kieselgel 60 (Merck), размер частиц 40–63 мкм. Растворы высушивали Na_2SO_4 и упаривали на роторном испарителе в вакууме водоструйного насоса при температуре бани 30–50°C.

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали на приборе Bruker AC-500 (шкала δ , внутренний стандарт – примесь протонов в дейтерированных растворителях; приведены КССВ в герцах). Спектр ^{31}P -ЯМР был снят на приборе Varian XR-400, рабочая частота для ^{31}P 161.9 МГц, химические сдвиги приведены относительно 85% H_3PO_4 в качестве внешнего стандарта. Масс-спектры измеряли на при-

борах Varian-MAT-44S (ионизация электронным ударом (ЭУ)) и VISION 2000 (Thermo Bioanalysis Corp.; time-of-flight mass spectrometer with matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI-TOF)). Температуры плавления определяли на нагревательном столике Voetius (не исправлены). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu OPC-65. Олигонуклеотидный синтез проводили на автоматическом синтезаторе ASM-102U (МНПП “БИОСАН”, Новосибирск). Олигонуклеотиды анализировали на хроматографе Beckman 153 (Altech). Спектры флуоресценции модифицированных олигонуклеотидов регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi F-4000. Спектры флуоресценции 1-фенилэтинилпирена (**XII**) регистрировали на оптическом многоканальном анализаторе Princeton Applied Research OMA-2 с монохроматором Jobin-Yvon HR-320; для возбуждения использовали азотный лазер ЛГ-21 с длиной волны 337 нм.

3-(1-Пиренил)-3-хлор-2-пропеналь (Па, б). Реагент Вильсмайера, приготовленный при охлаждении на водяной бане (10°C) из DMF (10 мл) и POCl_3 (4.5 мл, 48 ммоль), прибавили по каплям в атмосфере аргона к перемешиваемому раствору 1-ацетилпирена (2.44 г, 10.0 ммоль) в DMF (15 мл) в течение 20 мин. Перемешивание продолжали 20 ч, реакционную смесь вылили на лед (~400 г), pH довели до 6 прибавлением твердого $\text{AcONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ и проэкстрагировали CH_2Cl_2 (150 мл). Органический слой отделили, промыли водой (6 × 500 мл), высушили и упарили, остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (4.5 × 10 см), элюируя последовательно 25, 35 и 50% CH_2Cl_2 в петролейном эфире. Фракции, содержащие целевой продукт, объединили и упарили, остаток высушили в вакууме. Выход 2.75 г (94%); R_f 0.49 (CH_2Cl_2). Масс-спектр (ЭУ), (m/z)⁺: 290 (100), 273 (32), 255 (98), 224 (94), 202 (81); рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{11}\text{ClO}$ 290.75. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 10.43 (0.43H, д, J 6.7, (E) CHO), 9.18 (0.57H, д, J 7.5, (Z) CHO), 8.39–8.02 (9H, м, ArH), 6.90 (0.57H, д, J 7.5, (Z) CHCHO), 6.64 (0.43H, д, J 6.7, (E) CHCHO).

В качестве побочного продукта был выделен **1-(1-хлорвинил)пирен (IV)**; выход 110 мг (4%); R_f 0.61 (петролейный эфир– CH_2Cl_2 , 1 : 1); т. пл. 65–66°C (т. пл. 73–74°C [68]). Масс-спектр (ЭУ), (m/z)⁺: 262 (100), 226 (90), 202 (76); рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{Cl}$ 262.74. ^1H -ЯМР (CDCl_3): 8.47 (1H, д, $J_{9,10}$ 9.2, H10), 8.24–8.00 (8H, м, от H2 до H9), 6.00 (1H, с, (E) =CH), 5.67 (1H, с, (Z) =CH).

1-Этинилпирен (III). К раствору 3-(1-пиренил)-3-хлор-2-пропенала (**Па, б**) (582 мг, 2.0 ммоль) в диоксане (10 мл) в атмосфере аргона прибавили мелкокристаллический KOH (280 мг, 5.0 ммоль) и реакционную смесь кипятили 2 ч (раствор темнеет), охладили до 20°C, разбавили 5% водным раствором лимонной кислоты (1.5 мл) и упарили досуха.

