



УДК 547.963.32/466.057

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И НУКЛЕОТИДОПЕПТИДЫ

11*. ПРОСТЕЙШИЕ СИНТЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ФРАГМЕНТОВ ДНК
С ПЕПТИДНЫМИ ВКЛЮЧЕНИЯМИ

Юодка Б. А., Кирвялене В. А.

Вильнюсский государственный университет им. В. Каспукаса

DCC-методом синтезированы нуклеотидопептиды, в которых два нуклеотидных остатка соединены аминокислотой (пептидом) с образованием фосфоамидной и фосфодиэфирной или фосфоамидной и амидной связей. Показано, что наиболее перспективным подходом для синтеза нуклеотидопептидов первого типа является соединение двух исходных нуклеотидопептидов пептидной связью. Строение полученных соединений доказано реакциями с гидроксиламинном (рН 4,75), данными УФ-спектроскопии, гидролиза щелочного, кислотного и фосфодиэстеразой змеиного яда. Установлено, что присоединение нуклеотида к аминокислотному остатку нуклеотидопептида не оказывает существенного влияния на гидролитическую устойчивость фосфоамидной и фосфодиэфирной связей.

За последние 10 лет получено много экспериментальных данных, подтверждающих существование ковалентных нуклеиново-белковых структур [1—11]. В одних случаях нуклеиновые кислоты постоянно содержат ковалентно присоединенные белки [6—9], в других такие структуры образуются как промежуточные соединения при действии на нуклеиновые кислоты некоторых ферментов [10, 11].

В 60-е годы появилась гипотеза о существовании пептидных фрагментов в молекуле двухцепочечной ДНК [12, 13]. Наиболее вероятным считалось образование сложноэфирной и фосфодиэфирной (фосфоамидной) связей между полипептидом и двумя полинуклеотидными фрагментами. В последнее время стали накапливаться данные о возможности существования полипептидных включений в хромосомной ДНК из эукариотических клеток различного происхождения [14—23]. В данном случае предполагается, что полипептидные остатки (~1% веса ДНК [18]) расположены в антипараллельных цепях ДНК не случайно [15], зигзагообразно, причем величина фрагмента ДНК между ними составляет $8,5 \cdot 10^3$ кДа [16, 17]. Молекулярная масса полипептидов во всех исследованных случаях равнялась 54—68 кДа [18, 19]. Химическая устойчивость данных соединений и чувствительность к действию фосфодиэстеразы аналогичны свойствам синтетических модельных фосфодиэфиров, причем предполагалось, что оба фрагмента ДНК присоединены к полипептиду через остаток фосфорной кислоты [20]. Такие структуры выделены из различных эукариотических систем, поэтому не исключено, что это свойство универсально [19]. Белковые мостики в ДНК, возможно, существенные компоненты структур высшего уровня и/или принимают участие в прикреплении ДНК к структурам ядра [16, 21, 22].

Гипотеза о пептидных включениях в ДНК затрагивает принципы организации важнейших биополимеров, поэтому исследования, способ-

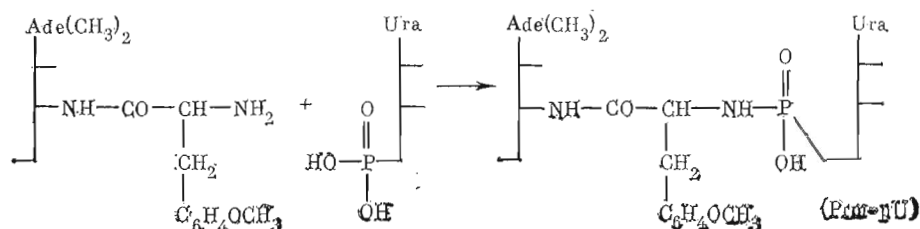
* Сообщение I см. [1].

Принятые сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид; Pm-pU — уридиллил-(5' → N)-пуриноцин; dTrp-Ser(pdC)-OMe — метиловый эфир дезокситимидиллил-(3' → N)-DL-серил-(O ← 5')-дезокситимидиловой кислоты; dTrp-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe — метиловый эфир дезокситимидиллил-(3' → N)-DL-аланил-DL-валил-[(O³ ← 5')-дезокситимидиллил]-DL-серина; U5'p-Tyr-OEt — этиловый эфир уридиллил-(5' → N)-DL-тирозина; dTrp-Ala-Val-OH и dTrp-Ala-Val-OEt — дезокситимидиллил-(3' → N)-DL-аланил-DL-валин и его этиловый эфир; H-Ser(pdC)-OMe и Z-Ser(pdC)-OMe — метиловый эфир уридиллил-(5' → O)-DL-серина и -N-бензилоксикарбонил-DL-серина.

ствующие установлению структуры комплексов нуклеиновых кислот и белков, являются важной задачей. Ценную информацию для решения этой проблемы дает изучение синтетических нуклеотидопептидов. Синтез и свойства простейших нуклеотидопептидов суммированы в обзорах Шабаровой [24] и Юодки [1, 5, 25].

Ранее был осуществлен синтез соединений, моделирующих пептидные мостики в ДНК с фосфоамидной и сложноэфирной связями между остатками аминокислоты и нуклеотида [26, 27]. Однако свойства полученных моделей не исследовались. В настоящей работе синтезированы нуклеотидопептиды, в которых два нуклеотида соединены остатком аминокислоты (пептида) с образованием фосфоамидной и фосфодиэфирной или фосфоамидной и амидной связей, а также исследована их гидролитическая устойчивость.

Для выяснения влияния присоединения нуклеозида к аминокислотному остатку нуклеопротеида на реакционную способность фосфоамидной связи последнего мы синтезировали по методу [26] уридил-(5' → N)-пуромицин:

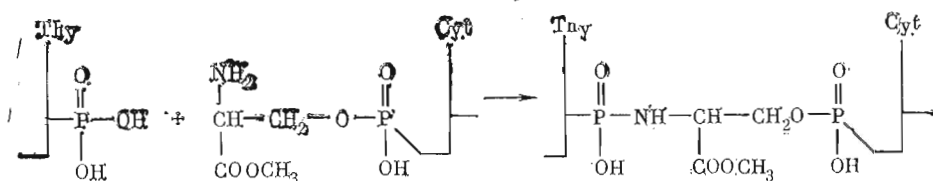


Данное соединение моделирует предполагаемые природные фрагменты нуклеиновых кислот с пептидными включениями, в которых связи нуклеотид — аминокислота являются сложноэфирной и фосфоамидной. В пууромицине сложноэфирная связь заменена на более устойчивую — амидную за счет замены 3'-ОН-группы рибозы на 3'-NH₂-группу. На уровне олигонуклеотидов показано, что замена О-атома на N-атом не оказывает влияния на свойства остальных связей [28, 29]. Применение пууромицина позволило избежать побочных реакций, затрудняющих синтез динуклеотидопептида, и облегчило исследование свойств фосфоамидной связи.

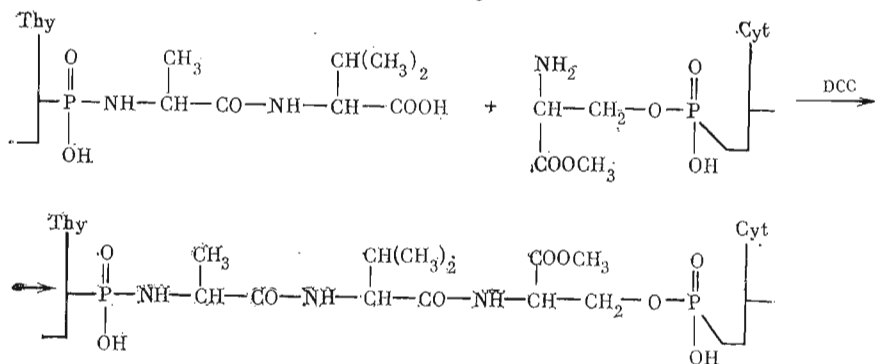
Нуклеотидопептиды с фосфоамидной и фосфодиэфирной связями в одной молекуле моделируют природные фрагменты, в которых оба конца полипептидного включения присоединены к фрагментам ДНК через остаток фосфорной кислоты. Для получения модельных соединений такого типа возможны три подхода:

1) присоединение нуклеотида к нуклеотидил-(P → N)-аминокислоте (пептиду) с образованием фосфодиэфирной связи. Этот путь неперспективен ввиду слабой нуклеофильности гидроксильной группы оксиаминокислот и неустойчивости фосфоамидов в условиях образования фосфодиэфирной связи;

2) присоединение нуклеотида к нуклеотидил-(P → O)-оксиаминокислоте (пептиду) с образованием фосфоамидной связи. Таким путем мы синтезировали dTp-Ser(pdC)-OMe:



3) соединение двух исходных нуклеотидопептидов пептидной связью. Результаты синтеза dTp-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe показали, что такой подход является предпочтительным:



Синтез этого соединения проводился в условиях, разработанных на примере наращивания пептидного фрагмента в нуклеотидопептидах фосфоамидного типа [30].

Структура полученных соединений установлена по результатам определения соотношения гетероциклические основания — фосфор — аминокислоты (полный кислотный гидролиз 6 н. HCl, 100° С, 6 ч), УФ-спектров, а также расщепления специфическими агентами. Все нуклеотидопептиды фосфодиэфирного типа расщеплялись фосфодиэстеразой змеиного яда, а фосфоамидного типа — 1 М NH₂OH (рН 4,75; 37° С) (в случае Prm-pU $t_{1/2}$ = 280 мин, в случае dTr-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe $t_{1/2}$ = 80 мин). Некоторые характеристики приведены в таблице.

Гидролитическая устойчивость нуклеотидопептидов. Выводы о структуре природных соединений белков и нуклеиновых кислот основаны на результатах расщепления специфическими агентами и гидролиза в растворах кислот и оснований [5]. Поэтому мы исследовали зависимость скорости расщепления связи аминокислота — нуклеотид от рН среды в нуклеотидопептидах, моделирующих пептидные включения в нуклеиновых кислотах. Оказалось, что они устойчивы в тех же условиях, что и нуклеотидопептиды с более простой структурой: в кислой среде расщепляется фосфоамидная связь, в щелочной — фосфодиэфирная (рис. 1).

dTr-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe, соединение, в котором содержатся и фосфоамидный и фосфодиэфирный узлы, устойчиво при рН 2,5—12 (37° С, 1 ч). В щелочной среде (рН > 12) расщепляются фосфодиэфирная и сложнэфирная связи. Ранее показано [31], что удлинение пептидной цепи с С-конца в производных нуклеотидил-(P → O)-2-оксиаминокислот не оказывает влияния на скорость расщепления фосфодиэфирной связи. Сравнение гидролитической устойчивости dTr-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe и

Некоторые характеристики исходных и синтезированных соединений

Соединение *	R_f в системах			E_{NMP}^{**}		λ_{max}	ϵ_{max}	Соотношение гетероциклические основания : фосфор : аминокислоты
	А	Б	В	рН 2,5	рН 7,5			
P-5'-Urd	0,05	0,46	0,20	1,00	1,00	261	9700	—
dThd-3'-P	0,14	0,39	0,37	1,00	1,00	267	9600	—
Пуромицин	0,86	0,90	0,81	-1,10	0,04	268	19 500	—
dTr-Ala-Val-OH	0,42	0,38	—	0,70	0,95	267	9600	—
H-Ser(pdC)-OMe	0,33	0,29	—	-0,70	0,37	280	13 200	—
Prm-pU	0,46	0,51	0,62	0	0,37	265	28 250	1 : 1,05 : 1,02
dTr-Ser(pdC)-OMe	—	0,41	—	0,52	0,90	274	20 900	1 : 1,09 : 1,04 : : 1,18
dTr-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe	—	0,45	—	0,50	0,90	274	20 900	1 : 1,05 : 2,12 : : 0,94 : 1,03 : : 1,03

* Аминокислоты DL-конфигурации.

** Электрофоретическая подвижность определена относительно UMP или dTMP.

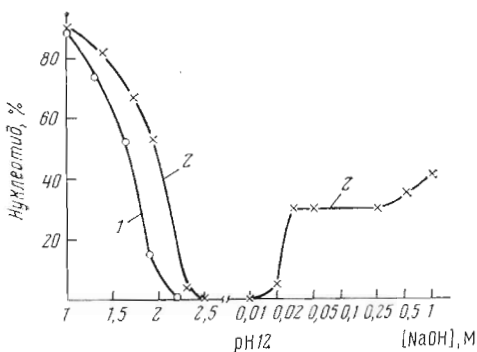


Рис. 1. Выход продуктов расщепления Prm-pU (1) и dTrp-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe (2) в зависимости от pH среды (37° С, 1 ч)

остатка 3'-дезоксигуанидин-3'-амино-N⁶-диметиладенозина. Можно было ожидать, что присоединение большого нуклеозидного остатка окажет более выраженное влияние. Видимо, решающим оказалось ранее выявленное свойство: устойчивость фосфоамидной связи в нуклеотидопептидах определяется главным образом структурой аминокислоты, непосредственно участвующей в образовании фосфоамидной связи [30]. Так как в данном случае этой аминокислотой является тирозин, радикал которого отличается значительным пространственным эффектом, присоединение нуклеозида решающего значения не имеет.

Не исключено также, что важное значение для свойств фосфоамидного узла в нуклеотидопептидах имеет гидрофобность окружения связи аминокислота — нуклеотид. В рассматриваемых соединениях типа пептидных включений к аминокислотному остатку нуклеотидопептида присоединен гидрофильный остаток нуклеозида или нуклеотида. В Prm-pU и особенно в dTrp-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe создаются несущественные дополнительные препятствия для подхода молекул воды к фосфоамидному центру по сравнению с U5'p-Tyr-OEt и dTrp-Ala-Val-OEt соответственно, а следовательно, и скорость гидролиза фосфоамидной связи почти не изменяется.

Таким образом, установлено, что присоединение остатка нуклеозида или нуклеотида к аминокислотному остатку нуклеотидопептида не оказывает решающего влияния на устойчивость фосфоамидной и фосфодиэфирной связей в кислой и щелочной средах. Поэтому закономерности,

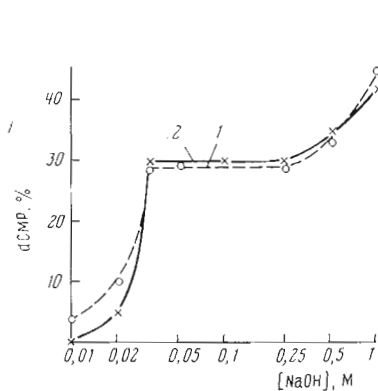


Рис. 2

Рис. 2. Накопление dCMP при расщеплении dTrp-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe (1) и Z-Ser(pdC)-OMe (2) в зависимости от концентрации щелочи (37° С, 1 ч)

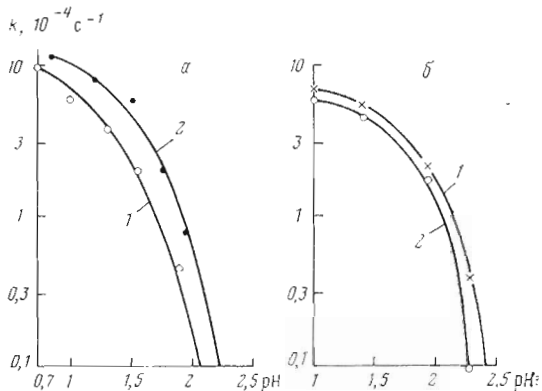


Рис. 3

Рис. 3. Скорость расщепления фосфоамидной связи в синтезированных нуклеотидопептидах в зависимости от кислотности среды (37° С). а: Prm-pU (1), U5'p-Tyr-OEt (2). б: dTrp-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe (1), dTrp-Ala-Val-OEt (2). Данные по расщеплению U5'p-Tyr-OEt взяты из работы Юодки и соавт. [32]

установленные для нуклеотидил-(P → N)- и нуклеотидил-(P → O)-оксиаминокислот (пептидов) должны проявляться и в ряду нуклеотидопептидов, моделирующих пептидные включения. Полученные нами данные важны для исследователей, изучающих структурную организацию ковалентных нуклеиново-белковых комплексов, особенно эукариотического генома. Предполагается [33], что именно в нем петли ДНК ковалентно прикрепляются к матриксу ядра. Эти петли, по-видимому, и являются репликаонами эукариотических клеток.

Авторы благодарят К. Саваневские (ВГУ) за синтез дезокситимидил-3'-фосфата и К. Константиновичюса (Институт биохимии АН ЛитССР) за участие в обсуждении полученных результатов.

