

24

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИННИКОВА



на правах рукописи

УСТИНОВ Алексей Викторович

**СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ КОНЬЮГАТОВ
С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ [3+2]-ДИПОЛЯРНОГО
ЦИКЛОПРИСОЕДИНЕНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
В КОНСТРУИРОВАНИИ ДНК-НАНОСТРУКТУР**

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

26 MAR 2009

Москва 2009

Работа выполнена в Лаборатории химии нуклеиновых кислот Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научный руководитель	кандидат химических наук В.А. Коршун
Официальные оппоненты:	доктор химических наук, профессор Т.С. Орецкая доктор химических наук, профессор Н.В. Бовин
Ведущая организация	Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится 25 марта 2009 г. в 10.00 на заседании
Специализированного совета Д 002.019.01 при Институте биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу:
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан 24 февраля 2009 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета
доктор физ.-мат. наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Развитие химии олигонуклеотидных конъюгатов оказало колоссальное влияние на прогресс в молекулярной биологии. Секвенирование ДНК, ПЦР в режиме реального времени, флуоресцентная детекция точечных мутаций, гибридизационно-иммуноферментный анализ, флуоресцентная *in situ*-гибридизация – это лишь несколько примеров молекулярно-биологических методов, невозможных без использования модифицированных олигонуклеотидов.

Существует ряд способов получения модифицированных олигонуклеотидов. Постсинтетические методы, связанные с введением реакционноспособной группы на стадии твердофазного олигонуклеотидного синтеза и ее последующей модификацией, предпочтительны для синтеза олигонуклеотидных конъюгатов с фрагментами, недостаточно стабильными в условиях олигонуклеотидного синтеза (ОНС) и деблокирования. Такими фрагментами являются некоторые флуоресцентные красители. Помимо этого, постсинтетические методы принципиально позволяют синтезировать конъюгаты, содержащие несколько олигонуклеотидных цепей, пептидно-олигонуклеотидные конъюгаты, а также решать задачу иммобилизации олигонуклеотидов на твердых подложках.

В настоящее время основной реакцией, используемой для постсинтетической конъюгации, является реакция аминов с активированными эфирами (сукцинимидными, сульфосукцинимидными и некоторыми другими). При всей простоте, недостатками ее является неустойчивость активированных эфиров в водной среде, зависимость хода реакции от pH и растворимости активированного эфира, а также плохая масштабируемость. Активированные эфиры реагируют с аминогруппами природных биомолекул, что во многих случаях является нежелательным.

Поэтому представляется весьма актуальной разработка метода синтеза олигонуклеотидных конъюгатов на основе альтернативной реакции, призванной устранить перечисленные недостатки. Такой реакцией стала получившая широкое распространение Cu(I)-катализируемая реакция [3+2]-диполярного циклоприсоединения азидов к терминальным ацетиленам (“click chemistry”).

Благодаря специфичности реакции и высокой стабильности исходных компонентов, оказался возможным синтез разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов – ранее весьма труднодоступных блоков, представляющих большой интерес для сборки ДНК-наноструктур. ДНК-наноструктуры являются сравнительно малоизученными и весьма интересными объектами, которые, возможно, в ближайшем будущем найдут применение в медицинской диагностике и технологии изготовления электронных устройств. Исследованию самосборки разветвленных олигонуклеотидных конъюгатов с образованием наноструктур посвящена часть настоящей работы.

Цель работы. Диссертация посвящена синтезу компонентов для реакции диполярного циклоприсоединения (ацетилен-модифицированных олигонуклеотидов, органических азидов, содержащих флуорофоры), отработке условий конъюгации, синтезу органических полиазидов и конъюгатов на их основе, содержащих несколько олигонуклеотидных цепей, а также изучению самосборки таких конъюгатов с образованием ДНК-наноструктур.

Научная новизна и практическая ценность работы. В ходе работы был синтезирован ряд реагентов для введения ацетиленовой группы в олигонуклеотиды; из этих олигонуклеотидов посредством реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения были получены конъюгаты с различными органическими азидами. Продемонстрирована высокая эффективность этой реакции для синтеза флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов (в том числе зондов для ПЦР в режиме реального времени), играющих большую роль в молекулярно-биологических исследованиях и медицинской диагностике. С помощью данного метода были с высокими выходами получены ранее труднодоступные конъюгаты, содержащие две и три олигонуклеотидные цепи, и была изучена гибридизация этих конъюгатов с образованием не описанных ранее дискретных и полимерных ДНК-наноструктур.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на международных молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2005, 2006, 2008), «Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School» (University of Southern Denmark, Odense, Denmark, 2007), международной конференции "Физико-химическая биология" (Новосибирск, 2006), международном симпозиуме «17-й Круглый стол по нуклеозидам, нуклеотидам и нуклеиновым кислотам» (IRT-XVII; Берн, 2006), IV Съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 статей в реферируемых журналах.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (136 ссылок). Работа изложена на 122 страницах, содержит 58 рис., 19 схем и 4 табл.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Синтез реагентов для модификации олигонуклеотидов

В Cu(I)-катализируемой реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения принимают участие терминальные ацетилены **1** и органические азиды **2** (схема 1). Поскольку азидогруппа не совместима со стандартным фосфорамидитным олигонуклеотидным синтезом, для введения в олигонуклеотиды нами были выбрана ацетиленовая группа.

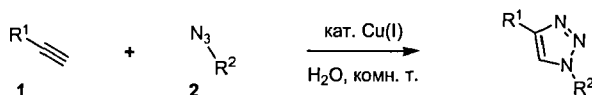


Схема 1

С целью сравнения поведения алкил- и арилацетиленов в условиях конъюгации, были синтезированы реагенты для введения как алкилэтинильной, так и арилэтинильной группы.

Реагент **5** (содержащий алкилацетиленовую группу) был получен посредством раскрытия коммерчески доступного энантимерно чистого 2-гидроксипропиридола **3** пропаргиламином, диметокситриэтилированием промежуточного продукта, и последующего фосфитирования предшественника **4**. Последнее соединение было также иммобилизовано на стекле контролируемой пористости для получения твердофазного носителя **6**, на котором синтезировались олигонуклеотиды, содержащие 3'-ацетиленовую модификацию.

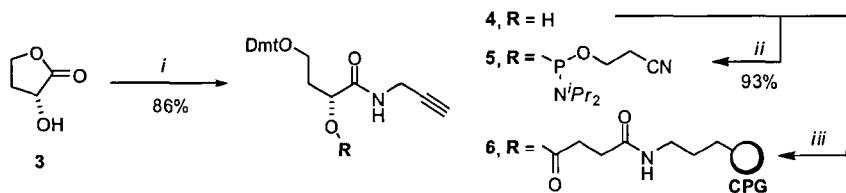


Схема 2

Реагенты и условия: *i*, Пропаргиламин, MeOH, 60°C, 48 ч; DmtCl, Py, 48 ч; *ii*, 2-цианэтоксис(диизопропиламино)фосфин, тетразолид диизопропиламмония, CH₂Cl₂, 12 ч; *iii*, сукциноиламинопропил-CPG (60 мкмоль/г), диизопропилкарбодимид, DMAP, Py/DMF, 150 ч.

Для введения арилацетиленовой модификации был синтезирован терминирующий фосфамидитный реагент **11** (схема 3).