Остаток распределили между водой (15 мл) и CH_2Cl_2 (50 мл); органическую фазу промыли водой (10 мл), высушили, упарили и хроматографировали на колонке с силикагелем (2×10 см; элюент: 15% CH_2Cl_2 в петролейном эфире). Фракции, содержащие целевой продукт, объединили и упарили, остаток высушили в вакууме. Выход 369 мг (81%; бесцветное кристаллическое вещество), R_f 0.56 (петролейный эфир– CH_2Cl_2 , 1 : 1); т.пл. 117.5–118.5°C (гексан) (т. пл. 105–106°C [45], 112–114°C [44], 113–114°C [43], 116–117.5°C [46]). Масс-спектр (ЭУ), (m/z)⁺: 226 (100), 198 (17); рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{10}$ 226.28. ¹H-ЯМР (CDCl_3): 8.60 (1H, д, $J_{9,10}$ 8.8, H10), 8.25–8.02 (8H, м, от H2 до H9), 3.61 (1H, с, ≡CH).

Увеличение загрузки на выходе не сказывается: из 5.815 г (20 ммоль) 3-(1-пиренил)-3-хлор-2-пропеналя (IIa, б) и 2.806 г (50 ммоль) КОН было получено 3.674 г (81%) алкина (III).

5'-O-(4,4'-Диметокситритил)-5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксуридин (IX).

А. 5-(1-Пиренилэтинил)-2'-дезоксуридин (VI) (263 мг; 0.58 ммоль) дважды упарили с безводным пиридином (2×30 мл), затем растворили в безводном пиридине (70 мл) и упарили на одну треть. К полученному раствору при интенсивном перемешивании прибавили 4,4'-диметокситритилхлорид (354 мг, 1.045 ммоль) и реакционную смесь оставили на 12 ч при комнатной температуре. После упаривания остаток растворили в этилацетате (150 мл), промыли насыщ. NaHCO_3 (100 мл) и водой (2×100 мл), высушили и упарили. Целевой продукт был очищен хроматографией на силикагеле (колонка 3.5×10 см, градиент метанола (0 → 5%) в бензоле + 1% Et_3N) и высушен в вакууме. Выход 307 мг (70%; светло-желтая пена). R_f 0.31 (бензол–MeOH, 9 : 1). ¹H-ЯМР (CDCl_3): 8.46 (1H, д, $J_{9',10'}$ 9.0, H10'), 8.32 (1H, с, H6), 8.19–8.14 (2H, м, H6'', H8''), 8.08–7.98 (2H, м, H4'', H5'', H7''), 7.93 (1H, д, $J_{2'',3''}$ 7.9, H2''), 7.91 (1H, д, $J_{9',10'}$ 9.0, H9''), 7.62 (1H, д, $J_{2'',3''}$ 7.9, H3''), 7.49 (2H, м, ArH (DMT)), 6.38 (4H, м, ArH (DMT)), 7.25 (2H, м, ArH (DMT)), 7.09 (1H, м, ArH (DMT)), 6.75 (4H, м, ArH (DMT)), 6.42 (1H, дд, $J_{1',2'\alpha}$ 5.6, $J_{1',2'\beta}$ 7.2, H1'), 4.59 (1H, м, H3'), 4.11–4.19 (2H, м, H4', H5'a), 3.52 (1H, с, OCH_3), 3.49 (1H, с, OCH_3), 3.37 (1H, дд, $J_{5'a,2'b}$ 10.7, $J_{5'b,4'}$ 3.3, H5'b), 2.60 (1H, ддд, $J_{2'\alpha,2'\beta}$ 14.0, $J_{1',2'\alpha}$ 5.6, $J_{2'\alpha,3'}$ 2.2, H2'), 2.40 (1H, м, H2'β).

