



УДК 547.963.32:577.113.4

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ 1-β-D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИЛТИМИН: СИНТЕЗ И СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА

© 2002 г. Б. С. Ермолинский*, М. В. Фомичева*, Е. В. Ефимцева*, С. Н. Михайлов*,
Д. С. Есипов***, Е. Ф. Болдырева***, В. Г. Коробко***, А. ван Аершот****, П. Хердевин****

* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

** Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119899,
Москва, Воробьевы горы, МГУ, д. 1, корп. 12;

*** Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

**** Рега институт, Католический университет Леувена, Бельгия

Поступила в редакцию 12.02.2001 г. Принята к печати 27.04.2001 г.

Разработан удобный метод региоселективного введения 1-β-D-галактопиранозилтимина в олигонуклеотиды. Изучены субстратные свойства модифицированных олигонуклеотидов в ферментативных реакциях образования и гидролиза межнуклеотидных связей.

Ключевые слова: олигонуклеотиды модифицированные, синтез, субстратные свойства; 1-β-D-галактопиранозилтимин в составе олигонуклеотидов.

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические олигонуклеотиды, содержащие модифицированные нуклеозидные звенья – удобные инструменты для изучения ферментов нуклеотидного обмена. Поэтому расширение спектра возможных модификаций и изучение субстратных свойств таких олигонуклеотидов – важная задача биоорганической химии.

Ранее нами получены модифицированные олигонуклеотиды, содержащие остаток 1-β-D-глюкопиранозилтимина с 4',6'-межнуклеотидными связями, и изучены их субстратные свойства в различных ферментативных реакциях. Было показано, что включение одного остатка гексапиранозилтимина дестабилизирует образование двойной спирали, понижая температуру плавления дуплекса примерно на 5–7°C. Тем не менее ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова) узнает модифицированный праймер в комплексе с короткой матрицей и эффективно удлиняет его. Только в случае, когда модифицированный нуклеозид располагался вблизи 3'-конца праймера, полимеризация не наблюдалась [1].

Отличительной чертой глюкопиранозильных остатков в сравнении с природными – рибозильными – является наличие в них *транс*-диольной группы, которая может быть использована для постсинтетической модификации содержащих такие звенья олигонуклеотидов с помощью реакции периодатного окисления [2]. На модельных динук-

леозидфосфатах было показано, что скорость периодатного окисления *транс*-диольной группы существенно меньше, чем *цис*-диольной [2, 3].

В качестве источника *цис*-диольных группировок в составе олигонуклеотидной цепи были предложены производные галактопиранозилтимина (2) (схема 1). После снятия ацильных групп с 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил-1-β-D-галактопиранозилтимина (1), синтезированного по методу Форбрюггена [4, 5], получили изопропилиденовое производное (3) реакцией 1-β-D-галактопиранозилтимина (2) с 2,2-диметоксипропаном в ацетоне [6] с выходом 50%. Далее из него был приготовлен синтон (5), синтез которого и получение на его основе некоторых олигонуклеотидов приведены в работах [7, 8].

Применение синтонов с кислотолabileй изопропилиденовой группой требует подбора опти-

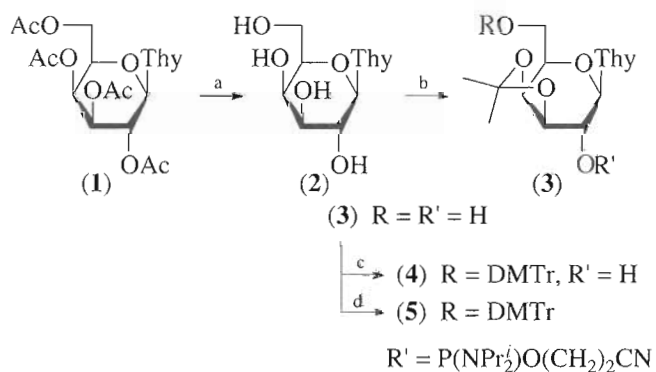


Схема 1. Синтез амидофосфита (5) для олигонуклеотидного синтеза [7, 8].

Автор для переписки (тел.: (095) 939-35-28; эл. почта: eds@soil.msu.ru).

мальных условий ее удаления с модифицированного звена из-за возможной в кислых условиях реакции апуринизации. В настоящей работе детально изучен кислотный гидролиз изопропилиденовой группы в модельных динуклеозидмонофосфатах и тринуклеозиддифосфатах, включающих остаток 3',4'-*O*-изопропилиден-1-β-*D*-галактопиранозилтимина, и подобраны условия ее удаления, обеспечивающие минимальную апуринизацию целевого продукта. Получены новые олигонуклеотиды, содержащие остатки 1-β-*D*-галактопиранозилтимина и 3',4'-*O*-изопропилиден-1-β-*D*-галактопиранозилтимина с 2',6'-межнуклеотидными связями, изучены их субстратные свойства в ферментативных реакциях образования и гидролиза межнуклеотидных связей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез модельного динуклеозидмонофосфата (7) (схема 2) осуществляли конденсацией соединения (4) с *N*⁶,3'-*O*-диацетил-2'-дезоксаденозин-5'-фосфатом в присутствии *N,N*-дициклогексилкарбодимида (DCC) в пиридине, после удаления ацильных защитных групп и кислотного гидролиза (80% АсОН, 20°C, 5 ч) получали смесь динуклеозидмонофосфатов (6) и (7). В этих условиях (при последовательном проведении конденсации и деблокирова-

ния без выделения промежуточных продуктов, см. "Эксперимент. часть") полностью удалается диметокситритильная и частично изопропилиденная защитные группы. Разделение димеров (6) и (7) было осуществлено с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Аналогичной конденсацией соединения (3) с избытком *N*⁶,3'-*O*-диацетил-2'-дезоксаденозин-5'-фосфата после удаления ацильных защитных групп и ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе получали тринуклеозиддифосфат (10) с удовлетворительным выходом.