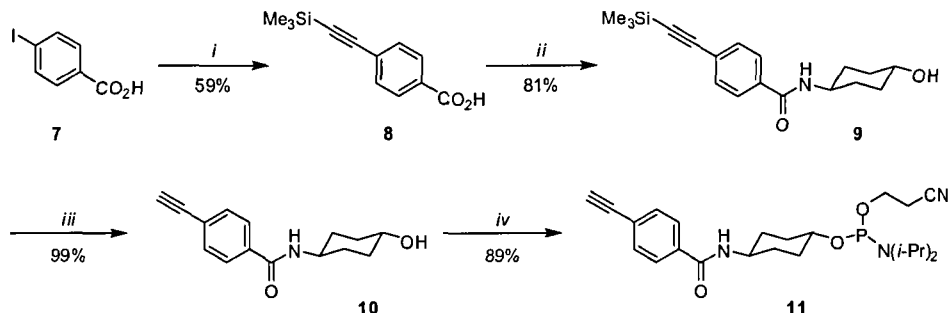


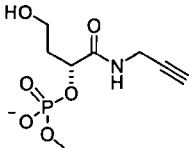
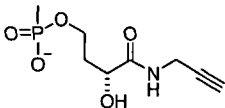
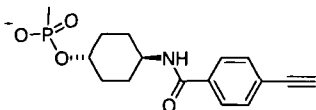
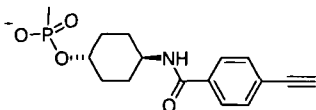
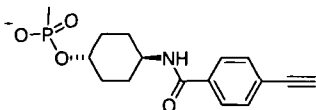
Схема 3

Реагенты и условия: *i*, триметилсилилацетилен, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 12 ч; HCl; *ii*, трис(пирролидин-1-ил)бенотриазол-1-илоксифосфоний гексафторфосфат, этилдиизопропиламин, 20 мин; *trans*-4-гидроксициклогексиламмоний хлорид, этилдиизопропиламин, 4 ч; *iii*, фторид тетрабутиламмония, THF, 10 мин; *iv*, 2-цианэтоксис(диизопропиламино)фосфин, тетразолид диизопропиламмония, CH₂Cl₂, 12 ч.

С использованием носителя **6** и фосфамидитов **5** и **11** был синтезирован ряд олигонуклеотидов. Для этого был применен стандартный фосфамидитный протокол олигонуклеотидного синтеза. Последовательности синтезированных олигонуклеотидов

представлены в табл. 1. Структура олигонуклеотидов подтверждена масс-спектрами MALDI-TOF (данные не приведены).

Таблица 1. Синтезированные модифицированные олигонуклеотиды.

Шифр	Последовательность (5'→3')	Остаток X
ON1	XCA-TTA-CAT-CCA-GAC	
ON2	XGT-CTG-GAT-GTA-ATG	
ON3	GTC-TGG-ATG-TAA-TGX	
ON4	XCA-TTA-CAT-CCA-GAC	
ON5	XTC-TGG-ATG-TAA-TGG	

Для очистки олигонуклеотидов использовался как денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле, так и ВЭЖХ. Во втором случае 5'-концевая диметокситритильная группа по окончании ОНС не удалялась, благодаря чему время удерживания целевого олигонуклеотида на колонке с обращенной фазой существенно увеличивалось по сравнению с нетритилированными укороченными олигонуклеотидами, образующимися на промежуточных стадиях синтеза.

Оказалось, что нетритилированные олигонуклеотиды **ON1–ON3**, модифицированные реагентом **5** по 5'-концу, неустойчивы в условиях аммолиза (используемого для удаления защитных групп с синтезированного олигонуклеотида). В смеси, образующейся при аммолизе олигонуклеотида на подложке, можно обнаружить (помимо укороченных цепей) два продукта, частично разделяющихся электрофорезом. Согласно MALDI-TOF, один из них представляет собой целевой олигонуклеотид **ON1**, а второй – соответствующий незамещенный амид. Очевидно, к потере остатка пропаргиламина приводит процесс, включающий в себя образование 2-гидрокси-γ-бутиролактона (схема 4). Незамещенный амид образуется при раскрытии лактона аммиаком.

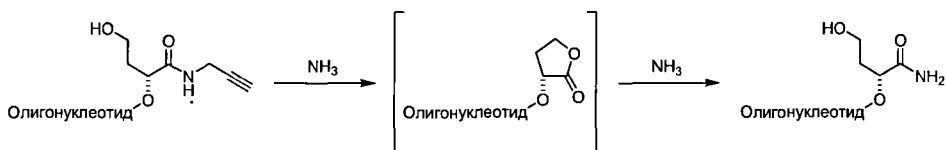


Схема 4

В то же время было показано, что диметокситритилированные олигонуклеотиды устойчивы к аммонизиру и могут быть превращены в целевой продукт после очистки ВЭЖХ и удаления защитной группы водной уксусной кислотой.

2. Отработка реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения на модельном азиде

Для отработки условий реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения был синтезирован флуоресцентный азид **18**. Выбор структуры модельного азида обусловлен присутствием флуоресцентной группы (позволяющей легко визуально обнаруживать конъюгат на геле-электрофорезе), а также гидрофобностью молекулы (что дает возможность легко детектировать конъюгат на обращенно-фазовой ВЭЖХ).

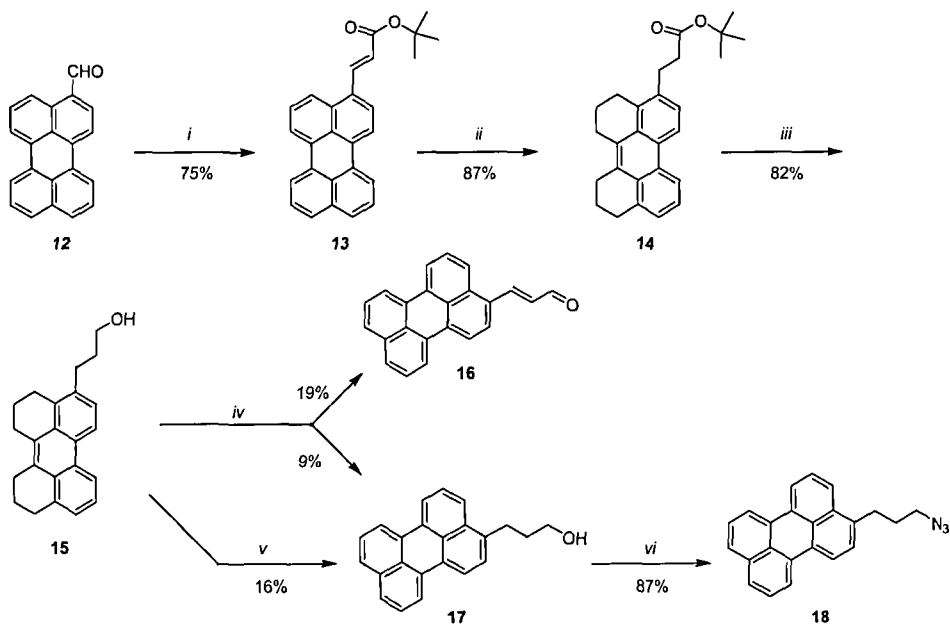


Схема 5

Реагенты и условия: *i*, Трет-бутоксикарбонилметилентрифенилфосфоран, EtOAc, 4 ч, Δ ; *ii*, H_2 , Pd/C, EtOAc, 2 сут; *iii*, $LiAlH_4$, Et_2O/THF ; *iv*, 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон, PhMe, $100^\circ C$, 30 мин; *v*, Ph_3COH , $(CF_3CO_2)_2O$, CF_3CO_2H , Δ , 12 ч; *vi*, CH_3SO_2Cl , Et_3N , CH_2Cl_2 , 1 ч; NaN_3 , DMF, 12 ч.

Исходным соединением в синтезе флуоресцентного азида служил 3-формилперилен **12** (схема 5). Соединение **13** было получено по реакции Виттига. Гидрирование двойной связи в нем привело к частичному восстановлению ароматической системы (соединение **14**). Восстановление сложного эфира **14** дает спирт **15**. Дегидрирование гексагидропериленового производного **15** оказалось сложной задачей: действие DDQ дает периленовый спирт **17** с выходом лишь 9%, а основной продукт был идентифицирован как ненасыщенный альдегид **16**. Ароматизация с помощью тритил-катиона оказалась более удобной, но и тут удалось добиться выхода только 16%.

Полученный спирт **17** был переведен в целевой азид посредством мезилирования и последующего нуклеофильного замещения под действием азид-иона.

Реакцию конъюгации проводили в водном DMSO или водном ацетонитриле в присутствии соединений Cu(I), генерируемых *in situ* действием аскорбат-иона или трис(2-карбоксиэтил)фосфина на Cu²⁺. Было показано, что природа восстановителя не влияет на выход конъюгата. Однако, избыток трис(2-карбоксиэтил)фосфина может приводить к восстановлению азидогрупп, поэтому применение аскорбат-иона предпочтительно.