Экспериментальная часть

В работе использовались DCC (Ferak Berlin, Зап. Берлин), dT, DL-Ala-DL-Val, DL-Ser, дигидрохлорид пуromицина (Reanal, ВНР), гидроксиламины солянокислый (Chemapol, ЧССР), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1; Koch Light Laboratories Ltd, Великобритания), бумага FN-2 и FN-3 (Filtrak, ГДР), dCMP и другие реактивы отечественного производства.

По ранее описанным методикам проводился синтез dTp-Ala-Val-OEt и dTp-Ala-Val-OH [34], Z-Ser(pdC)-OMe, H-Ser(pdC)-OMe [31] и расщепление фосфодиэстеразой [31], реакция с NH₂OH [28] и гидролиз полученных нуклеотидопептидов при различных pH [31]. Периоды полупревращения соединений под действием NH₂OH определялись по формуле $t_{1/2} = \ln 2/k$, где k — константа скорости реакции первого порядка.

Системы для БХ: (CH₃)₂CHOH—NH₄OH—H₂O, 7 : 1 : 2 (А); (CH₃)₃COH—H₂O, 7 : 3 (Б); CH₃(CH₂)₃OH—CH₃COOH—H₂O, 5 : 2 : 3 (В). Системы для электрофореза: 0,05 М HCOOH, pH 2,7 (А); 0,05 М ТЕАВ, pH 7,5 (Б). Для электрофореза использовали вертикальный высоковольтный прибор фирмы Labor (ВНР). Градиент напряжения 25—30 В/см, время проведения 45—90 мин. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Spesord (ГДР).

Уридилл-(5' → N)-пуromицин. 0,1 ммоль UMP (H-форма) и 0,1 ммоль дигидрохлорида пуromицина растворяли в смеси 1 мл H₂O — 3 мл (CH₃)₃COH. Добавляли 42 мкл (0,3 ммоль) триэтиламина и реакционную смесь нагревали до кипения. В кипящий раствор добавляли 103 мг (0,5 ммоль) DCC и кипятили 1 ч. Ptm-pU выделяли методом БХ в системе А. Выход 0,05 ммоль (50%).

Метилловый эфир дезокситимидилл-(3' → N)-DL-аланил-DL-валил-[(O³ ← 5')-дезоксцитидилл]-DL-серина. К раствору 20 мкмоль триоктиламмониевой соли dTp-Ala-Val-OH и 20 мкмоль триоктиламмониевой соли H-Ser(pdC)-OMe в 0,4 мл абс. диметилформамида добавляли 21 мг (100 мкмоль) DCC. Реакционную смесь инкубировали 20 ч при 37°С. Продукт выделяли методом электрофореза на бумаге при pH 2,5. Выход dTp-Ala-Val-Ser(pdC)-OMe 9 мкмоль (45%).

Аналогичным способом из 15 мкмоль dTp и 15 мкмоль H-Ser(pdC)-OMe получен dTp-Ser(pdC)-OMe. Выход 1,5 мкмоль (10%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Юодка В. А. Nucleosides and Nucleotides, 1984, v. 3, № 5, p. 445—496.
2. Юодка В. А. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1445—1465.
3. Дрыгин Ю. Ф. В кн.: Итоги науки и техники. Молекулярная биология. М.: ВИНТИ, 1982, т. 17, с. 139—189.
4. Вартапетян А. Б. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 12, с. 1581—1606.
5. Юодка В. А. Ковалентные нуклеиново-белковые структуры и их химическое моделирование. Вильнюс: Мокслас, 1985. 176 с.
6. Challberg M. D., Kelly T. J. Annual Rev. Biochem., 1982, v. 51, p. 901—934.
7. Wimmer E. Cell, 1982, v. 28, № 2, p. 199—201.
8. Tatanoi F., Stillman B. W. Current Topics Microbiol. Immunol., 1983, v. 109, p. 75—87.
9. Salas M. Current Topics Microbiol. Immunol., 1983, v. 109, p. 89—106.
10. Geider K., Hoffman-Berling H. Annual Rev. Biochem., 1981, v. 50, p. 233—260.
11. Wang J. C. Annual Rev. Biochem., 1985, v. 54, p. 665—697.
12. Бендик А., Розенкранц Г. В. В кн.: Нуклеиновые кислоты. М.: Мир, 1965, с. 245—257.
13. Дрыгин Ю. Ф., Богданов А. А., Прокофьев М. А. Химия природн. соедин., 1966, № 3, с. 218.

14. Hershey H. V., Werner D. *Nature*, 1976, v. 262, № 5564, p. 148—150.
15. Werner D., Hadjiolov D., Hershey H. V. *Chem.-Biol. Interactions*, 1981, v. 37, № 3, p. 279—287.
16. Werner D., Krauth W., Hershey H. V. *Biochim. et biophys. acta*, 1980, v. 608, № 2, p. 243—258.
17. Werner D., Hadjiolov D., Neuer B. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, v. 100, № 3, p. 1047—1054.
18. Krauth W., Werner D. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 564, № 3, p. 390—401.
19. Werner D., Petzelt C. J. *J. Mol. Biol.*, 1981, v. 150, № 2, p. 297—302.
20. Neuer B., Plagens U., Werner D. *J. Mol. Biol.*, 1983, v. 164, № 2, p. 213—235.
21. Werner D., Zimmermann H.-P., Rauterberg E., Spalinger J. *Exp. Cell. Res.*, 1981, v. 133, № 1, p. 149—157.
22. Nehls P., Rajevsky M. F., Spiess E., Werner D. *EMBO J.*, 1984, v. 3, № 2, p. 327—332.
23. Werner D., Chanpu S., Müller M., Spiess E., Plagens U. *J. Exp. Cell. Res.*, 1984, v. 151, № 3, p. 384—395.
24. Shabarova Z. A. In: *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*/Eds Davidson I. N., Cohn W. E. N. Y.: Acad. Press, 1970, v. 10, p. 145—182.
25. Юодка Б. А. *Биооргани. химия*, 1984, т. 10, № 2, с. 149—169.
26. Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. *Докл. АН СССР*, 1965, т. 160, № 4, с. 845—848.
27. Shim J. L., Lohrmann R., Orgel L. E. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1974, v. 96, № 16, p. 5283—5284.
28. Юодка Б. А., Недбий В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. *Биохимия*, 1969, т. 34, № 4, с. 849—853.
29. Letsinger R. L., Mungall W. S. *J. Org. Chem.*, 1970, v. 35, № 11, p. 3800—3803.
30. Juodka B., Kirvelienė V., Liorančaitė L. *J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides*, 1979, v. 6, № 4, p. 339—357.
31. Юодка Б. А., Кирвялене В. А., Повиленис П. П. *Биооргани. химия*, 1982, т. 8, № 3, с. 326—333.
32. Juodka B., Sasnauskienė S. *J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides*, 1981, v. 8, № 1, p. 19—40.
33. Zehnbauser B. A., Vogelstein B. *Bioessays*, 1984, v. 2, № 2, p. 52—54.
34. Юодка Б., Лиоранчайте Л., Янушоните Л., Саснаускене С. *Биооргани. химия*, 1976, т. 2, № 11, с. 1513—1519.

Поступила в редакцию
14.I.1986

OLIGONUCLEOTIDES AND NUCLEOTIDE-PEPTIDES. LI. THE SIMPLEST SYNTHETIC MODELS OF DNA FRAGMENTS WITH PEPTIDE LINKERS

JUODKA B. A., KIRVELIENÉ V. A.

V. Kapsukas Vilnius State University, Vilnius

The DCC method has been used to synthesize nucleotide-peptides in which two nucleotide residues are linked by an amino acid (peptide) with the formation of phosphoamide and phosphodiester or the phosphoamide and amide bonds. It has been shown that the most promising approach to the synthesis of nucleotide-peptides of the first type is linking the two original nucleotide-peptides by a peptide bond. The structures of the obtained compounds have been confirmed by reactions with hydroxylamine (pH 4.75), UV-spectroscopy, acid and alkaline hydrolyses data, as well as by the action of snake venom phosphodiesterase. It has been found that the linking of the nucleotide to the amino acid residue of the nucleotide-peptides does not exert a considerable influence on the hydrolytic stability of the phosphoamide and phosphodiester bonds.