



УДК 577.113.4

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ХИМИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ УРЕИДНЫЕ ГРУППИРОВКИ

© 1995 г. М. Г. Ивановская*, Н. А. Нарышкин, З. А. Шабарова

Химический факультет и Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 13.07.94 г. После доработки 15.09.94 г.

Изучена модификация карбоксильной группы, введенной в структуру синтетического дезоксирибо-олигонуклеотида, под действием водорастворимого 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида (EDC). Обнаружено, что при обработке карбоксилсодержащего олигонуклеотида EDC в воде и водных буферных растворах происходит быстрое образование соответствующего уреидного производного с выходом 80 - 90%. Показано, что это производное относительно устойчиво в водном растворе и легко может быть выделено методом электрофореза в полиакриламидном геле. Изучена гидролитическая устойчивость этого соединения в широком интервале значений pH. Показано, что нового типа уреидные производные устойчивы при нейтральных и слабокислых значениях pH. При слабощелочных значениях pH они способны ацилировать аминокислотосодержащие соединения с высокой эффективностью (50 - 90%). Предложенный тип реагентов может быть использован для аффинной модификации ферментов и других белков и для получения конъюгатов олигонуклеотидов с другими классами соединений.

Ключевые слова: производные олигонуклеотидов, уреиды, реагенты для кросс-линкинга с аминами и белками.

Неослабевающий интерес к химии производных олигонуклеотидов обусловлен их широким использованием в самых различных областях современной науки, медицины и биотехнологии. Основной подход для получения модифицированных олигонуклеотидов заключается во включении соответствующего синтона в олигонуклеотид в процессе автоматического синтеза. Однако существует целый ряд производных олигонуклеотидов, которые могут быть получены только путем постсинтетической модификации. Такowymi являются химически активные производные олигонуклеотидов, способные не только узнавать, но и ковалентно связываться с компонентами нуклеиновых кислот и белков. Эти соединения могут использоваться в качестве аффинных реагентов для изучения активных центров ферментов, реагентов для химического лигирования [1], "сенсовых" реагентов, способных специфично взаимодействовать с белковыми молекулами и затем

либо модифицировать их, либо прочно и направленно связываться с ними.

Ряд химически активных производных олигонуклеотидов ранее уже применялся для региоспецифических реакций с нуклеиновыми кислотами и белками. Это фосфоазолиды [2], N-оксибензотриазоловые фосфодиефиры [3], олигонуклеотиды, содержащие межнуклеотидные тризамещенные пирофосфатные [4], ацилфосфатные [5] и сложноэфирные связи. Однако проблема получения доступных и эффективных производных, которые можно было бы использовать для решения вышеперечисленных задач, по-прежнему остается актуальной. Одним из решений этой проблемы является использование олигонуклеотидов, содержащих карбоксильные группы. Известно, что карбоксильная группа по химическим свойствам выгодно отличается от фосфоэфирной группы. Это связано с тем, что атом углерода в ней находится в sp^2 -гибридном состоянии, и поэтому сама карбоксильная группа имеет плоскую структуру. По этой причине атом углерода легкодоступен для атакующих молекул, что облегчает протекание реакций присоединения-замещения [6].

В связи с этим представлялось интересным изучить химические свойства карбоксильной группы, специально введенной в состав олигонуклеотида,

Сокращения: EDC - 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид; ^{32}P - [^{32}P]фосфат; EDA - этилендиамин; MES - морфолинэтансульфокислота; TBE - трис-боратный буфер. Префикс d (дезокс) в обозначении дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

* Адрес для переписки: 119899, Москва, Воробьевы горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, лаборатория химии нуклеиновых кислот, Ивановской М.Г.

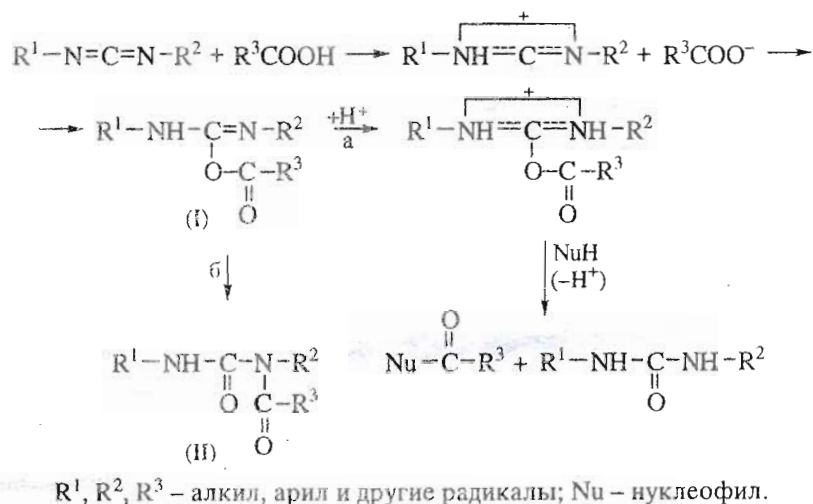


Схема 1.