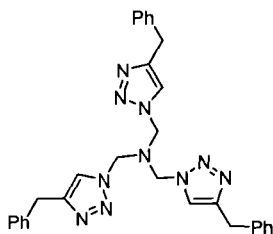
Оказалось, что для успешного протекания конъюгации обязательно проводить ее в инертной атмосфере. Проведение реакции на воздухе отрицательно сказывается на выходах конъюгатов вследствие катализируемого Cu(I) процесса окислительной дегградации олигонуклеотидов, сопровождающегося расщеплением их цепей.

Было показано, что реакция одинаково эффективно протекает при значениях pH от 4 до 10. Оптимальная концентрация Cu(I) была найдена равной 0.5–1 mM. С использованием оптимизированных условий был получен ряд модельных конъюгатов (табл. 2). Реакция протекала наполовину за 3 ч при комнатной температуре. Полное превращение заняло 12 ч. При соотношении азиды к ацетилену, равном 10:1, по окончании реакции методом ВЭЖХ не детектировалось следов исходного ацетилена. Оценивая эффективность этого процесса, следует отметить, что крайне низкая растворимость модельного азиды в реакционной смеси не мешает протеканию реакции.

Таблица 2. Выходы полученных конъюгатов с 3-(3-азидопропил)периленом и результаты MALDI-TOF анализа.

Исходный олигонуклеотид	MALDI-TOF, найденно/вычислено	Выход
ON1	4745.34/4743.93	52%
ON3	4832.77/4830.99	57%
ON4	4833.07/4829.98	68%
ON5	4973.98/4971.98	71%

Неколичественный выход продукта в модельных реакциях был связан, по-видимому, с окислительной дегградацией олигонуклеотидов под действием следов O₂, имеющей большое значение при малом масштабе реакции (4 нмоль олигонуклеотида). Было показано, что выход конъюгатов можно увеличить до практически количественного посредством использования лиганда ТВТА, стабилизирующего медь в степени окисления +1 и препятствующего таким образом каталитической окислительной дегградации.



ТВТА

Для синтеза флуоресцентных олигонуклеотидных конъюгатов посредством реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения нами были предприняты синтезы азидопроизводных некоторых флуоресцентных красителей.

3. Синтез флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов по реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения

Из смеси изомеров карбоксифлуоресцеина **19** были получены изомерно чистые азидопроизводные 5-карбоксифлуоресцеина **22** и 6-карбоксифлуоресцеина **23** (схема 6). Разделение изомеров производилось на защищенных производных пентафторфениловых эфиров карбоксифлуоресцеина **20** и **21**.

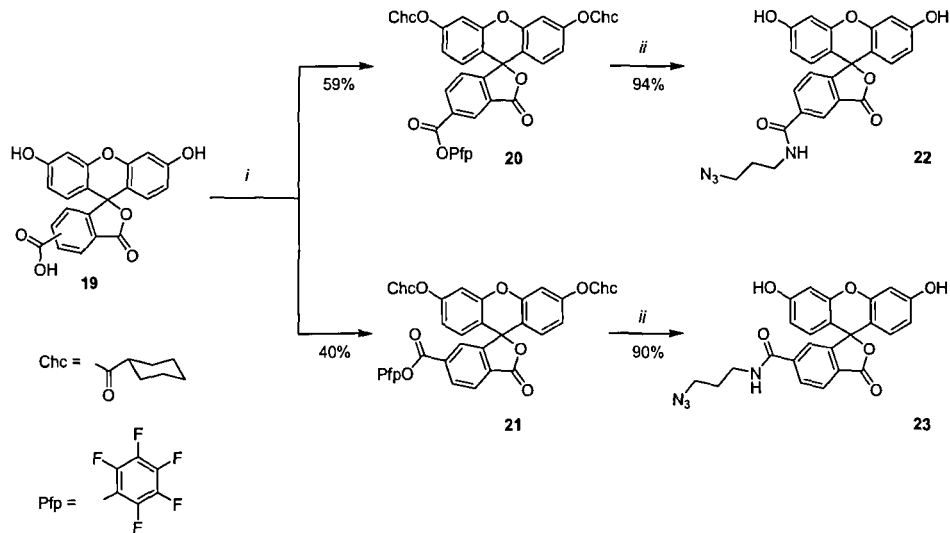


Схема 6

Реагенты и условия: *i*, Chc₂O, DMF, 72 ч; PfpOH, DCC, EtOAc, 0°C → rt, 14 ч; разделение изомеров; *ii*, 3-азидопропиламин, THF; NH₃

Синтез азидопроизводных цианиновых красителей показан на схеме 7. Кислоты **24–27** были синтезированы с приемлемыми выходами из соответствующих индолениновых солей методом ступенчатой сборки «в одном горшке». Действие на эти кислоты дисукцинимидилкарбоната и последующая конденсация образующихся активированных эфиров с

3-аминопропилазидом дает соответствующие амиды; таким образом были синтезированы азидопроизводные красителей Cy3 (**28**), Cy5 (**29**), Cy3.5 (**30**) и Cy5.5 (**31**).

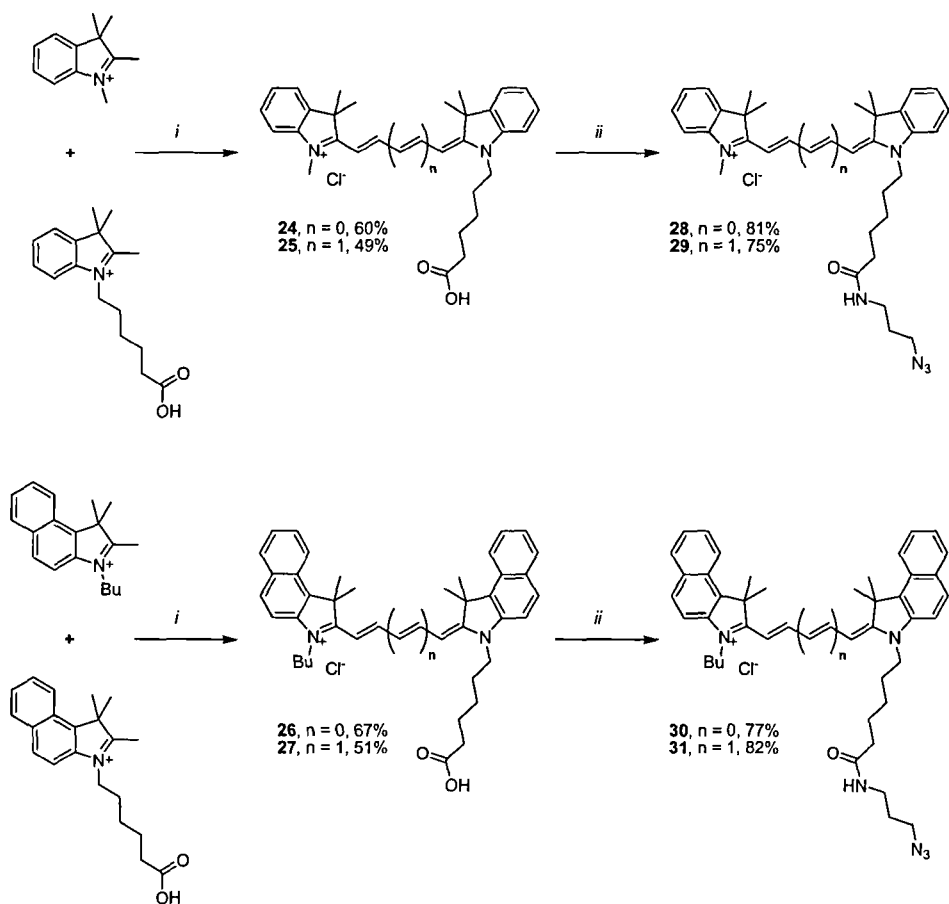


Схема 7

Реагенты и условия: *i*, $\text{PhN}=\text{CHNHPH}$ или $\text{PhN}=\text{CHCH}_2\text{CHNHPH}\cdot\text{HCl}$, Ac_2O , 120°C , 30 мин; Py , 12 ч.; *ii*, DSC, CH_2Cl_2 , 2 ч; 3-азидопропиламин, CH_2Cl_2 , 12 ч.