Структура синтезированных динуклеозидмонофосфатов (6) и (7) подтверждена данными ¹Н-ЯМР-спектроскопии. В табл. 1 и 2 приведены химические сдвиги и константы спин-спинового взаимодействия для гексапиранозильных остатков соединений (6) и (7), а также нуклеозидов (1)–(3). Местоположение межнуклеотидной связи было однозначно определено с использованием двойного резонанса по фосфору и определением КССВ *J*_{Н, P} (табл. 2). Отнесение сигналов углеводных остатков 2'-дезоксаденозина и 1-β-*D*-галактопиранозилтимина проводилось с помощью COSY-спектров.

КССВ протонов углеводного кольца производных 1-β-*D*-глюкопиранозильных нуклеозидов

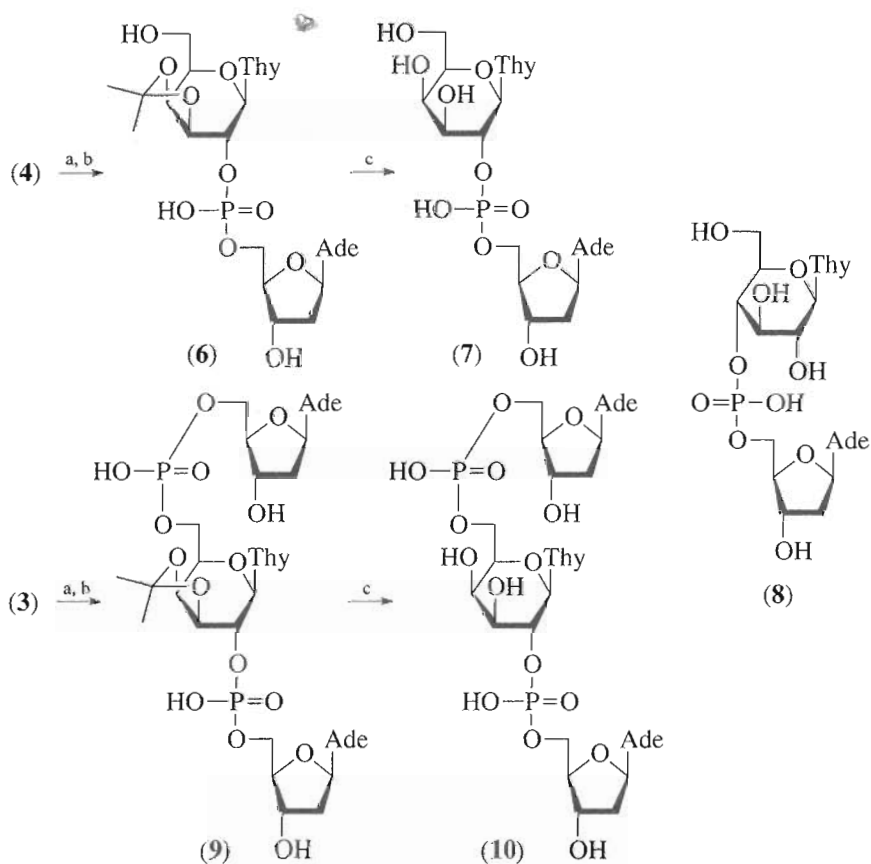


Схема 2. Синтез модельных динуклеозидфосфатов (6) и (7) и тринуклеозиддифосфатов (9) и (10) и структура 1-(4'-(5'-(2'-деоксиаденилил))-β-*D*-глюкопиранозил)тимина (8).

а) *N*⁶,3'-*O*-диацетил-2'-дезоксаденозин-5'-фосфат/DCC/Py, 4 сут, 20°C; б) 5 М NH₃ в MeOH, 2 сут, 20°C; в) 80% АсОН, 20°C.

Таблица 1. Химические сдвиги (м.д.) для остатков 1-β-D-галактопиранозилтимина и 1-β-D-глюкопиранозилтимина в ¹H-ЯМР-спектрах соединений (1)–(3), (6)–(8) при 400.13 МГц, 295 К*

Соединение	Растворитель	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H6'a	H6'b	H6	Me-5
(1)	CDCl ₃	5.80 д	5.27 дд	5.17 дд	5.47 д	4.16–4.06 м			7.12 к	1.93 д
(2)	D ₂ O	5.53 д	3.88 дд	3.79 дд	4.02 дд	3.87 дд	3.74 м		7.68 к	1.87 д
(3)	CDCl ₃ –CD ₃ OD	5.30 д	4.03 т	3.51 дд	4.09 дд	3.86 ддд	3.65 дд	3.60 дд	7.12 к	1.71 д
(6)	D ₂ O	5.68 д	4.30 ддд	4.46 дд	4.39 дд	4.17 ддд	3.82 дд	3.77 дд	7.47 к	1.74 д
(7)	D ₂ O	5.65 д	4.37 ддд	3.81 тт	4.00 дд	3.88 дд	3.76 д		7.63 к	1.71 д
(8)	D ₂ O	5.56 д	3.71 т	3.75 т	4.98 дт	3.45 ддд	3.73 дд	3.68 дд	7.61 к	1.89 д

* Другие сигналы в спектрах соединений (1): 8.79 уш.с (1H, NH), 2.18 с (3H, Ac), 2.02 с (3H, Ac), 1.97 с (3H, Ac), 1.96 с (3H, Ac); (3): 1.36 с (3H, Me), 1.18 с (3H, Me); (6) и (7): см. "Эксперимент. часть"; (8): см. [1].