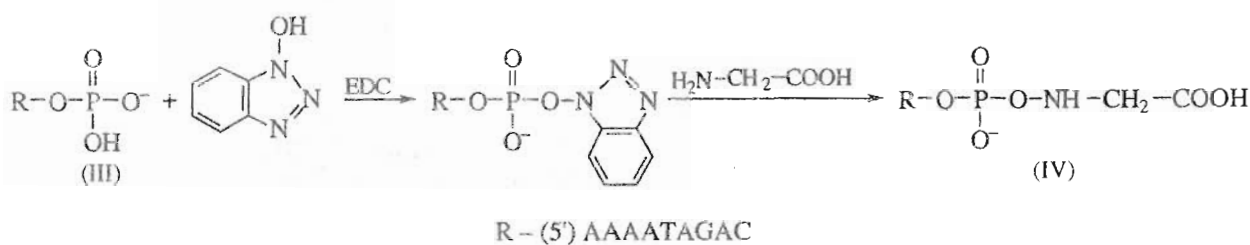


Схема 2.

так как это могло бы привести к получению новых, возможно более активных, производных – реагентов для направленной модификации белков и нуклеиновых кислот.

Химические свойства и реакции карбоксильной группы хорошо изучены в пептидной химии, где синтез ведется, как правило, в безводной органической среде. Для карбоксильной группы в составе олигонуклеотида необходимо рассмотреть реакции, протекающие в водной среде, направление и механизмы которых практически не изучены. Использование водной среды важно как с точки зрения растворимости олиго- и полинуклеотидов, так и с точки зрения использования этих соединений в реакциях с биополимерами, протекающими в условиях, близких к физиологическим.

Наиболее простым реагентом для активации карбоксильной группы в водной среде является водорастворимый 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, который широко используется для активации фосфомоноэфирной группы олигонуклеотидов [7, 8]. Из литературных данных известен общий механизм активации карбоксильной группы под действием карбодимида [9 - 11] (схема 1).

Вначале из карбоновой кислоты и карбодимида образуется O-ацилмочевинное производ-

ное (I), соединение очень неустойчивое, которое быстро подвергается дальнейшему превращению по одному из двух путей. В присутствии достаточного количества сильных нуклеофилов реализуется путь "а", т.е. перенос ацильного остатка на нуклеофил, например амин. Однако в отсутствие сильных нуклеофилов O-ацилмочевинное производное либо гидролизуется под действием воды, как нуклеофила, с высвобождением исходной карбоксильной группы и мочевины, либо претерпевает O→N-сдвиг и переходит в N-ацилмочевинное производное (II) (путь "б"). N-Ацилмочевины (уреиды) устойчивы при кислых значениях pH [12] и легко гидролизуются в водном растворе NaOH, образуя мочевины и соль карбоновой кислоты [13]. В работе [9] было отмечено, что N-ацилмочевинные производные в свою очередь могут атаковаться аминами с образованием амидной связи.

В рамках настоящей работы было впервые предпринято изучение химических свойств карбоксильной группы в составе олигонуклеотида. В качестве объекта исследования был выбран девятизвенный олигодезоксирибонуклеотид со случайной последовательностью: (5') AAAATAGACp (III) [14]. Для введения в него карбоксильной группы проводили постсинтетическое присоединение аминокислоты по 3'-концевому фосфату ранее разработанным нами методом [15] (схема 2).