Чистые 5- и 6-изомеры азидопроизводных ксантеновых красителей JOE (**33**), TAMRA (**36**), ROX (**37**) были получены из соответствующих кислот, как показано на схеме 8 (кислоты были любезно предоставлены М.В. Квачом и Д.А. Цыбульским, ИФОХ НАН РБ, Минск).

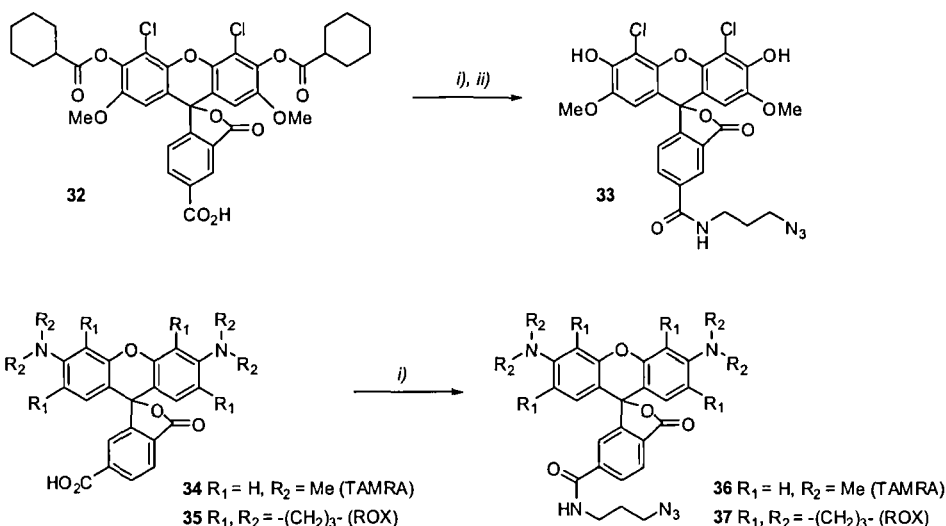


Схема 8

Реагенты и условия: *i*, DSC, CH_2Cl_2 ; 3-азидопропиламин, DMF, 12 ч; *ii*, водн. NH_3 , 12 ч.

Большинство применимых в молекулярной биологии флуоресцентно меченых олигонуклеотидов и зондов для ПЦР в режиме реального времени имеют метку на 5'-конце. Для удобного введения 5'-терминальной ацетиленовой группы нами был синтезирован реагент 39 (схема 9).

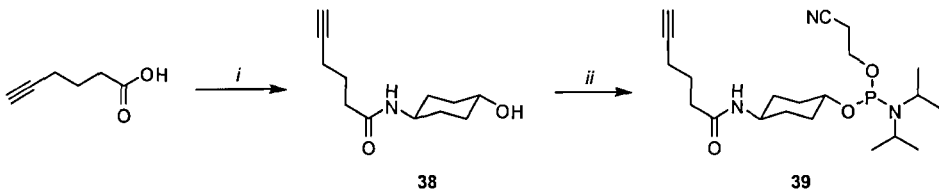


Схема 9

Реагенты и условия: *i*, PfpOH, DCC, EtOAc, 4 ч; гидрохлорид *транс*-4-аминоциклогексанола, триэтиламин, DMF, 12 ч. *ii*, 2-циантоксибис(диизопропиламино)фосфин, тетразолид диизопропиламмония, CH_2Cl_2 , 12 ч.

С использованием реагента 39 были синтезированы модельные олигонуклеотиды, на которых была продемонстрирована эффективность реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения для получения конъюгатов с азидопроизводными флуоресцентных красителей 22, 23, 28–31, 33, 36, 37. Было показано, что реакция [3+2]-диполярного циклоприсоединения, в отличие от реакции активированных эфиров с аминами, не требует больших избытков низкомолекулярного реагента. Мечение протекает полностью при использовании всего 1.2–2 экв азидопроизводного (рис. 1); при этом возможно легкое

масштабирование реакции на загрузки до 100 о.е. (>300 нмоль). С помощью реакции диполярного циклоприсоединения был синтезирован ряд флуоресцентно меченых олигонуклеотидов (рис. 2).

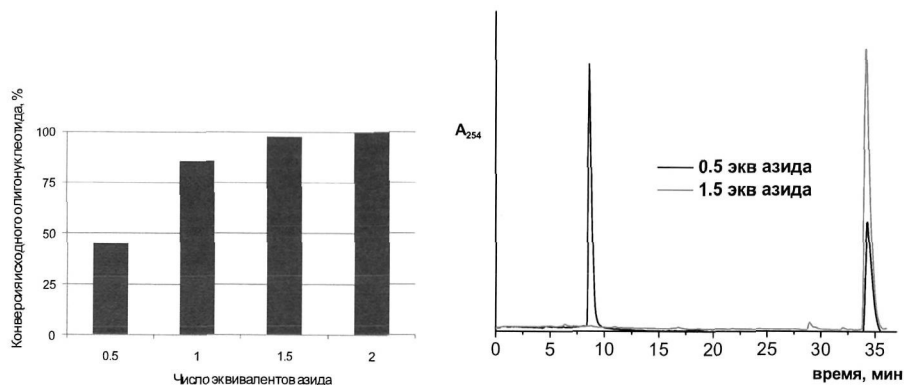


Рис. 1. Зависимость конверсии исходного олигонуклеотида от числа эквивалентов азиды **29** (слева); ВЭЖХ сырого продукта по окончании реакции циклоприсоединения (справа). Пик при 35 мин соответствует продукту, при 8 мин – исходному олигонуклеотиду.

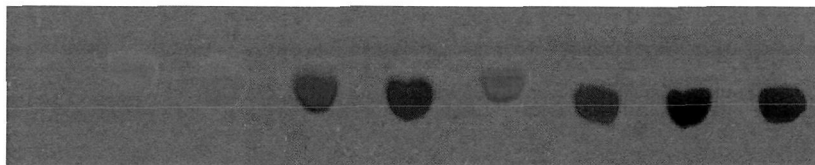


Рис. 2. Электрофореграммы очищенных продуктов циклоприсоединения (олигонуклеотид T_{10}). Изображение получено путем сканирования геля в видимом свете. Слева направо: красители перилен ($^{abs}\lambda_{max}$ 446 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 454 нм), FAM ($^{abs}\lambda_{max}$ 494 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 517 нм), JOE ($^{abs}\lambda_{max}$ 525 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 548 нм), TAMRA ($^{abs}\lambda_{max}$ 565 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 580 нм), Cy3 ($^{abs}\lambda_{max}$ 550 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 568 нм), ROX ($^{abs}\lambda_{max}$ 570 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 576 нм), Cy3.5 ($^{abs}\lambda_{max}$ 602 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 617 нм), Cy5 ($^{abs}\lambda_{max}$ 647 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 673 нм), Cy5.5 ($^{abs}\lambda_{max}$ 688 нм, $^{em}\lambda_{max}$ 711 нм).

Было продемонстрировано использование полученных с помощью реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения дважды-меченых зондов в ПЦР реального времени. По эффективности эти зонды не уступали образцам, синтезированным посредством мечения аминоксидифицированных олигонуклеотидов соответствующими активированными эфирами, и существенно превосходили образцы, полученные с использованием фосфамидитных производных цианиновых красителей (рис. 3). Бóльшая эффективность постсинтетического мечения в случае цианиновых красителей объясняется отсутствием контакта между лабильным цианиновым красителем и реагентами, используемыми в процессе наращивания цепи и для конечного деблокирования олигонуклеотида.

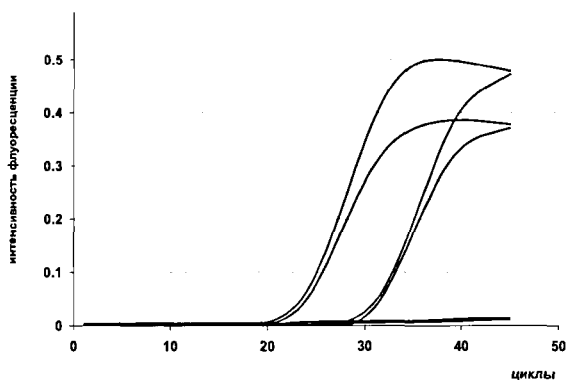


Рис. 3. Испытания зондов в модельной системе ПЦР реального времени. Красные кривые – зонд, полученный с помощью диполярного циклоприсоединения; синие кривые – с помощью фосфорамидита. Представлены три серии (отрицательный контроль, две концентрации мишени).