Таблица 2. Константы спин-спиновой взаимодействия (Гц) для остатков 1-β-D-галактопиранозилтимина и 1-β-D-глюкопиранозилтимина в ¹H-ЯМР-спектрах соединений (1)–(3), (6)–(8) при 400.13 МГц, 295 К*

Соединение	J _{1',2'}	J _{2',3'}	J _{3',4'}	J _{4',5'}	J _{5',6'a}	J _{5',6'b}	J _{6'a,6'b}	J _{5,6}	Соединение	J _{1',2'}	J _{2',3'}	J _{3',4'}	J _{4',5'}	J _{5',6'a}	J _{5',6'b}	J _{6'a,6'b}	J _{5,6}
(1)	9.3	10.1	3.3	0.0				1.2	(6)	7.8	6.0	5.8	2.0	4.3	7.8	-12.0	1.2
(2)	9.1	9.6	3.3	1.0	6.5	5.6		1.2	(7)	8.0	9.3	3.3	0.9	6.1	6.1		1.2
(3)	8.7	8.7	6.6	2.1	6.9	5.1	-11.8	1.2	(8)	9.0	9.1	9.1	9.6	2.4	4.7	-12.8	1.2

* Другие константы в (6): J_{2',p} 9.7; (7): J_{4',p} 9.0; (8): J_{4',p} 9.0.

имеют значение 9–10 Гц [1], что подтверждает экваториальное расположение [9] гетероциклического основания, гидроксильных и экзоциклической гидроксиметильной групп. Как следует из анализа ¹H-ЯМР-спектров, в производных 1-β-D-галактопиранозилтимина гетероциклическое основание и 2'-гидроксильная группа находятся в экваториальном положении. Введение 3',4'-O-изопропилиденной группы изменяет КССВ протонов углеводного остатка, но не сказывается принципиальным образом на конфигурации заместителей в целом. Учитывая конформационную жесткость шестичленных циклов, можно полагать, что и в олигонуклеотидах, содержащих модифицированные нуклеозиды 3',4'-O-изопропилиден-1-β-D-галактопиранозилтимин, 1-β-D-галактопиранозилтимин или 1-β-D-глюкопиранозилтимин, 2'-гидроксильная и экзоциклическая гидроксиметильная группы углеводных звеньев, участвующие в образовании межнуклеотидных фосфодиэфирных связей, будут располагаться в экваториальных конфигурациях. В связи с этим следует ожидать близких пара-

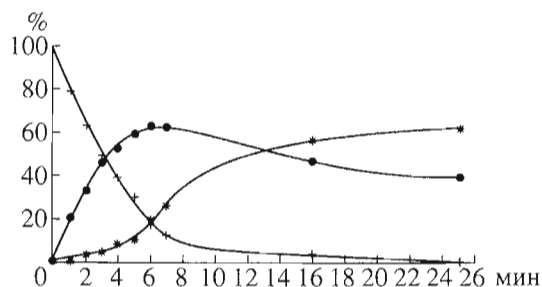
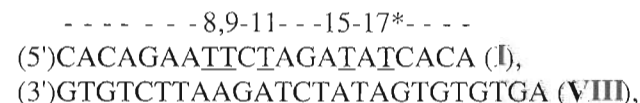


Рис. 1. Удаление изопропилиденной защитной группы (80% AcOH, 20°C) в тримере (9): + – тример (9); ● – тример (10); * – продукты деградации.

метров комплексообразования модифицированных олигонуклеотидов, содержащих нуклеозидные звенья с гексапиранозильными остатками, с ДНК.

Для отработки условий удаления изопропилиденной защитной группы динуклеозидмонофосфат (6) и тринуклеозиддифосфат (9) обрабатывали 80% уксусной кислотой, отбирая пробы каждый час и анализируя их с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Удаление изопропилиденной защитной группы с димера (6) происходит практически с количественным выходом за 20 ч. В случае тримера (9) реакция удаления защитной группы сопровождается заметным образованием побочных продуктов, и выходы целевого продукта (10) не превышают 60% (рис. 1). Аналогичная картина наблюдалась и в случае олигонуклеотидов, содержащих модифицированный гексапиранозильный остаток (рис. 2) (описание их получения приводится ниже). Поэтому оптимальное время удаления изопропилиденной защиты с модифицированного звена для олигонуклеотидов составляло 2–3 ч. За это время не наблюдалось образования заметных количеств продуктов апуринизации; исходный олигонуклеотид и целевой продукт реакции могут быть разделены (ср. рис. 2b).

Для изучения термодинамической стабильности и субстратной специфичности модифицированных олигонуклеотидов использовали систему из двух комплементарных олигонуклеотидов:



* Места включения модифицированных нуклеозидов в олигонуклеотиды.