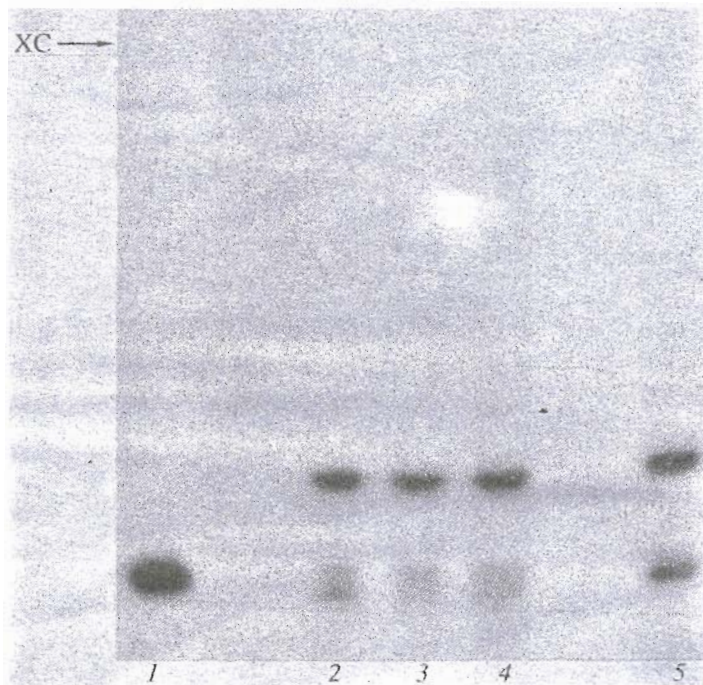


Рис. 1. Накопление уреидного производного (VI) в MES-буфере при pH 6.0, [EDC] 0.5 M, 10 °C. Дорожка 1 – исходный олигонуклеотид (V), 2 – продукты реакции через 15 мин, 3 – 30, 4 – 60, 5 – 120 мин. ХС – ксиленцианол.

Соединение (IV) было выделено методом гель-электрофореза в 20% ПААГ и получено с выходом 95%.

Для быстрого и удобного наблюдения за превращениями карбоксильной группы под действием EDC в соединение (IV) была введена 5'-концевая ^{32}P -метка с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и Т4-полинуклеотидкиназы [16]: (5') $^{32}\text{pAAAATAGACp-NH-CH}_2\text{-COOH}$ (V). Контроль за ходом реакций вели методом гель-электрофореза в 20% ПААГ с последующей автордиографией.

Синтез уреидного производного олигонуклеотида (V)

Исходным соединением для синтеза уреидного производного служил описанный выше олигонуклеотид (5') $^{32}\text{pAAAATAGACp-NH-CH}_2\text{-COOH}$ (V). Ранее соединения подобной структуры мы использовали для ковалентного присоединения некоторых аминокислот по карбоксильной группе олигонуклеотида в присутствии EDC [15]. При этом соответствующие амидные производные получались быстро и с высокими выходами. В настоящей работе впервые были изучены превращения карбоксильной группы под действием водорастворимого карбодиймида в отсутствие нуклеофильных агентов.

Методом электрофореза в 20% ПААГ мы установили, что обработка соединения (V) EDC в

водных буферных растворах приводит к быстрому и почти количественному образованию некоего нового соединения (VI) (рис. 1).

Ранее мы установили, что в использованных условиях ни гетероциклические основания, ни межнуклеотидный фосфат не модифицируются карбодиймидами [17]. Поэтому единственным продуктом, который мог образоваться в этих условиях из соединения (V), является его аддукт с карбодиймидом по карбоксильной группе. В контрольном эксперименте по обработке карбодиймидом в тех же условиях олигонуклеотида, не содержащего карбоксильной группы, никакой реакции не наблюдалось.

Кривые накопления аддукта (VI) в воде и MES-буфере, приведенные на рис. 2, свидетельствуют о том, что скорость накопления продукта модификации примерно одинакова и достигает 90 - 95% за 30 мин. Учитывая описанный выше механизм модификации карбоксильной группы карбодиймидами (схема 1), можно предположить, что полученный нами продукт (VI) представляет собой либо O-ацилмочевинное производное типа I, либо N-ацилмочевинное производное типа II. Полученное нами соединение может быть легко выделено осаждением 2 M LiClO_4 /ацетоном, гель-фильтрацией на биогеле P2, элюцией 2 M LiClO_4 из ПААГ. Устойчивость полученного соединения в водной среде в течение недели при 4°C и в условиях

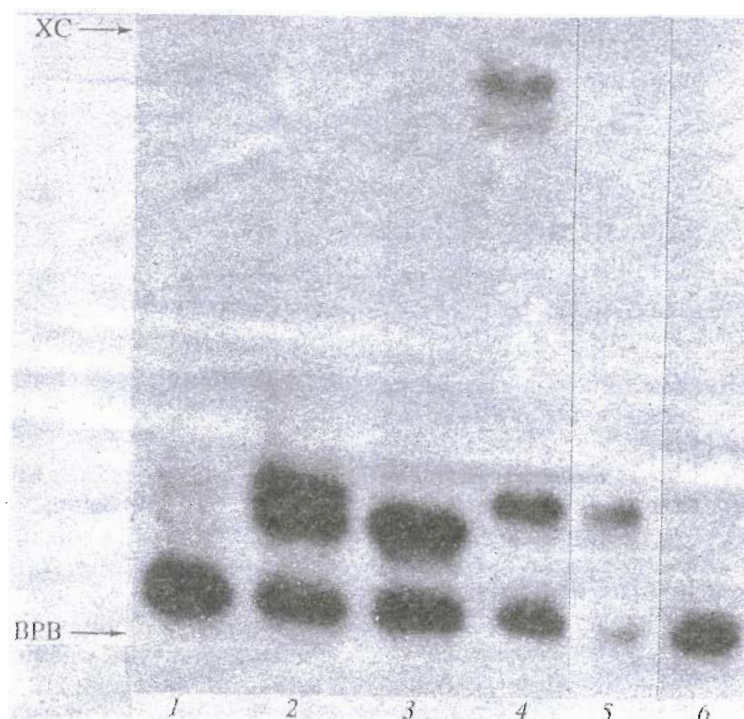


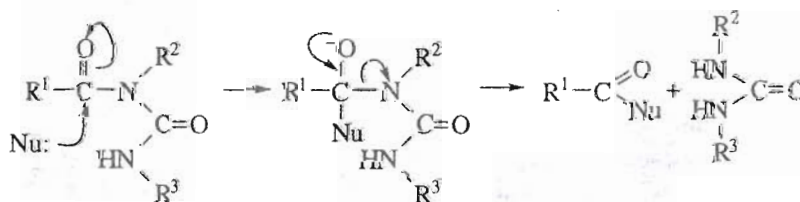
Рис. 3. Гидролитическая устойчивость и взаимодействие уреидного производного (VI) с рядом аминосоединений при 20°C. Дорожка 1 – продукты гидролиза (VI) 1 мМ NaOH, 3 ч; 2 – продукты взаимодействия (VI) с 0.3 М Lys при pH 10.0; 3 – с 1 М водным EDA при pH 11.0; 4 – с 0.3 М ристомисином, pH 10.0; 5 – уреидное производное (VI); 6 – олигонуклеотид (V). XC и ВРВ – положение красителей-маркеров ксиленианола и бромфенолового синего.

Очевидно, что реакция ацилирования протекает по схеме 3.

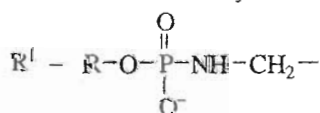
Высокая эффективность реакции с простыми первичными алифатическими аминами позволяет рассчитывать на то, что предлагаемый тип уреидных производных может быть использован для ковалентного присоединения олигонуклеотидов к различным биополимерам, имеющим реакционноспособные аминогруппы. В качестве примера мы осуществили синтез конъюгата олигонуклеотида (VI) с антибиотиком ристомисином.

Ристомисин представляет собой гликопептид с молекулярной массой 2100, содержащий две первичные аминогруппы: первая – α-аминогруппа в пептидном фрагменте, вторая – в составе углеводной части молекулы [18]. Полученный конъюгат был выделен методом электрофореза в 20% ПААГ. Выход конъюгата составил 50% (рис. 3, таблица).

Таким образом, в настоящей работе предложен и исследован не описанный ранее тип производных олигонуклеотидов, содержащих в своей



R – остаток олигонуклеотида



R², R³ – Alkyl

Nu: – RNH₂, HO⁻

Схема 3.

структуре активированную карбоксильную группу (уреидный фрагмент). Показано, что уреидные производные олигонуклеотидов могут быть легко и быстро получены в водной среде, гидролитически устойчивы в области нейтральных значений pH и в то же время обладают высокой ацилирующей способностью по отношению к аминоксодержащим соединениям.

Соединения этого типа могут использоваться во многих реакциях, протекающих в водной среде, в том числе в реакциях с биополимерами в условиях существования нативных структур. Очевидна перспективность использования уреидных производных олигонуклеотидов в качестве антисенсовых или сенсовых реагентов, так как они способны не только специфически связываться с заданными фрагментами нуклеиновых кислот и белков, узнающих определенные последовательности в НК, но и реагировать с ними по предлагаемому общему механизму нуклеофильного замещения у карбонильного атома углерода уреидного фрагмента. Эти соединения представляют несомненный интерес для изучения активных центров широкого круга ферментов нуклеинового обмена, в качестве лигандов для ковалентной иммобилизации олигонуклеотидов и белков на твердофазных носителях, а также для получения конъюгатов олигонуклеотидов с пептидами, белками и соединениями других классов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы N-гидроксисбензотриазол, LiClO₄ (Fluka, Швейцария); MES, гидрохлорид 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимида, NaCl (Merck, ФРГ); глицин, бромфеноловый синий и ксиленцианол (Reanal, Венгрия); акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, гидрохлорид трис(гидроксиметил)аминометана (Serva, ФРГ); T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78; Fermentas, Литва); остальные реактивы отечественного производства.

Гель-электрофорез проводили в пластинах 20% ПААГ в 0.05 М трис-боратном буфере (pH 8.0), содержащем 1 mM EDTA. Элюцию из геля проводили 2 М водным раствором LiClO₄ в течение 1 ч при 37°C или 12 ч при 4°C.

Составы буферных растворов и загрузочного раствора красок. MES-буфер: 0.05 М MES, 0.5 М NaCl, 0.02 М MgCl₂, pH 6.0. TBE-буфер: 0.05 М трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорида, 0.05 М H₃BO₃, 1 mM EDTA, pH 8.3. Загрузочный раствор: 1% раствор бромфенолового синего и ксиленцианола в смеси формамид-вода (80 : 20), 1 mM EDTA.

Синтез аминокислотного производного (IV). Упаренный досуха олигонуклеотид (III) (1 - 10 нмоль) растворяли в 5 - 7 мкл воды и добавляли 30 - 35 мкл

2 М раствора N-гидроксисбензотриазола в смеси вода-DMF, 1 : 3 (pH 4.5) и 5 - 7 мг EDC. Смесь инкубировали 3 ч при 4°C, затем к реакционной смеси добавляли 200 мкл 2 М LiClO₄ и 1000 мкл ацетона, охлаждали смесь 20 мин при -20°C и центрифугировали 5 мин (8000 об/мин). Супернатант отбирали, осадок растворяли в 50 мкл 2 М раствора LiClO₄, добавляли 300 мкл ацетона, переосаждали как указано выше, осадок промывали 200 мкл ацетона. К осадку добавляли 20 мкл 1 М водного раствора глицина, pH 10, и выдерживали 14 ч при 10°C. Затем добавляли 100 мкл 2 М LiClO₄ и 500 мкл ацетона, охлаждали смесь 20 мин при -20°C и центрифугировали 5 мин (8000 об/мин). Супернатант отбирали, осадок растворяли в 50 мкл 2 М раствора LiClO₄, добавляли 300 мкл ацетона, переосаждали как указано выше, осадок промывали 200 мкл ацетона, растворяли в 5 - 10 мкл загрузочного раствора, наносили в ячейки геля и анализировали продукты электрофорезом в 20% ПААГ. Выход аминокислотного производного составил 90%.

Синтез уреидного производного (VI). Упаренный досуха олигонуклеотид (V) (1 - 10 нмоль) растворяли в 10 мкл MES-буфера или в воде, охлаждали до 10°C и прибавляли 1 мг EDC. Смесь перемешивали и инкубировали при 8 - 10°C в течение 0.5 - 10 ч (таблица). Продукты реакции осаждали и выделяли в 20% ПААГ как описано выше. Выход N-ацилмочевинного производного составил 90% (рис. 1).

Гидролиз уреидного производного (VI). К 1 мкмоль свежесажженного осадка соединения (VI) добавляли 10 мкл воды, либо 10 мкл 0.01 М водного раствора NaOH, либо 10 мкл 0.3 М водного раствора MES (pH 4.0) и выдерживали в условиях, приведенных в таблице, после чего добавляли 50 мкл 2 М LiClO₄ и 300 мкл ацетона. Смесь выдерживали 20 мин при -20°C, центрифугировали 5 мин (8000 об/мин), осадок растворяли в 5 - 10 мкл загрузочного раствора, наносили в ячейки геля и анализировали продукты электрофорезом в 20% ПААГ.