4. Синтез конъюгатов бисимида перилена-2,3,9,10-тетракарбоновой кислоты

Олигонуклеотидные конъюгаты бисимида перилена-2,3,9,10-тетракарбоновой кислоты (БПТК) представляют большой интерес с точки зрения их флуоресцентных свойств и способности к образованию триплексных ДНК-структур. Кроме того, производные БПТК проявляют интересные полупроводниковые свойства в органических полевых транзисторах и имеют перспективы использования в молекулярной электронике.

Существенной сложностью для получения таких конъюгатов является крайне низкая растворимость производных БПТК. Мы решили использовать реакцию [3+2]-диполярного циклоприсоединения, хорошо зарекомендовавшую себя в синтезе олигонуклеотидных производных малорастворимого азида **18**, для получения конъюгатов БПТК.

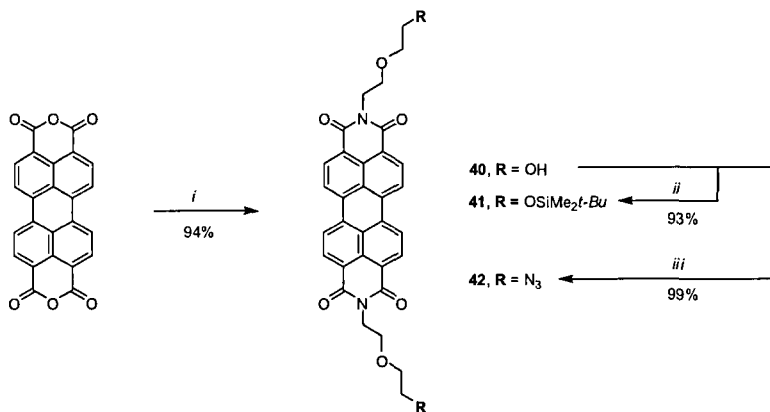


Схема 10

Реагенты и условия: *i*, 2-(2-аминоэтокс)этанол, 130°C, 3 ч; *ii*, (PhO)₂PON₃, Ph₃P, DEAD, THF; *iii*, TBDMSCl, Py, 75°C, 2 ч.

Синтез исходного диазида **42** показан на схеме 10. Диол **40** оказался недостаточно растворимым для характеристики посредством ЯМР; с целью характеристики он был переведен в описанный ранее силиловый эфир **41**. Попытки синтезировать диазид **42** с помощью мезилирования или тозилрования диола **40** и последующего нуклеофильного замещения в соответствующем сульфонате под действием азид-иона были неудачными, по-видимому, из-за низкой растворимости диола **40**. В результате, азид **42** был с высоким выходом синтезирован по реакции Мицунобу с использованием дифенилфосфорилиазида в качестве донора азидогруппы. Растворимость азида **42** в DMSO при 90°C составляет всего около 10^{-5} М; растворимость его в водно-органических фазах еще ниже. Тем не менее, с помощью реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения в 70% водном DMSO удалось достичь приемлемых (40–50%) выходов диаддуктов (табл. 3). Примечательно, что, изменяя соотношение азиды и ацетиленового олигонуклеотида, с помощью реакции циклоприсоединения можно получать как моно-, так и диаддукты. Структуры аддуктов были подтверждены данными масс-спектров MALDI-TOF (данные не приведены).

Таблица 3. Выходы полученных конъюгатов с диазидом **42**.

Исходный олигонуклеотид	Соотношение азид:олигонуклеотид	Моноаддукт		Диаддукт	
		шифр	выход, %	шифр	выход, %
ON1	1:2	A1M	0	A1D	41
ON2	1:2	A2M	0	A2D	59
ON3	1:2	A3M	29 [†]	A3D	9
ON1	1:1	A1M	36	A1D	42
ON2	1:1	A2M	35 [†]	A2D	35
ON3	1:1	A3M	40	A3D	11

[†] моноаддукт **A3M** является аномальным продуктом расщепления диаддукта (см. схему 11).

Интересно отметить, что в случае аддукта **A3D**, содержащего 3'-терминальную модификацию, в процессе реакции происходило гидролитическое расщепление одной из фосфодиэфирных связей диаддукта, сопровождавшееся образованием моноаддукта аномальной структуры и олигонуклеотидфосфата (схема 11). Продукты реакции были выделены с помощью гель-электрофореза и идентифицированы методом MALDI-TOF. Такой процесс гидролиза фосфодиэфирной связи не является типичным и особенно удивителен в свете стабильности как исходного олигонуклеотида **ON3**, так и образующегося аномального моноаддукта **A3M**. По-видимому, этот процесс связан с участием функциональных групп второй олигонуклеотидной цепи и является следствием особенностей вторичной структуры диконъюгата **A3D**.

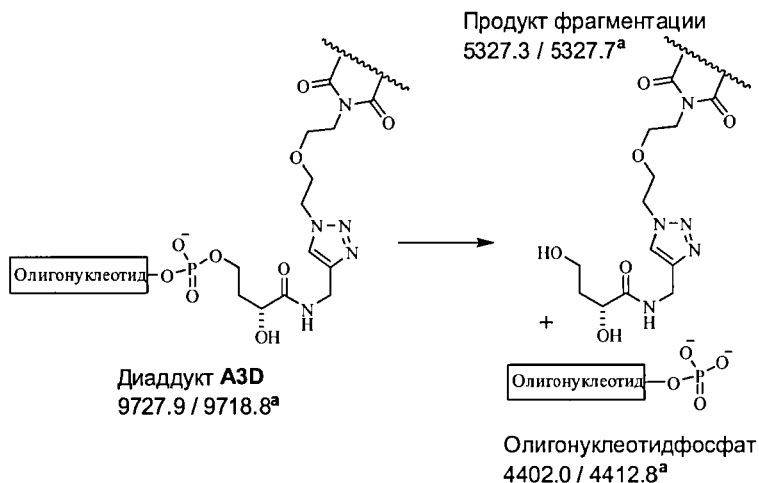


Схема 11. Фрагментация диаддукта A3D.

^a Результаты анализа MALDI-TOF (найдено / вычислено)

5. Синтез конъюгатов олигонуклеотидных триконъюгатов и сборка наноструктур на их основе

Высокая эффективность реакции [3+2]-диполярного циклоприсоединения, а также устойчивость исходных азидов и ацетиленов в условиях реакции позволили получить олигонуклеотидные триконъюгаты. Для конъюгации по **схеме 12** были синтезированы симметричные триазиды.

В качестве исходного нами было выбрано доступное соединение – розоловая кислота **43**. Ее восстановление боргидридом натрия привело к образованию C_{3v} -симметричного производного трифенилметана, которое через трифлат **45** и реакцию Соногаширы с гомопропаргильным спиртом было переведено в триол **46**. Из соединения **46** гидрированием был синтезирован восстановленный триол **47**. Из триолов **46** и **47** действием карбонилдимидазола были получены тримидазолиды, которые, без выделения, действием 2-(2-(2-азидозтокси)этокс)этиламина переводились в карбаматные азидопроизводные **48** и **49**. Эти производные имеют сходную структуру, но несколько различную жесткость линкеров. При этом линкеры имеют достаточно большую длину и гидрофильность, что способствует протеканию [3+2]-диполярного циклоприсоединения с ацетиленовыми олигонуклеотидами сразу по трем азидогруппам.