Таблица 3. Температуры плавления (T_m) и результаты реакции элонгации, катализируемой ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) *E. coli*, олигонуклеотидных дуплексов (I)–(VII)/(VIII)

Дуплексы, образованные олигонуклеотидами*	T_m , °C (± 1 °C) при X, равном			Pol I при X, равном		
	T^{Glc}	$T^{Gal(Ip)}$	T^{Gal}	T^{Glc}	$T^{Gal(Ip)}$	T^{Gal}
(I)/(VIII)		56			+	
(II)/(VIII)	49	50	49	+	+	+
(III)/(VIII)	52	49	48	+	+	+
(IV)/(VIII)	52	51	51	+	+	+
(V)/(VIII)	53	53	51	+	+	+
(VI)/(VIII)	53	48	49	–	–	–
(VII)/(VIII)	45	41	39	–	–	–

* X = 1-(3,4-О-изопропилиден-β-D-галактопиранозил)тимин ($T^{Gal(Ip)}$) или 1-(β-D-галактопиранозил)тимин (T^{Gal}), или 1-(β-D-глюкопиранозил)тимин (T^{Glc}). + – удлинение, – – нет удлинения.

содержащих сайты рестрикции трех эндонуклеаз *EcoRI* ($G^{\wedge}AATTC$), *XbaI* ($T^{\wedge}CTAGA$), *Eco32I* ($GAT^{\wedge}ATC$). Было синтезировано шесть олигонуклеотидов, соответствующих олигонуклеотиду (I), с точечными модификациями в положениях 8, 9, 11, 15, 17 (олигонуклеотиды (II), (III), (IV), (V), (VI) соответственно) и один олигонуклеотид (VII) с двойной модификацией в положениях 8 и 17.

Синтез олигонуклеотидов осуществляли стандартным амидофосфитным методом с увеличением времени конденсации синтона (5) до 80 с. Удаление изопропилиденной группы проводили обработкой 80% уксусной кислотой в течение 3 ч. Олигонуклеотиды, не содержащие защитные группы, выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Нуклеозидный состав синтезированных олигонуклеотидов был подтвержден ферментативным гидролизом фосфодиэстеразой змеиного яда и бактериальной щелочной фосфатазой (см. “Эксперимент. часть”).

Температуры плавления дуплексов, включающих модифицированные олигонуклеотиды, содержащие галактопиранозилтимин, (II)–(VII)/(VIII) были близки к температурам плавления исходного (немодифицированного) дуплекса (I)/(VIII) (ΔT_m 3–8 °C) и комплексов, содержащих 1-β-D-глюкопиранозилтимин [1], что свидетельствует о незначительных конформационных изменениях двойной спирали исследуемых дуплексов (табл. 3).

Удлинение модифицированной цепи, как и в экспериментах с олигонуклеотидами, содержащими 1-β-D-глюкопиранозилтимин [1], проходило во всех случаях за исключением дуплексов, включающих олигонуклеотиды (VI) и (VII), где модификация находилась близко к 3'-концу олигонуклеотида.

Эксперименты по связыванию и расщеплению полученных модифицированных дуплексов эндонуклеазами рестрикции показали, что при расположении модификации вне сайта узнавания эндонуклеазы *EcoRI* сохраняется способность фермента гидролизовать соответствующие фосфодиэфирные связи (табл. 4). При расположении модифицированного звена внутри сайта узнавания рестрикта-

зы расщепления дуплексов практически не наблюдалось ((II)/(VIII)) или происходил гидролиз только немодифицированной цепи (в дуплексе (III)/(VIII)), из чего можно предположить, что связывание фермента происходит со всеми исследованными олигонуклеотидами, содержащими галактопиранозилтимин. Это также было показано в аналогичных случаях с глюкопиранозной модификацией в [1].

В экспериментах с рестриктазой *XbaI* наблюдалось незначительное падение эффективности гидролиза, когда модификация находилась вблизи от сайта рестрикции с 5'-конца модифицированного олигонуклеотида (дуплекс (II)/(VIII)). Гидролиз отсутствовал, если модификация располагалась в начале сайта рестрикции ((III)/(VIII)) около места разрезания, однако при наличии модифицированного звена внутри сайта ((IV)/(VIII)) происходил гидролиз обеих цепей, хотя и с меньшей эффективностью. Уменьшение эффективности гидроли-

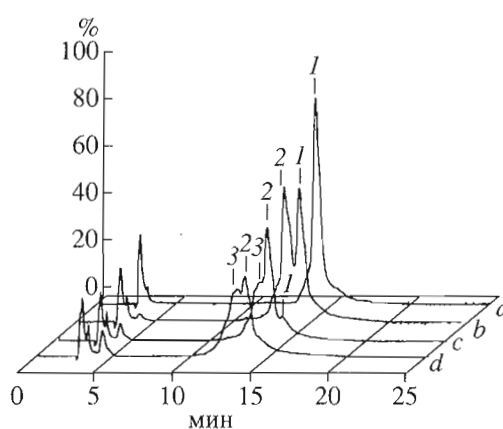


Рис. 2. Анализ с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ продуктов реакции удаления изопропилиденной защитной группы в олигонуклеотиде (IIa) (80% AcOH, 20 °C), время реакции 0 (a); 2 (b); 6 (c); 12 ч (d) (условия см. “Эксперимент. часть”): 1 – (5')CACAGAAT^{Gal(Ip)}TCTAGATATCACA (IIa); 2 – (5')CACAGAAT^{Gal}TCTAGATATCACA (II); 3 – продукты апуринизации.