Реакция уреидного производного (VI) с аминами. К 1 мкмоль свежесажженного осадка соединения (VI) добавляли 3 мкл водного раствора амина (концентрации растворов аминов см, в таблице), инкубировали в условиях, приведенных в таблице, и анализировали продукты электрофорезом в 20% ПААГ так, как описано выше.

Синтез конъюгата олигонуклеотид-ристомин проводили по вышеописанной методике при соединении аминов. Концентрация ристоминина 0.3 М, время реакции 3 ч.

Авторы выражают глубокую признательность сотрудникам кафедры химии природных соединений МГУ ст. научным сотрудникам Т.С. Орецкой и

Е.М. Волкову за выполнение синтеза олигонуклеотида, использованного в данной работе.

Работа была частично поддержана грантом Международного научного фонда МА 4000.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шабарова З.А. // *Biochemie*. 1988. № 70. P. 1323 - 1334.
2. Исагуляни М.Г., Ивановская М.Г., Лебедева И.В., Шабарова З.А. // *Химия природ. соедин.* 1987. № 5. С. 723 - 731.
3. Ивановская М.Г., Готтих М.Б., Шабарова З.А., Прокофьев М.А. // *Докл. АН СССР*. 1987. Т. 293. № 2. С. 477 - 481.
4. Кузнецова С.А., Ивановская М.Г., Шабарова З.А. // *Биоорган. химия*. 1990. Т. 16. № 2. С. 219 - 225.
5. Кузнецова С.А., Ивановская М.Г., Шабарова З.А. // *Биоорган. химия*. 1991. Т. 17. № 12. С. 1633 - 1639.
6. Шабарова З.А., Богданов А.А. *Химия нуклеиновых кислот и их компонентов*. М.: Химия, 1978. С. 123 - 133.
7. Naylor R., Gilham P.T. // *Biochemistry*. 1966. V. 5. № 8. P. 2809 - 2813.
8. Uesugi S., Tso P.O.P. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. № 15. P. 3142 - 3152.
9. Корана Г. *Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты*. М.: Мир, 1964. С. 1 - 166.
10. Riehm J.P., Scheraga H.A. // *Biochemistry*. 1966. V. 5. № 2. P. 566 - 575.
11. Williams F., Ibrahim I.T. // *Chem. Rev.* 1981. V. 81. № 8. P. 589 - 636.
12. Кнорре Д.Г., Шубина Т.Н. // *Кинетика и катализ*. 1964. Т. 5. Вып. 4. С. 637 - 641.
13. Melzacka M., Kahl W. // *Chem. Anal.* 1969. V. 14. № 3. P. 447 - 452.
14. Волков Е.М., Романова Е.А., Круг А., Орецкая Т.С., Потанов В.К., Шабарова З.А. // *Биоорган. химия*. 1988. Т. 14. № 8. С. 1034 - 1039.
15. Готтих М.Б., Ивановская М.Г., Скрипкин Е.А., Шабарова З.А. // *Биоорган. химия*. 1990. Т. 16. № 4. С. 514 - 523.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. *Молекулярное клонирование*. М.: Мир, 1984.
17. Ivanovskaya M.G., Gottikh M.B., Shabarova Z.A. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1987. V. 6. № 5. P. 913 - 934.
18. Антибиотики-полипептиды (структура, функция, биосинтез) // Ред. Н.С. Егоров. М.: Изд. МГУ, 1987. С. 220.

Synthesis and Characteristics of Novel Oligonucleotide Derivatives Containing Reactive Ureido Groups

M. G. Ivanovskaya*, N. A. Naryshkin, and Z. A. Shabarova

Chemistry Faculty, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

Belozerskii Research Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

Abstract – The 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)-induced modification of the carboxyl group in a synthetic oligodeoxyribonucleotide was studied. Treatment of a carboxyl-containing oligonucleotide with EDC in water or aqueous buffer solutions leads to the rapid formation (with a 80 - 90% yield) of the corresponding ureido derivative, which can easily be isolated by PAGE. These derivatives are stable in neutral and weakly acid aqueous solutions, whereas under weakly basic conditions they efficiently (50 - 90%) acylate amino groups. Reagents of this type can be used for affinity modification of enzymes and other proteins and for preparing conjugates of oligonucleotides with other compounds.

Key words: oligonucleotide derivatives, ureids, reagents for cross-linking amines and proteins.

* To whom correspondence should be addressed.