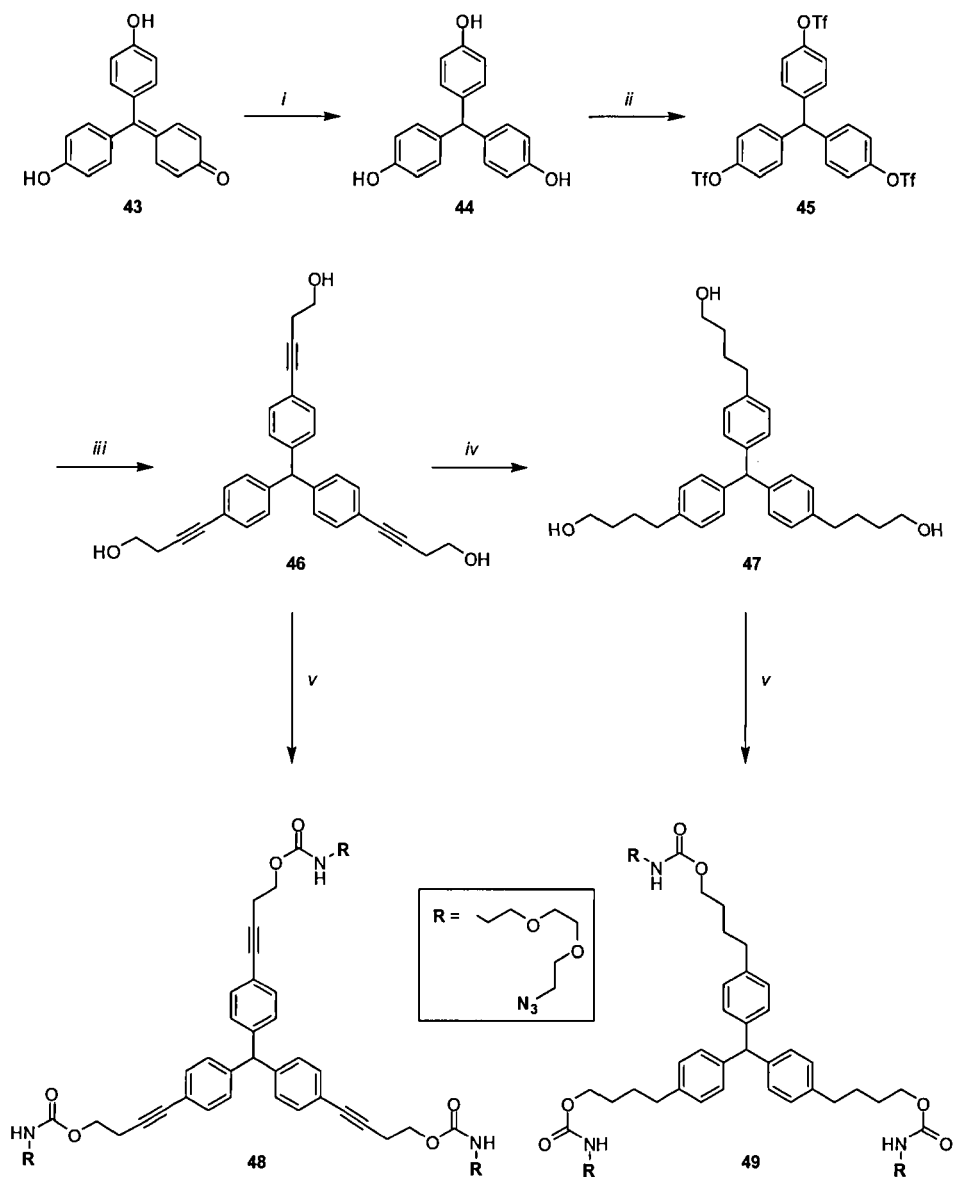


Схема 12

Реагенты и условия: *i*, NaBH_4 , EtOH, AcOH; *ii*, TiF_2O , Py, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 12 ч; *iii*, бутин-4-ол, Et_3N , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, DMF, 12 ч; *iv*, H_2 , 10% Pd/C, MeOH, 12 ч; *v*, *N,N*-карбонилдимидазол, CH_2Cl_2 , 5 ч; 2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этиламин, 12 ч.

Реакцию конъюгации проводили в отработанных на соединениях перилена условиях. Содержание DMSO в реакционной смеси, благодаря относительной гидрофильности исходных

азидов, стало возможным снизить до 20%. Продукт конъюгации выделяли гель-электрофорезом или ВЭЖХ. Типичная электрофореграмма продуктов реакции показана на **рис. 4**.

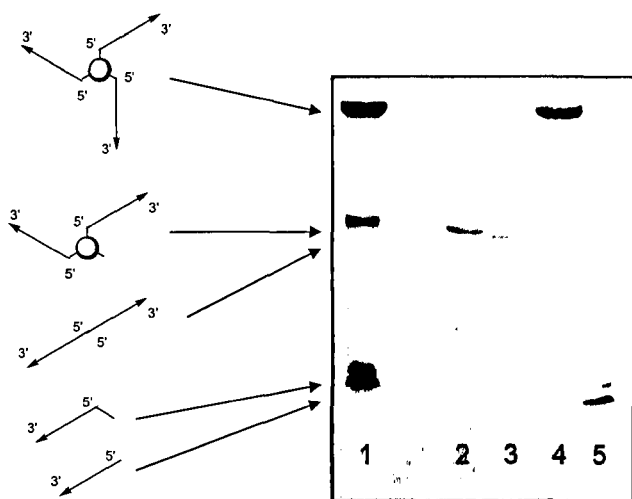


Рис. 4. Электрофоретический анализ реакции конъюгации азида **48** и олигонуклеотида **ON1**. Дорожки: 1. Реакционная смесь. 2–5. Выделенные ВЭЖХ продукты: 2 и 3 – побочные продукты реакции (диаддукт, продукт окислительного сдвигания ацетиленового олигонуклеотида); 4 – целевой триаддукт, 5 – исходный ацетилен + продукт гидролиза карбаматной связи.

В ходе реакции в некоторой степени протекали процессы, приводившие к образованию побочных продуктов: окислительная димеризация ацетиленовых олигонуклеотидов и гидролиз карбаматной связи в аддуктах (**схема 13**). Выход целевых триконъюгатов (**табл. 4**), после выделения с помощью гель-электрофореза, составил около 40%. Их структуры подтверждены масс-спектрами MALDI-TOF (данные не приведены).

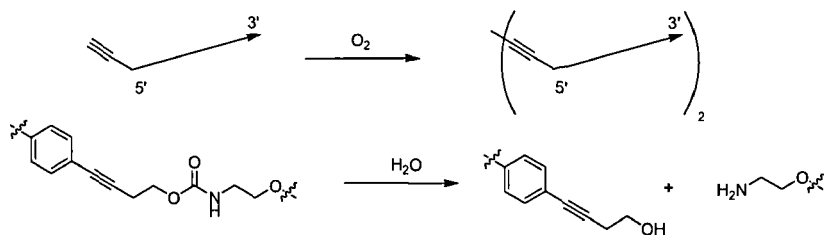


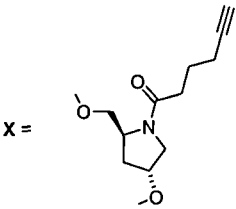
Схема 8

Было предпринято исследование поведения данных триконъюгатов в условиях гибридизации с комплементарными последовательностями. Предполагалось, что гибридизация

конъюгатов, содержащих комплементарные последовательности, может приводить к образованию дискретных или периодических ДНК-наноструктур.

Таблица 4. Триконъюгаты олигонуклеотидов.*

Продукт	Исходный олигонуклеотид	Исходный азид
AR1	XCA-TTA-CAT-CCA-GAC	48
AR2	XGT-CTG-GAT-GTA-ATG	48
AF1	XCA-TTA-CAT-CCA-GAC	49
AF2	XGT-CTG-GAT-GTA-ATG	49



* Реагент для введения ацетиленовой модификации был любезно предоставлен И.А. Прохоренко

ДНК-наноструктуры интересны с точки зрения создания на их основе систем детекции биомолекул и электронных устройств нового типа.

Большинство полученных к настоящему моменту наноструктур имеют в своем составе немодифицированные ДНК-последовательности. В то же время очевидно, что включение в их состав химических модификаций и точек разветвления может существенно увеличить их разнообразие и функциональность.