Таблица 4. Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов (I)-(VII)/(VIII) эндонуклеазами рестрикции *EcoRI*, *XbaI*, *Eco32I*

Дуплексы, образованные олигонуклеотидами*	<i>EcoRI</i>		<i>XbaI</i>		<i>Eco32I</i>		
	T ^{Glc}	T ^{Gal} (fp)	T ^{Gal}	T ^{Gal} (fp)	T ^{Glc}	T ^{Gal} (fp)	T ^{Gal}
(I)/(VIII) (5')CACAG AATTCTAGATATCACA (I) (3')GTGCTTAA GATCTATAGTGTGTA			(5')CACAGAATT CTAGATATCACA (I) (3')GTGCTTAAAGATCT ATAGTGTGTA		(5')CACAGAAATCTAGAT ATCACA (I) (3')GTGCTTAAAGATCTA TAGTGTGTA		
(II)/(VIII)	+ -	- -	- +	+* +*	+ +*	+ +*	+ +*
(III)/(VIII)	- -	- +*	- +	- -	+ +	+ +	+ +
(IV)/(VIII)	- +	+ +	- -	+* +*	+ +	- -	- -
(V)/(VIII)	+ +	+ +	+ +	+ +	- +*	- -	- -
(VI)/(VIII)	+ +	+ +	+ +	+* +*	+* +*	- -	- -
(VII)/(VIII)	+ -	- -	- +	- +	- -	+* +	* +

* + - гидролиз, - - нет гидролиза, +* - гидролиз с эффективностью менее 50%. Сайты рестрикции выделены жирным шрифтом.

за для *XbaI* также происходило, когда модификация находилась с 3'-конца за 3 звена от сайта рестрикции ((VI)/(VIII)), а двойная модификация ((VII)/(VIII)), ограничивающая сайт рестрикции, приводила к гидролизу только немодифицированной цепи, причем с хорошей эффективностью.

При взаимодействии с рестриктазой *Eco32I* (*EcoRV*) гидролиза не было, когда модификация была близко ((IV)/(VIII)) или внутри ((V), (VI)/(VIII)) сайта рестрикции. При этом в случае двойной модификации ((VII)/(VIII)) происходил гидролиз обеих цепей олигонуклеотидного дуплекса, хотя и с разной эффективностью.

Наличие или отсутствие изопропилиденовой защитной группы на галактопиранозильном остатке не сильно сказывалось на специфичности взаимодействия с ферментами. Наблюдалась лишь небольшая разница в эффективности гидролиза, когда расщеплению подвергалась лишь одна цепь дуплекса.

Полученные результаты позволяют предположить, что модификация углеводного компонента влияет только на эффективность работы фермента, при этом узнавание дуплекса, содержащего модифицированный олигонуклеотид, происходит практически во всех исследованных случаях. Дольные группы модифицированных звеньев, содержащих фрагменты галактопиранозы, легко могут быть переведены реакцией периодатного окисления в диальдегидные группы, хорошо реагирующие с аминокруппами белка. Таким образом, исследуемая модификация может служить удобным инструментом для изучения механизма действия ферментов биосинтеза нуклеиновых кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker AMX 400 (Германия) при 295 К. Значения химических сдвигов δ (м.д.) рассчитаны относительно сигнала CHCl_3 (δ 7.20) для растворов в CDCl_3 и относительно сигнала HOD (δ 4.63) для растворов в D_2O . Соотнесение сигналов осуществляли с помощью двойного резонанса и спектров COSY. Величины КССВ (J) измерены в герцах. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol UV (Чехия) в системе: изопропанол–конц. аммиак–вода, 7 : 1 : 2. Синтез соединения (4) проводили как описано в работе [6].

1-(3',4'-Изопропилиден-2'-(5'-(2'-дезоксиденилил))- β -D-галактопиранозил)тимин (6) и 1-(2'-(5'-(2'-дезоксиденилил))- β -D-галактопиранозил)тимин (7). Соединение (4) (447 мг, 0.71 ммоль) и пиридиновую соль $N^6,3'$ -O-диацетил-2'-дезоксиденилозин-5'-фосфата (1 ммоль) упаривали с абс. пиридином (3 \times 5 мл). Остаток растворяли в 5 мл абс. пиридина, добавляли 1.25 г (6.1 ммоль) DCC и смесь выдерживали 4 сут при 20°C. К смеси добавляли 5 мл воды, перемешивали 2 ч при 20°C и фильтровали. Осадок промывали 20% водным пиридином, объединенные фильтраты упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в смеси 30 мл

воды и 50 мл хлороформа, органический слой отделяли, водный слой экстрагировали хлороформом (3 \times 30 мл). Объединенные органические слои упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 20 мл 5 М аммиака в метаноле, смесь выдерживали 48 ч при 20°C и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 10 мл 80% уксусной кислоты, выдерживали 5 ч при 20°C, упаривали в вакууме и остаток переупаривали с толуолом (5 \times 10 мл). Остаток растворяли в смеси 30 мл воды и 50 мл хлороформа, водный слой отделяли и промывали хлороформом (2 \times 30 мл). Водный слой наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (100 мл, HCO_3^- -форма). Колонку промывали водой и элюировали градиентом концентрации NH_4HCO_3 (0–0.15 М). УФ-поглощающие фракции, элюировавшиеся при концентрации NH_4HCO_3 0.05 М, упаривали в вакууме досуха и переупаривали с водой (5 \times 10 мл). Полученную смесь димеров (6) и (7) разделяли ВЭЖХ на колонке LiChroCART C18 (10 \times 250 мм, 10 мкм) в градиенте концентрации CH_3CN (0–25% за 25 мин) в 0.05 М ацетате аммония (скорость элюции 4 мл/мин). Времена удерживания димеров (7) и (6) соответственно 11.8 и 17.2 мин. Фракции упаривали в вакууме и обессоливали на той же колонке. Колонку промывали водой, продукты элюировали 10% CH_3CN и лиофилизировали.

Выход димера (7) 15%. R_f 0.56. ^1H -ЯМР (400.13 МГц) (D_2O): 8.37 с (1H, H8 A), 8.23 с (1H, H2 A), 7.63 к (1H, $J_{6,5}$ 1.2, H6 T), 6.45 т (1H, $J_{1,2a} = J_{1,2b} = 6.5$, H1' A), 5.65 д (1H, $J_{1,2}$ 8.0, H1' T), 4.59 ддд (1H, $J_{3,2a}$ 6.3, $J_{3,2b}$ 4.3, $J_{3,4}$ 3.6, H3' A), 4.37 ддд (1H, $J_{2,3}$ 9.3, $J_{2,p}$ 9.0, H2' T), 4.13 ддт (1H, $J_{4,5a}$ 4.0, $J_{4,5b}$ 3.6, $J_{4,p}$ 1.5, H4' A), 4.00 дд (1H, $J_{4,5}$ 0.9, $J_{4,3}$ 3.3, H4' T), 3.98 ддд (1H, $J_{5a,5b}$ -11.4 Гц, $J_{5a,p}$ 6.1, H5' a A), 3.91 ддд (1H, $J_{5b,p}$ 5.1, H5' b A), 3.88 дт (1H, $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.1$, H5' T), 3.81 дд (1H, H3' T), 3.76 д (2H, H6' a и H6' b T), 2.70 ддд (1H, $J_{2a,2b}$ -14.0, H2' a A), 2.57 ддд (1H, H2' b A), 1.71 д (3H, 5-Me T).

Соотнесение сигналов осуществляли с помощью двойного резонанса и спектров COSY. ^{13}C -ЯМР (100.61 МГц) (D_2O): 166.80 (C4 T), 154.29 (C6 A), 152.71 (C2 T), 150.58 (C2 A), 149.15 (C4 A), 141.64 (C8 A), 138.30 (C6 T), 119.37 (C5 A), 112.58 (C5 T), 86.39 (д, $J_{C,p}$ 8.3, C4' A), 84.92 (C1' A), 82.34 (уш.с, $J_{C,p} \sim 5.0$, C1' T), 78.88 (C5' T), 75.00 (уш.с, $J_{C,p} \sim 7.0$, C2' T), 73.77 (уш.с, $J_{C,p} \sim 4.0$, C3'), 71.44 (C3' A), 69.47 (C4' T), 65.81 (д, $J_{C,p}$ 5.4, C5' A), 61.67 (C6' T), 40.14 (C2' A), 12.28 (5-Me T). ^{31}P -ЯМР (161.98 МГц) (D_2O) относительно 80% фосфорной кислоты: 2.15.

Выход димера (6) 20%. R_f 0.58. ^1H -ЯМР (400.13 МГц) (D_2O): 8.37 с (1H, H8 A), 8.23 с (1H, H2 A), 7.47 к (1H, $J_{6,5}$ 1.2, H6 T), 6.42 дд (1H, $J_{1,2a}$ 6.7, $J_{1,2b}$ 6.5, H1' A), 5.68 д (1H, $J_{1,2}$ 7.8, H1' T), 4.65 ддд (1H, $J_{3,2a}$ 6.2, $J_{3,2b}$ 4.2, $J_{3,4}$ 3.7, H3' A), 4.46 дд (1H, $J_{3,2}$ 6.0, $J_{3,4}$ 5.8, H3' T), 4.39 дд (1H, $J_{4,5}$ 2.0, H4' T), 4.30 ддд (1H, $J_{2,p}$ 9.0, H2' T), 4.17 ддд (1H, $J_{5,6a}$ 4.3, $J_{5,6b}$ 7.8, H5' T), 4.16 дддд (1H, $J_{4,5a}$ 3.6,

$J_{4',5'b}$ 3.9, $J_{4',p}$ 1.7, H_4' A), 4.00 ддд (1H, $J_{5'a,5'b}$ -11.6, $J_{5'a,p}$ 5.3, $H_{5'a}$ A), 3.97 ддд (1H, $J_{5'b,p}$ 5.3, $H_{5'b}$ A), 3.82 дд (1H, $J_{6'a,6'b}$ -12.0, $H_{6'a}$ T), 3.77 дд (1H, $H_{6'b}$ T), 2.74 ддд (1H, $J_{2'a,2'b}$ -14.0, $H_{2'a}$ A), 2.56 ддд (1H, $H_{2'b}$ A), 1.71 д (3H, 5-Me T), 1.53 с (3H, Me), 1.33 с (3H, Me). Соотнесение сигналов осуществляли с помощью двойного резонанса и спектров COSY. ^{31}P -ЯМР (161.98 МГц) (D_2O) относительно 80% фосфорной кислоты: 1.18.

1-(6'-(5'-(2'-Дезоксиаденилил))-3',4'-О-изопротопириден-2'-(5'-(2'-дезоксаденилил))-β-D-галактопиранозил)тимин (9). Соединение (3) (288 мг, 0.88 ммоль) и пиридиновую соль *N*⁶,3'-*O*-диацетил-2'-дезоксаденозин-5'-фосфата (2.5 ммоль) упаривали с абс. пиридином (3 × 5 мл). Остаток растворяли в 15 мл абс. пиридина, добавляли 2.06 г (10 ммоль) DCC и смесь выдерживали 4 сут при 20°C. К смеси добавляли 10 мл воды, перемешивали 2 ч при 20°C и фильтровали. Осадок промывали 20% водным пиридином и объединенные фильтраты упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в смеси 50 мл воды и 50 мл диэтилового эфира, водный слой отделяли и промывали эфиром (3 × 30 мл). Водный слой упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 20 мл 5 М аммиака в метаноле, смесь выдерживали 48 ч при 20°C и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в воде (100 мл) и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (100 мл, HCO_3^- -форма). Колонку промывали водой и элюировали градиентом концентрации NH_4HCO_3 (0–0.25 М). УФ-поглощающие фракции, элюировавшиеся при концентрации NH_4HCO_3 0.1 М, упаривали в вакууме досуха и переупаривали с водой (5 × 10 мл). Выход тримера (9) 26%. R_f 0.61. 1H -ЯМР (400.13 МГц) (D_2O): 8.38 с (1H, H_8 A), 8.31 с (1H, H_8 A), 8.14 с (1H, H_2 A), 8.12 с (1H, H_2 A), 7.44 к (1H, $J_{6,5}$ 1.2, H_6 T), 6.35 дд (2H, $J_{1,2a}$ 6.4, $J_{1,2b}$ 6.6, 2 × H_1' A), 5.62 д (1H, $J_{1,2}$ 7.7, H_1' T), 4.65–3.92 м (14H, H_3' , H_4' , H_5' A, H_2' , H_3' , H_4' , H_5' , H_6' T), 2.58 м (4H, H_2' A), 1.69 д (3H, 5-Me T), 1.53 с (3H, Me), 1.32 с (3H, Me).

Кислотный гидролиз димера (6) и тримера (9). Раствор 5 OE_{260} соединения (6) или (9) в 0.2 мл 80% уксусной кислоты выдерживали при 20°C. Анализ продуктов осуществляли ВЭЖХ на колонке Nucleosil 100 C18 (4 × 250 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации CH_3CN (0–15% за 25 мин) в 0.05 М ацетата натрия, pH 4.3 (скорость элюции 1 мл/мин). Соответствующие пики интегрировали. Структура димера (7) и тримера (10) подтверждена ферментативным гидролизом до соединения (2) и dA.

Синтез олигонуклеотидов, содержащих 3',4'-О-изопротопириден-β-D-галактопиранозилтимин, (IIa)–(VIIa). Олигонуклеотидный синтез осуществлен на автоматическом синтезаторе ABI 392 с использованием коммерческих фосфорамидитов по стандартной схеме с увеличением времени конденса-

ции синтона (5) до 80 с и его концентрации до 0.15 М. Удаление защитных групп с гетероциклических оснований, межнуклеотидных фосфатных остатков и отщепление от полимерного носителя осуществляли в концентрированном растворе аммиака при 55°C в течение 16 ч. Продукты выделяли ионообменной хроматографией на колонке MonoQ в градиенте концентрации NaCl (0.3–0.7 М) в 10 mM NaOH и дополнительно очищали ВЭЖХ на колонке Nucleosil 100 C18 (4 × 250 мм, 5 мкм) в градиенте концентрации CH_3CN (5–25% за 30 мин) в 0.1 М ацетате триэтиламония, pH 6.9 (скорость элюции 1 мл/мин), с последующим обессоливанием на колонке Toyopearl HW-40 в воде.

Удаление изопротопириденной защитной группы в олигонуклеотидах (IIa)–(VIIa). Раствор 5 OE_{260} олигонуклеотида (IIa)–(VIIa) в 0.2 мл 80% уксусной кислоты выдерживали при 20°C. Анализ продуктов осуществляли с помощью ВЭЖХ на колонке Nucleosil 100 C18 в градиенте концентрации CH_3CN (10–20% за 20 мин) в 0.1 М ацетате триэтиламония, pH 6.9 (скорость элюции 1 мл/мин). Оптимальное время гидролиза составляло 2–3 ч (см. рис. 2). Выходы олигонуклеотидов составляли 30–40%. Времена удерживания олигонуклеотидов (II)–(VI) 13.5–14.0 мин, олигонуклеотида (VII) 15.1 мин, исходных олигонуклеотидов с изопротопириденной группой (IIa)–(VIIa) 14.3–14.8 мин.

Ферментативный гидролиз олигонуклеотидов.

К раствору 0.2 OE_{260} олигонуклеотида в 400 мкл 50 mM Трис-НСI-буфера, содержащего 50 mM NaCl и 7 mM $MgCl_2$ (pH 8.6), добавляли 1.0 ед. акт. фосфодиэстеразы змеиного яда (Pharmacia) и выдерживали 16 ч при 37°C. Добавляли 1.0 ед. акт. щелочной фосфатазы (Boehringer Mannheim) и раствор инкубировали 4 ч при 37°C. Гидролизат (50 мкл) анализировали на колонке Nucleosil 100 C18 (4 × 250 мм, 5 мкм). Разделение продуктов гидролиза олигонуклеотидов с изопротопириденными группами осуществляли в 0.1 М ацетате триэтиламония (pH 6.9), содержащем 8% CH_3CN , при скорости элюции 1 мл/мин. Времена удерживания для нуклеозида (3) 7.6 мин, для dC, dG, T и dA 3.0, 3.9, 4.3, 6.5 мин соответственно.

Разделение продуктов гидролиза олигонуклеотидов без изопротопириденных групп осуществляли на той же колонке и в том же буфере с использованием градиента концентрации CH_3CN (0–10% за 25 мин, скорость элюции 1 мл/мин). Времена удерживания для нуклеозида (2) 4.4 мин, для dC, dG, T и dA 7.2, 13.5, 14.3, 19.7 мин соответственно. Для всех олигонуклеотидов соотношение площадей пиков хорошо соответствовали расчетным данным.

Определение температур плавления олигонуклеотидных дуплексов (I)–(VII)/(VIII). Концентрацию олигонуклеотидного материала определяли спектрофотометрически при 260 нм. Температурную зависимость УФ-поглощения олигонуклеотидных дуплексов (I)–(VII)/(VIII) измеряли на

спектрофотометре Gilford при непрерывном повышении температуры со скоростью 1°C/мин в 0.01 М фосфате калия, содержащем 0.2 М NaCl, pH 7.0.

[³²P]-5'-Фосфорилирование олигонуклеотидов. 250 пмоль олигонуклеотидов в 20 мкл буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl (pH 9.5), 10 мМ MgCl₂ и 2 мМ дитиотреит (ДТТ), в присутствии 10 мкСi γ-[³²P]АТР и 5 ед. акт. (U) полинуклеотидкиназы T4 инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Затем в реакционную смесь добавили 5 мкл 0.1 мМ АТР и инкубировали еще 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 5 М ацетата натрия (2.5 мкл, pH 5.0), меченые олигонуклеотиды осаждали этанолом.

Полимеразная реакция с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I. Реакцию элонгации для дуплексов (I)-(VII)/(VIII) (2.5 пмоль, ³²P-меченая короткая цепь) осуществляли в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 2 мМ ДТТ и 0.1 мМ dNTP. По три реакции были проведены с каждым дуплексом в присутствии dCTP, dCTP + dATP и dCTP + dATP + TTP. Реакцию проводили в течение 40 мин при 12°C. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7 М мочевины.

Гидролиз олигонуклеотидных дуплексов (I)-(VII)/(VIII) рестрикционными эндонуклеазами EcoRI, XbaI и Eco32I. ³²P-5'-Меченые (обе цепи) олигонуклеотидные дуплексы (I)-(VII)/(VIII) (2.5 пмоль каждого) выдерживали 5 мин при 72°C в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ MgCl₂ и 100 мМ NaCl, и медленно охлаждали до 15°C. В реакционную смесь добавляли меркаптоэтанол до концентрации 5 мМ, затем 5–10 ед. акт. соответствующей рестриктазы. Реакцию проводили в течение 1.5 ч при 37°C, про-

дукты анализировали электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Настоящая работа проведена при финансовой поддержке фондов РФФИ (грант № 99-04-49243), ИНТАС (№ 97-11635), НАТО (PST.CLG.976569) и программы “Национальные приоритеты в медицине и здравоохранении (СПИД)”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ermolinsky B.S., Fomitcheva M.V., Efimtseva E.V., Meshkov S.V., Mikhailov S.N., Esipov D.S., Boldyreva E.F., Korobko V.G. // *Nucleosides Nucleotides*. 1996. V. 15. P. 1619–1634.
2. Ермолинский Б.С., Михайлов С.Н. // *Биоорганическая химия*. 2000. Т. 26. С. 483–504.
3. Mikhailov S.N., Ermolinsky B.S., Efimtseva E.V., Moiseyev G.P., Tunitskaya V.L., Rusakova E.E., Kochetkov S.N., Gritsenko O.M., Gromova E.S., van Aerschot A., Herdewijn P. // *Collection. Symp. Ser.* 1999. V. 2. P. 141–144.
4. Niedballa U., Vorbruggen H.J. // *Org. Chem.* 1974. V. 39. P. 3664–3667.
5. Vorbruggen H., Krolkiewicz K., Bennua B. // *Chem. Ber.* 1981. V. 114. P. 1234–1255.
6. Kiso M., Hasegawa A. // *Carbohydr. Res.* 1976. V. 52. P. 95–101.
7. Brevnov M.G., Gritsenko O.M., Mikhailov S.N., Efimtseva E.V., Ermolinsky B.S., van Aerschot A., Herdewijn P., Rypk A.V., Gromova E.S. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3302–3309.
8. Mikhailov S.N., Efimtseva E.V., Ermolinsky B.S., Fomitcheva M.V., Gritsenko O.M., Brevnov M.G., Gromova E.S., Schepers G., van Aerschot A., Herdewijn P. // *Coll. Czech. Chem. Commun. Special Issue*. 1996. V. 61. P. 210–212.
9. Lemieux R.U., Kulling R.K., Bernstein H.J., Schneider W.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 6095–6105.

Modified Oligonucleotides Containing 1-β-D-Galactopyranosylthymine: Synthesis and Substrate Properties

B. S. Ermolinsky*, M. V. Fomitcheva*, E. V. Efimtseva*, S. N. Mikhailov*, D. S. Esipov***, E. F. Boldyreva***, V. G. Korobko***, A. van Aerschot****, and P. Herdewijn****

*Phone: +7 (095) 939-3528; e-mail: eds@soil.msu.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia

**Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

***Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

****Rega Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Minderbroedersstraat 10, Leuven, B-3000 Belgium

A convenient method of regioselective introduction of 1-β-D-galactopyranosylthymine into oligonucleotides was developed and the substrate properties of the modified oligonucleotides were investigated in the enzymic reaction of formation and hydrolysis of internucleotide bonds. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: modified oligonucleotides, containing 1-β-D-galactopyranosylthymine, synthesis, substrate properties