Б. К раствору 5'-O-(4,4'-диметокситритил)-5-иод-2'-дезоксуридина (VIII) (525 мг, 0.80 ммоль), 1-этинилпирена (III) (191 мг, 0.84 ммоль) и триэтиламина (167 мкл, 1.2 ммоль) в DMF (50 мл) в атмосфере аргона последовательно прибавили $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (92.5 мг, 0.08 ммоль) и CuI (30.5 мг, 0.16 ммоль); реакционную массу перемешивали 16 ч при комнатной температуре. Затем смесь

разбавили CH_2Cl_2 (200 мл), промыли 3% водным раствором EDTA-(NH_4)₂ (5×200 мл) и водой (5×200 мл), высушили и упарили досуха. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (4.5×10 см), используя градиент (0 → 3%) метанола в бензоле. Выделенное вещество (604 мг) растворили в 5 мл CH_2Cl_2 и раствор прибавили по каплям к 50 мл гексана; выпавший осадок отфильтровали, промыли гексаном и высушили в вакууме. Выход 523 мг (87%, светло-желтый аморфный порошок).

3'-O-(Диизопропиламино-2-цианэтоксифосфинил)-5'-O-(4,4'-диметокситритил)-5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксуридин (X). 5'-O-(4,4'-Диметокситритил)-5-(1-пиренилэтинил)-2'-дезоксуридин (IX) (307 мг, 0.41 ммоль) упарили с безводным ацетонитрилом (2×30 мл) и затем растворили в 70 мл безводного ацетонитрила. К полученному раствору прибавили тетразолид диизопропиламония (141 мг, 0.82 ммоль) и 2-цианэтоксифосфинилдиизопропиламинофосфин (852 мкл, 2.68 ммоль), смесь упарили на одну треть и оставили на 12 ч при комнатной температуре (контроль по ТСХ). Реакционную смесь упарили досуха, остаток растворили в этилацетате (150 мл) и последовательно промыли насыщ. NaHCO_3 (2×100 мл), насыщ. NaCl (100 мл) и водой (100 мл). Органический слой высушили и упарили, целевой продукт выделили хроматографией (колонка 3×10 см, градиент этилацетата (0 → 20%) в бензоле + 1% Et_3N). Выход 210 мг (54%). R_f 0.61; R_f 0.49 (этилацетат–бензол, 1 : 1; диастереомеры). ³¹P-ЯМР (CD_3CN): 151.910, 151.843 (диастереомеры, ~2 : 1).

Модифицированный носитель (XI). Носитель LCAA-CPG 500 Å (300 мг), ацилированный янтарным ангидридом по методу [58], суспендировали в смеси DMF–пиридин (1 : 1; 4 мл), содержащей монотритилированный нуклеозид (IX) (189 мг, 0.25 ммоль), 1,3-диизопропилкарбодимид (280 мкл, 1.8 ммоль) и DMAP (20 мг), и выдержали 48 ч при комнатной температуре. Затем прибавили раствор пентафторфенола (100 мг) в пиридине (1 мл) и смесь выдержали еще 12 ч; носитель отфильтровали, суспендировали в 5% растворе пирролидина в пиридине (3 мл), выдержали 10 мин, снова отфильтровали и последовательно промыли хлороформом, метанолом, ацетонитрилом и эфиром (по 10 мл). Загрузка носителя по нуклеозиду, определенная по поглощению диметокситритильного катиона [60], составила 56.5 мкмоль/г.

1-Фенилэтинилпирен (XII). К перемешиваемому в атмосфере аргона раствору 1-этинилпирена (III) (452 мг, 2.0 ммоль) и иодбензола (470 мкл, 4.2 ммоль) в бензоле (30 мл) прибавили Et_3N (570 мкл, 4.09 ммоль), CuI (38 мг, 0.2 ммоль), Ph_3P (52 мг, 0.2 ммоль) и PdCl_2 (28 мг, 0.1 ммоль) и про-

должали перемешивание 16 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь упарили, остаток растворили в 100 мл хлороформа и последовательно промыли порциями по 100 мл воды, 1% лимонной кислоты, 3% EDTA-(NH₄)₂ (трижды) и снова воды. Органическую фазу высушили и упарили, остаток хроматографировали на силикагеле (колонка 36 × 95 мм) в градиенте концентрации бензола (25 → 55%) в петролейном эфире. Выход соединения (XII) 422 мг (70%), т. пл. 119.5–120.5°C (петролейный эфир–бензол; т. пл. 120–122°C [69]); R_f 0.63 (бензол). Масс-спектр (m/z)⁺: 302 (MALDI-TOF); рассчитано для C₂₄H₁₄ 302.37. УФ-спектр (THF): λ_{max}, нм (ε, M⁻¹ см⁻¹): 283 (34900), 293 (49400), 349 пл. (26700), 364 (46000), 384 (44700); λ_{min}: 287 (30000), 308 (4100), 374 (30000).

Модифицированные олигонуклеотиды. Твердофазный амидофосфитный олигонуклеотидный синтез проводили в стандартном режиме, соответствующем рекомендациям изготовителя. В качестве подложки использовали крупнопористое стекло CPG-500 с привитыми 5'-O-защищенными нуклеозидами (Millipore) или модифицированный носитель (XI). Модифицирующий реагент (X), лиофилизированный из бензола, растворяли в сухом ацетонитриле до концентрации 0.1 М; продолжительность стадии конденсации с его участием, как и для обычных нуклеозидных амидофосфитов, составляла 30 с. После окончания синтеза и удаления 5'-концевой DMT-группы носитель с защищенными олигонуклеотидами подвергали деблокирующей обработке аммиаком (25% водный NH₃, 60°C, 5 ч). Водный раствор упаривали и остаток дважды переосаждали 5–10-кратным объемом ацетона из 2 М LiClO₄. Затем олигонуклеотиды выделяли электрофорезом в 20% ПААГ, элюировали из геля 0.5 М LiClO₄, переосаждали ацетоном и обессоливали на колонке 1 × 8 см с сефадексом G-25 (средний), элюируя "бессолевым" буфером (100 мкМ Трис-НСl, 10 мкМ EDTA-Na₂, рН 8.0).

Для аналитической ВЭЖХ использовали колонку с обращенной фазой C-18 SOTA (4.5 × 250 мм), линейный градиент (5 → 50%) MeCN в 0.1 М NH₄OAc за 45 мин.

Дуплексы получали из эквимольных количеств каждого из конъюгатов (XVII)–(XIX) и олигонуклеотида (XIII) в буфере (0.1 М NaCl, 0.01 М КН₂РО₄/К₂НРО₄, рН 7.0); смесь выдерживали 5 мин при 95°C, а затем в течение 1 ч охлаждали до 20°C.

Авторы выражают благодарность Ю.П. Козьмину (ИБХ РАН) за регистрацию масс-спектров, Э.И. Лажко (Институт по изысканию новых антибиотиков РАН) за регистрацию ³¹P-ЯМР-спектра, О.П. Варнавскому (ФИАН) за регистрацию

спектра флуоресценции соединения (XII) и Д.С. Стеценко (ИБХ РАН) за помощь в проведении некоторых экспериментов. ¹H-ЯМР-спектры получены на установке "Комплекс ЯМР-спектрометрии" при финансовой поддержке Миннауки России (регистрационный номер 96-03-08).

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 97-03-32927а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коршун В.А., Манасова Е.В., Балакин К.В., Прохоренко И.А., Буцацкий А.Г., Берлин Ю.А. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 923–925.
2. Малахова Е.В., Малахов А.Д., Кузнецова С.В., Варнавский О.П., Кадуцкий А.П., Кожич Д.Т., Коршун В.А., Берлин Ю.А. // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. С. 688–695.
3. Прохоренко И.А., Коршун В.А., Берлин Ю.А. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 838–847.
4. Tyagi S., Kramer F.R. // Nature Biotechnol. 1996. V. 14. P. 303–308.
5. Tyagi S., Bratu D.P., Kramer F.R. // Nature Biotechnol. 1998. V. 16. P. 49–53.
6. Piatek A.S., Tyagi S., Pol A.C., Telenti A., Miller L.P., Kramer F.R., Alland D. // Nature Biotechnol. 1998. V. 16. P. 359–363.
7. Kostrikis L.G., Tyagi S., Mhlanga M.M., Ho D.D., Kramer F.R. // Science. 1998. V. 279. P. 1228–1229.
8. Sokol D.L., Zhang X., Lu P., Gewirtz A.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 11538–11543.
9. Fang X., Liu X., Schuster S., Tan W. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 2921–2922.
10. Chen X., Zehnbauser B., Gnirke A., Kwok P.-Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 10756–10761.
11. Chen X., Kwok P.-Y. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 347–353.
12. Chen X., Livak P.-Y., Kwok P.-Y. // Genome Res. 1998. V. 8. P. 549–556.
13. Bernard P.S., Lay M.J., Wittwer C.T. // Anal. Biochem. 1998. V. 255. P. 101–107.
14. Mullah B., Livak K., Andrus A., Kenney P. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 1026–1031.
15. Ju J., Ruan C., Fuller C.W., Glazer A., Mathies R.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 4347–4351.
16. Metzker M.L., Lu J., Gibbs R.A. // Science. 1996. V. 271. P. 1420–1422.
17. Ju J., Glazer A., Mathies R.A. // Nature Medicine. 1996. V. 2. P. 246–249.
18. Hung S.-C., Mathies R.A., Glazer A. // Anal. Biochem. 1997. V. 252. P. 78–88.
19. Glazer A., Mathies R.A. // Curr. Opin. Biotechnol. 1997. V. 8. P. 94–102.
20. Hung S.-C., Mathies R.A., Glazer A. // Anal. Biochem. 1998. V. 255. P. 32–38.
21. Rippe K., Fritsch V., Westhof E., Jovin T.M. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 3777–3786.

22. Fritzsche H., Akhebat A., Taillandier E., Rippe K., Jövin T.M. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5085–5091.
23. Tong G., Lawlor J.M., Tregear G.W., Haralambidis J. // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 117. P. 12151–12158.
24. Ebata K., Masuko M., Ohtani H., Kashiwasake-Jibu M. // Photochem. Photobiol. 1995. V. 62. P. 836–839.
25. Förtsch I., Fritzsche H., Birch-Hirschfeld E., Evertsz E., Klement R., Jövin T.M., Zimmer C. // Biopolymers. 1996. V. 38. P. 209–220.
26. Mohammadi S., Slama-Schwok A., Leger G., El Manouni D., Shchyolkina A., Leroux Y., Taillandier E. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 14836–14844.
27. Yamana K., Takei M., Nakano H. // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. P. 6051–6054.
28. Балакин К.В., Коршун В.А., Прохоренко И.А., Малеев Г.В., Куделина И.А., Гонтарев С.В., Берлин Ю.А. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 33–41.
29. Lewis F.D., Zhang Y., Letsinger R.L. // J. Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. P. 5451–5452.
30. Förtsch I., Birch-Hirschfeld E., Jövin T.M., Stelzner A., Zimmer C. // Nucleosides Nucleotides. 1998. V. 17. P. 1539–1545.
31. Balakin K.V., Korshun V.A., Mikhalev I.I., Maleev G.V., Malakhov A.D., Prokhorenko I.A., Berlin Yu.A. // Biosensors Bioelectronics. 1998. V. 13. P. 771–778.
32. Masuko M., Ohtani H., Ebata K., Shimadzu A. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 5409–5416.
33. Paris P.L., Langenhan J.M., Kool E.T. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 3789–3793.
34. Koenig P., Reines S.A., Cantor C.R. // Biopolymers. 1977. V. 16. P. 2231–2242.
35. Yamana K., Gokota T., Ozaki H., Nakano H., Sangen O., Shimidzu T. // Nucleosides Nucleotides. 1992. V. 11. P. 383–390.
36. Mann J.S., Shibata Y., Meehan T. // Bioconjugate Chem. 1992. V. 3. P. 554–558.
37. Yamana K., Nunota K., Nakano H., Sangen O. // Tetrahedron Lett. 1994. V. 35. P. 2555–2558.
38. Kierzek R., Li Y., Turner D.H., Bevilacqua P.C. // J. Am. Chem. Soc. 1993. V. 115. P. 4985–4992.
39. Li Y., Bevilacqua P.C., Mathews D., Turner D.H. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 14394–14399.
40. Yguerabide J., Talavera E., Alvarez J.M., Afkir M. // Anal. Biochem. 1996. V. 241. P. 238–247.
41. Preuß R., Dapprich J., Walter N.G. // J. Mol. Biol. 1997. V. 273. P. 600–613.
42. Yamana K., Iwase R., Furutani S., Tsuchida H., Zako H., Yamaoka T., Murukami A. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. P. 2387–2392.
43. Nakasuji K., Akiyama S., Nakagawa M. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1972. V. 45. P. 875–882.
44. Gan L.-S.L., Acebo A.L., Alworth W.L. // Biochemistry. 1984. V. 23. P. 3827–3836.
45. Bilow N., Landis A.L., Austin W.B., Woolley D.D. // SAMPE J. 1982. V. 18. P. 19–24.
46. Crisp G.T., Jiang Y.-L. // Synth. Commun. 1998. V. 28. P. 2571–2576.
47. Bodendorf K., Kloss P. // Angew. Chem. 1963. B. 75. S. 139.
48. Bodendorf K., Mayer R. // Chem. Ber. 1965. B. 98. S. 3554–3560.
49. Lötzbeyer J., Bodendorf K. // Chem. Ber. 1967. B. 100. S. 2620–2624.
50. Royles B.J.L., Smith D.M. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1994. P. 355–358.
51. Bachmann W.E., Carmack M. // J. Am. Chem. Soc. 1941. V. 63. P. 2494–2499.
52. Gordon A.J., Ford R.A. The Chemist's Companion. A Handbook of Practical Data, Techniques, and References. New York: Wiley-Interscience, 1972. P. 269.
53. Коршун В.А., Манасова Е.В., Берлин Ю.А. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 324–386.
54. Classon B., Samuelsson B. // Acta Chem. Scand. 1985. V. B39. P. 501–504.
55. Graham D., Parkinson J.A., Brown T. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1998. P. 1131–1138.
56. Ahmadian M., Zhang P., Bergstrom D.E. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 3127–3135.
57. 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.
58. Damha M.J., Giannaris P.A., Zabarylo S.V. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 3813–3821.
59. Шпаковский Г.В., Лебеденко Е.Н. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. С. 234–237.
60. Atkinson T., Smith M. // Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach. // Ed. M.H. Gait. Oxford: IRL Press, 1984. P. 36–81.
61. Korshun V.A., Balakin K.V., Proskurina T.S., Mikhalev I.I., Malakhov A.D., Berlin Y.A. // Nucleosides Nucleotides. 1999. V. 18. P. 2661–2676.
62. De Mesmaeker A., Häner R., Martin P., Moser H.E. // Acc. Chem. Res. 1995. V. 28. P. 366–374.
63. Freier S.M., Altmann K.-H. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 4429–4443.
64. Winnik F.M. // Chem. Rev. 1993. V. 93. P. 587–614.
65. Базыль О.К., Майер Г.В., Копылова Т.Н., Данилова В.И. // Ж. прикл. спектроскопии. 1982. Т. 37. С. 80–86.
66. Gan L.-S.L., Lu J.-Y.L., Hershkowitz D.M., Alworth W.L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985. V. 129. P. 591–596.
67. Inouye M., Fujimoto K., Furusyo M., Nakazumi H. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. P. 1452–1458.
68. Sarobe M., Zwickler J.W., Snoeijer J.D., Wiersum U.E., Jenneskens L.W. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994. P. 89–90.
69. Reimlinger H. // Chem. Ind. 1969. № 37. P. 1306.

Synthesis and Fluorescent Properties of 5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-deoxyuridine-containing Oligodeoxynucleotides

**A. D. Malakhov, E. V. Malakhova, S. V. Kuznitsova, I. V. Grechishnikova,
I. A. Prokhorenko, M. V. Skorobogaty, 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*

Novel reagents for the fluorescent labeling of oligo- and polynucleotides have been prepared: 5-(1-pyrenylethynyl)-2'-deoxyuridine 3'-phosphoramidite and a solid support carrying this nucleoside. Oligonucleotides containing one or several modified units have been synthesized, and the fluorescence of these probes has been shown to change upon hybridization with the complementary sequence.

Key words: fluorescent detection, hybridization, modified oligonucleotide, 5-(1-pyrenylethynyl)-2'-deoxyuridine

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

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.