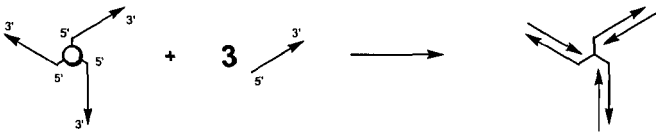


Схема 14

В первую очередь была изучена гибридизация триаддуктов с комплементарными олигонуклеотидами (схема 14; здесь и далее комплементарные олигонуклеотиды обозначены разноцветными стрелками). Однородность образующихся двухцепочечных звездообразных структур была доказана электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с визуализацией SYBR Green I – красителем, специфичным для двухцепочечной ДНК (рис. 5).



Рис. 5. Электрофоретический анализ звездообразных (см. схему 14) структур в 1%-ном агарозном геле. Дорожки: 1. AR1+ON2; 2. AF1+ON2; 3. AR1+ON2; 4. AF1+ON2; 5. Маркер молекулярной массы; подвижность конъюгатов соответствует линейной ДНК длиной около 100 п.о.

Гибридизация двух комплементарных аддуктов представляет собой более интересный случай по причине многообразия возможных наноструктур — как дискретных, так и полимерных.

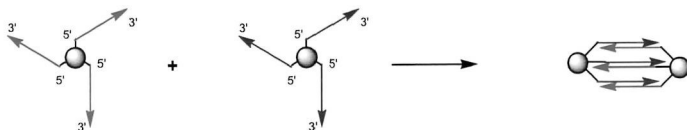


Схема 15

Простейшей из возможных структур является «наноацетилен» — напоминающая органическую молекулу ацетилена структура, состоящая из двух точек разветвления, соединенных тремя двухспиральными доменами ДНК (схема 15).

Другим предельным случаем является образование полимерной графитоподобной структуры (схема 16). Следует отметить, что помимо предельных случаев, возможно образование бесконечного множества олигомерных структур, содержащих различное число молекул конъюгатов.

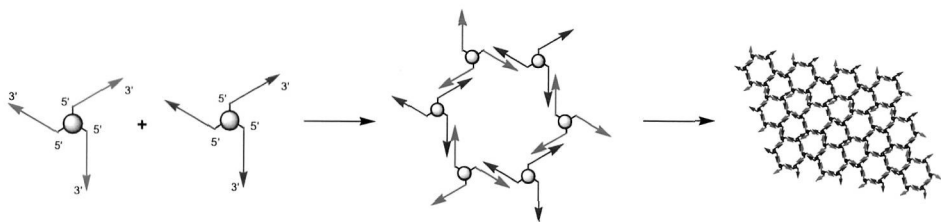


Схема 16

Конъюгаты готовили к гибридизации путем очистки их гель-электрофорезом или ВЭЖХ и обессоливания на сефадексе в бессолевым буфере. Гибридизацию проводили в концентрации компонентов 5×10^{-6} М посредством нагревания смеси олигонуклеотидных конъюгатов до 95°C и последующего быстрого охлаждения до комнатной температуры. Смесь анализировали с помощью гель-электрофореза в агарозном геле.

Оказалось, что гибридизация конъюгатов в воде приводит почти нацело к образованию «наноацетилен». Присутствие солей Mg^{2+} в концентрации 0.5 М способствует практически полной полимеризации (рис. 6). Использование вместо Mg^{2+} других ионов металлов приводит к промежуточным результатам — образованию олигомеров наряду с «наноацетиленом» и полимером.

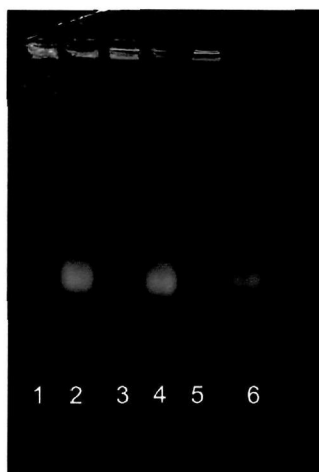


Рис. 6. Различия продуктов гибридизации триаддуктов в присутствии и в отсутствие Mg^{2+} . Дорожки: 1. $\text{AF1}+\text{AR2}$, 0.5 М Mg^{2+} ; 2. $\text{AF1}+\text{AR2}$; 3. $\text{AF1}+\text{AF2}$, 0.5 М Mg^{2+} ; 4. $\text{AF1}+\text{AF2}$; 5. $\text{AR1}+\text{AR2}$, 0.5 М Mg^{2+} ; 6. $\text{AR1}+\text{AR2}$. Для компенсации артефактов электрофореза, связанных с различным ионным составом образцов, концентрация Mg^{2+} во всех смесях перед нанесением на гель была уравнена посредством его добавления в те образцы, которые его не содержали.

Для объяснения этого результата мы использовали аналогию с электростатическим отталкиванием одноименных зарядов. Олигонуклеотидные конъюгаты имеют отрицательный заряд в водных растворах при нейтральных значениях pH. Образование олиго- и полимерных структур способствует концентрированию одноименного заряда в небольшом объеме. Поэтому в растворах с низкой ионной силой (например, в деионизированной воде) этот процесс становится энергетически невыгодным, и образуются структуры наименьшего размера. При увеличении ионной силы эффект концентрирования заряда нивелируется (особенно этому способствуют двухзарядные ионы магния), и решающий вклад начинают вносить другие факторы, такие как необходимость деформации молекулы триконъюгата для образования наноацетилена. Очевидно, эти факторы способствуют полимеризации.

Образование слоя полимера при смешении комплементарных конъюгатов было доказано методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). С помощью АСМ в контактном режиме монослой полимера был процарапан и измерена его толщина. Она составила ~2 нм, что хорошо согласуется с литературными данными о толщине ДНК-дуплекса (рис. 7). Однако разрешить сетчатость структуры полимера с помощью АСМ не удалось даже в тэппинговом режиме.

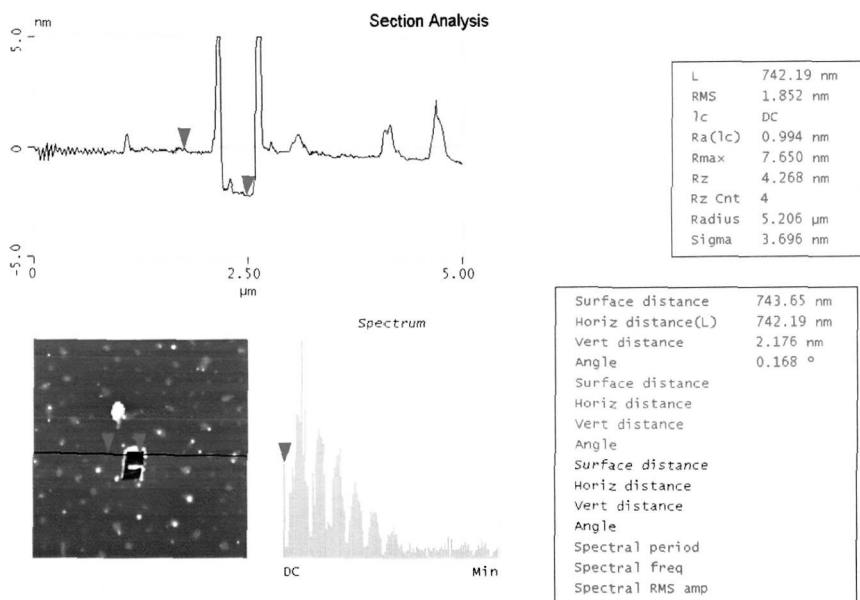


Рис. 7. АСМ изображение (контактный режим) монослоя полимера, полученного по **схеме 15**. Измеренная толщина процарапанного иглой монослоя составляет ~2.2 нм.

Для преодоления этой сложности нами была проведена гибридизация триконъюгата **AR1** с комплементарным диконъюгатом БПТК **A2D** (**схема 17**). Простой расчет показывает, что размер

пор для такого «наногрфита», в допущении его идеальной гексагональной симметрии, должен составлять порядка 11 нм (против 5 нм в случае полимера из двух комплементарных триконъюгатов).

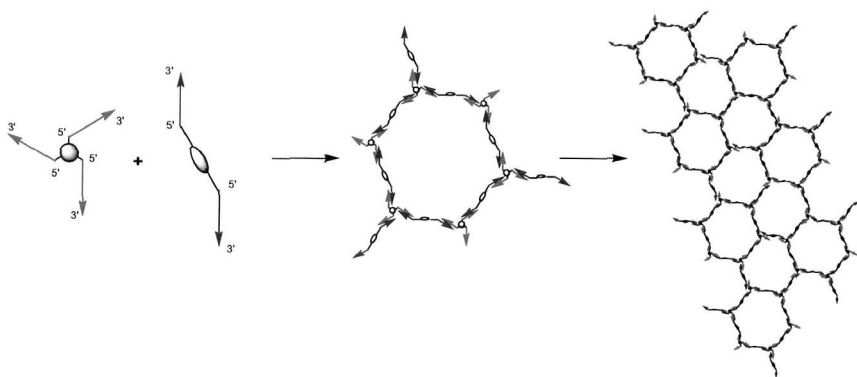


Схема 17

Смесь двух конъюгатов после отжига в присутствии соли Mg^{2+} была нанесена на подложку из атомарно гладкой слюды. АСМ изображение образца показано на **рис. 8**. В то время как теоретическая гексагональная структура полимера подверглась существенному искажению (по-видимому, за счет недостаточной жесткости линкеров конъюгатов), ее ячеистая структура отчетливо видна. Толщина монослоя составляет 2 нм, что согласуется с представлениями о диаметре ДНК-дуплекса.

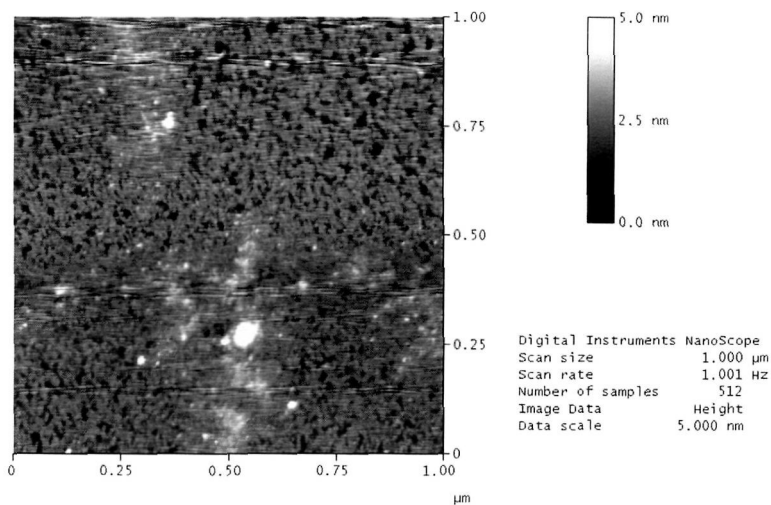


Рис. 8. АСМ изображение (тэппинговый режим) монослоя полимера, полученного по **схеме 17**. Толщина монослоя – около 2 нм.

ВЫВОДЫ

1. Синтезировано три амидофосфитных реагента и твердофазный носитель для получения олигонуклеотидов, содержащих терминальную ацетиленовую группу. Синтезированы азидопроизводные десяти флуоресцентных красителей.
2. Синтезированы 3'- и 5'-терминальные ацетиленовые производные олигонуклеотидов, и с помощью реакции диполярного циклоприсоединения с высокими выходами получены их конъюгаты с флуоресцентными красителями, в том числе зонды для ПЦР.
3. Синтезированы олигонуклеотидные диконъюгаты бисимида перилена-2,3,9,10-тетракарбоновой кислоты (БПТК), а также триконъюгаты олигонуклеотидов с органическими триазидами.
4. Изучена гибридизация олигонуклеотидных конъюгатов БПТК и триолигонуклеотидных конъюгатов, сопровождающаяся образованием дискретных и полимерных ДНК-наноструктур.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Устинов А.В., Коршун В.А. Олигонуклеотиды, содержащие остатки арилацетилена: синтез и постсинтетическая модификация с помощью 1,3-диполярного циклоприсоединения. *Изв. АН, Сер. хим.*, **2006** (7), 1220–1226 (Ustinov A.V., Korshun V.A. Oligonucleotides containing arylacetylene residues: synthesis and post-synthetic modification via [3+2] cycloaddition. *Russ. Chem. Bull.*, **2006** (7), 1268–1274.)
2. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., Korshun V.A. Perylene diimide-oligonucleotide conjugates constructed by click chemistry. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **26** (6/7), 751–754 (2007).
3. Kvach M.V., Prokhorenko I.A., Ustinov A.V., Gontarev S.V., Shmanai V.V., Korshun V.A. Reagents for the selective immobilization of oligonucleotides on solid supports. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **26** (6/7), 809–813 (2007).
4. Kvach M.V., Tsybulsky D.A., Ustinov A.V., Stepanova I.A., Bondarev S.L., Gontarev S.V., Korshun V.A., Shmanai V.V. 5(6)-Carboxyfluorescein revisited: new protecting group, separation of isomers, and their spectral properties on oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.*, **18** (5), 1691–1696 (2007).
5. Kvach M.V., Ustinov A.V., Stepanova I.A., Malakhov A.D., Skorobogatyi M.V., Shmanai V.V., Korshun V.A. Convenient synthesis of cyanine dyes: reagents for labeling of biomolecules. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008** (12), 2107–2117.
6. Ustinov A.V., Dubnyakova V.V., Korshun V.A. A convenient “click chemistry” approach to perylene diimide-oligonucleotide conjugates. *Tetrahedron*, **64** (7), 1467–1473 (2008).

Тезисы конференций

1. Устинов А.В., Астахова И.В., Квач М.В., Шманай В.В., Стеценко Д.А., Дюбанкова Н.Н., Коршун В.А., Малахов А.Д. Молекулярный конструктор: расширение возможностей

- нанотехнологии нуклеиновых кислот. XVII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, 2005, 64.
2. **Устинов А.В.**, Квач М.В., Шманай В.В., Коршун В.А. Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие этилильную группу: синтез и реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения к азидам. XVIII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, 2006, 63.
 3. **Ustinov A.**, Dubnyakova V., Korshun V. Click chemistry on DNA: a versatile tool for nanotechnology and photonics. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Conference Book. Bern, Switzerland, 2006, 103.
 4. Kvach M., Prokhorenko I., **Ustinov A.**, Gontarev S., Korshun V., Shmanai V. Reagents for selective conjugation of oligonucleotides. XVII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Conference Book. Bern, Switzerland, 2006, 137.
 5. **Устинов А.В.**, Квач М.В., Дубнякова В.В., Прохоренко И.А., Шманай В.В., Коршун В.А. Реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения в синтезе модифицированных олигонуклеотидов и ДНК-наноструктур. Международная конференция "Физико-химическая биология", посвященная 80-летию академика Д.Г. Кнорре. Сборник трудов. Новосибирск, 2006, 177.
 6. Dubnyakova V.V., **Ustinov A.V.**, Korshun V.A. Branching and joining by click chemistry: where bioconjugation meets nanotechnology. Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School "Novel Synthetic Nucleic Acids and the Targeting of Biologically Important RNAs". Abstracts. Odense, Denmark, 2007, P-17.
 7. Дубнякова В.В., **Устинов А.В.**, Коршун В.А. Самосборка биоконъюгатов органических азидов с ДНК с образованием наноструктур. XX Зимняя международная молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений. Москва, 2008, 86.
 8. Квач М.В., **Устинов А.В.**, Цыбульский Д.А., Коршун В.А., Шманай В.В. Флуоресцентные реагенты для меченя биополимеров. IV Съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Сборник материалов. Новосибирск, 2008, 277.
 9. **Устинов А.В.**, Дубнякова В.В., Квач М.В., Шманай В.В., Коршун В.А. Модифицировать или не модифицировать? ДНК-наноструктуры, содержащие необычные точки разветвления. IV Съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Сборник материалов. Новосибирск, 2008, 312.

Заказ № 45/02/2009 Подписано в печать 20.02.2009 Тираж 100 экз. Усл. пл. 1,0



ООО "Цифровичок", тел. (495) 649-83-30; (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru