



УДК 547.963.32 : 543.422.23

ДЕЙСТВИЕ АКТИВИРУЮЩИХ РЕАГЕНТОВ НА
МЕЖНУКЛЕОТИДНЫЕ СВЯЗИ В ПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДЕ*Зарытоза В. Ф., Райт В. К., Черникова Т. С.**Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР;**Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Исследован состав продуктов, образующихся при действии небольших избытков активирующих реагентов — ТПС, ДЦК,ДФХФ и ТФПФ — на цетилтриметиламмонийную соль poly(U) в диметилформамиде. Методом ^{31}P -ЯМР зарегистрировано количественное превращение межнуклеотидного диэфирного фосфата в соединения со значениями химических сдвигов $-17,5$ и $-16,9$ м.д., которые идентифицированы как циклические фосфотриэфиры, отличающиеся друг от друга конфигурацией. Разложение фосфотриэфиров приводит к разрыву (20%) и изомеризации (25%) межнуклеотидных связей в poly(U). Обсуждены пределы применимости процедур, используемых для получения производных по 5'-фосфату дезоксиолигонуклеотидов, в синтезе соответствующих реакционноспособных производных рибоолигонуклеотидов.

В олигонуклеотидной химии для активации терминального фосфата широко применяются ДЦК и арилсульфохлориды [1]. При изучении диэфирного метода синтеза дезоксиолигонуклеотидов ранее [2, 3] было установлено, что активация этими агентами неселективна и фосфодиэфирные группы также участвуют в ряде реакций, приводящих к образованию производных дициклогексилмочевины (в случае ДЦК) и замещенных пирозинатов. Последние, претерпевая последующие превращения, могут приводить к нарушению целостности олигонуклеотида. Межнуклеотидный диэфирный фосфат рибоолигонуклеотидов, как было отмечено при воздействии ДЦК на (pU)₃, трансформируется в обычных условиях в циклические фосфотриэфиры [4], которые были обнаружены также при обработке хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты некоторых рибодинуклеотидов и poly(U) [4, 5].

Настоящая работа предпринята с целью установления качественного и количественного состава продуктов, образующихся при действии наиболее часто используемых активирующих агентов на межнуклеотидные связи полирибонуклеотида. Данные такого рода позволяют оценить пределы применимости процедур, разработанных для получения производных по 5'-фосфату дезоксиолигонуклеотидов [6—8], в синтезе соответствующих реакционноспособных производных рибоолигонуклеотидов.

Сокращения: ТПС — трипропилбензолсульфохлорид; ДЦК — дициклогексилкарбодимид; ДФХФ — дифенилхлорфосфат; ТФПФ — тетрафенилпирофосфат; ДМФА — диметилформамид; СТМА-poly(U) — цетилтриметиламмонийная соль poly(U).

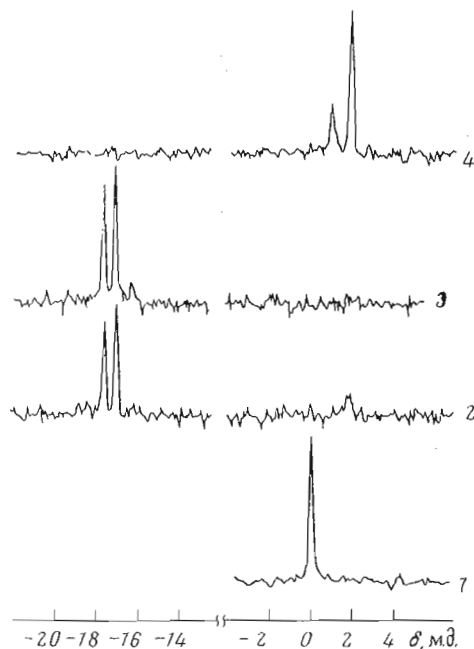


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР СТМА-poly(U) (1) и реакционной смеси, состоящей из СТМА-poly(U) и ТПС, через 7,5 мин после смешения реагентов (2), через 15 мин (3) и спустя 9 мин после добавления воды (4)

В качестве объекта в работе выбраны СТМА-poly(U), ДЦК, ТПС, а также ДФХФ, использовавшийся для получения серии фосфамидных алкилирующих производных олигонуклеотидов [6]. Реакцию проводили в ДМФА при двукратном в пересчете на мономеры poly(U) избытке активирующего агента. За превращениями фосфодиэфирной группировки следили с помощью ^{31}P -ЯМР-спектроскопии. Значения химических сдвигов (δ) всех наблюдаемых сигналов приведены в табл. 1. Состав конечных продуктов определяли дополнительно, сочетая энзимологические и хроматографические методики.

При взаимодействии poly(U) с ТПС в спектрах ^{31}P -ЯМР реакционной смеси кроме сигнала исходного фосфодиэфира (δ 1,8 м. д.) регистрируются два сигнала практически равной интенсивности со значениями химических сдвигов $-17,5$ и $-16,9$ м. д. (рис. 1). Спустя 15 мин изменения в спектрах прекращаются, причем сигнал межнуклеотидной фосфатной группировки полностью исчезает. Точно такие же превращения регистрируются и при добавлении к poly(U) ДФХФ или ТФПФ, с той лишь разницей, что реакция по фосфодиэфиру проходила практически мгновенно и, начиная накопление интерферограмм через 2 мин после смешения реагентов, мы регистрировали только конечные продукты.

ДЦК, в соответствии с его механизмом действия [9], на СТМА-poly(U) не влиял, и спектры реакционной смеси такого состава были идентичны спектру исходного полимера. Добавление в качестве катализатора 0,33 эквивалентов по отношению к мономерам poly(U) трифторуксусной кислоты сопровождалось быстрым (20 мин) превращением $\sim 1/3$ диэфирных фосфатов в соединения с характерными сигналами, наблюдавшимися при взаимодействии ТПС, ДФХФ и ТФПФ с poly(U). Не подбирая специально оптимального соотношения реагентов, полностью превращения фосфодиэфира достигали действием 4 экв. ДЦК и 1 экв. кислоты.

Таким образом, все испытанные реагенты при их относительно небольшом избытке взаимодействуют с межнуклеотидным фосфатом poly(U)

Значения химических сдвигов ^{31}P -ЯМР исследуемых соединений

Соединение	Среда	δ , м.д.
СТМА-poly (U)	ДМФА	0
2',3'-сUMP	»	-17,6
ДФХФ	»	6,3
ТФПФ	»	25,6
Дифенилфосфорная кислота	»	12,1
СТМА-poly (U)	В ДМФА в присутствии реагентов	1,8
Циклический фосфотриэфир	То же	-17,5; -16,9
Дифенилфосфорная кислота	»	12,4
Диэфирный фосфат poly (U)	В реакционной смеси, содержащей воду	2,0
Терминальный фосфат 2' (3')-UMP	То же	1,0
	»	0,9

Таблица 2

Данные анализа продуктов, образующихся при действии активирующих реагентов на poly (U)

Реагент	Состав РНКазного гидролизата, %				Доля изомеризованных связей, %	Соотношение цитидинового и межнуклеотидного фосфатов по данным		Средняя доля гидролизованных связей, %
	(U) ₁	(U) ₂	(U) ₃	(U) ₄		^{31}P -ЯМР	ферментного анализа	
ТПС	53,0	30,3	12,5	4,2	26,6	1:2,2	1:2,8	28,8
ДФХФ	55,8	28,3	12,0	3,8	25,1	1:5,0	1:4,2	17,9
ДЦК	59,6	29,5	9,0	2,0	22,2	1:6,3	1:4,3	16,2

с образованием продуктов иного строения, чем в случае дезоксиолигонуклеотидов [2, 3]. По положению в поле зарегистрированные сигналы могут быть отнесены к циклическим фосфотриэфирам, среднегорупновая величина химических сдвигов которых равна $-15,4 (\mp 2,0)$ м. д. [10]. Для цитидин-2',3'-метилциклофосфата в работе [10] приводится единственное значение химического сдвига ($\delta -18,5$ м. д., в метаноле), тогда как в спектрах реакционных смесей (рис. 1) в этой же области фигурируют два отстоящих на 0,6 м. д. сигнала практически равной интенсивности. Необходимо отметить, что в работе [10] спектры снимались на спектрометре низкой разрешающей способности, а точность отнесения сигналов была не выше 1 м. д. Очевидно, что образование связи диэфирного фосфата с 2'-гидроксильной группой рибозы должно приводить к диастереоизомерам, различающимся конфигурацией циклической триэфирной группировки, и соответствующему разделению сигналов в спектрах ЯМР.

Для разложения циклических фосфотриэфиров в реакционные смеси вводили воду. Во всех случаях наблюдали исчезновение сигналов в слабом поле и появление сигналов со значениями химических сдвигов в области ~ 1 и ~ 2 м. д. (рис. 1, 4). Первый из них соответствует фосфомоноэфире и свидетельствует о разрыве межнуклеотидных связей в poly (U), а второй — фосфодиэфире (см. табл. 1). Времена полного гидролиза циклических фосфотриэфиров находились в зависимости от силы и количества

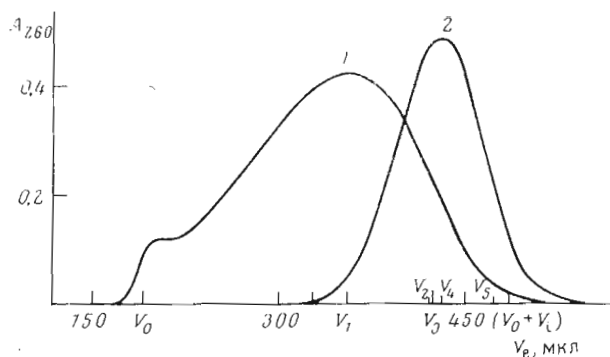


Рис. 2. Гель-хроматография на биогеле А-1,5м poly (U)(I) и poly(U), подвергшейся действию ТПС (2). На оси абсцисс отмечены: V_0 — внешний объем, $V_0 + V_1$ — сумма внешнего и внутреннего объемов; V_1 — объем элюции poly(U); V_2 , V_3 и V_4 — объемы элюции poly(U), подвергшейся действию ДЦК, ДФХФ и ТПС соответственно; V_5 — объем элюции 2'(3')-UMP

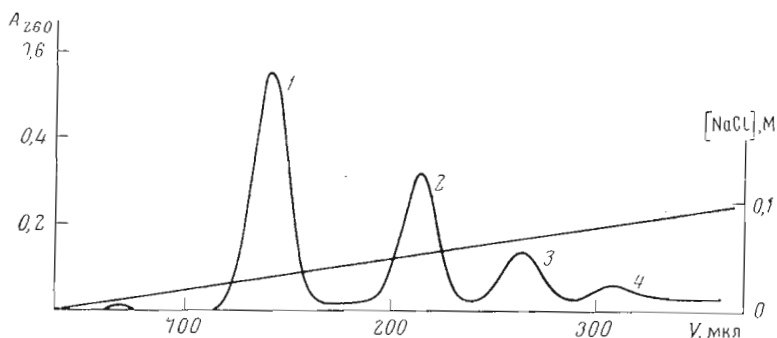


Рис. 3. Хроматография на ТЕАЕ-целлюлозе РНКазного гидролизата poly(U), подвергшейся действию ТПС. 1 — Uр; 2 — (Uр)₂; 3 — (Uр)₃; 4 — (Uр)₄

кислот, добавленных в смеси первоначально (CF_3COOH) или в них образовавшихся (HCl , триизопробилбензолсульфокислота, дифенилфосфорная кислота). Так, спустя 5—10 мин после добавления воды к продуктам взаимодействия poly(U) с ТПС и ДФХФ мы регистрировали лишь сильно-полезные сигналы, тогда как разложение триэфиров в среде, содержащей ДЦК и трифторуксусную кислоту, занимало не менее 1 ч, после чего в спектрах еще длительное время фиксировался сигнал 2',3'-циклофосфата (—17,8 м. д.)

Соотношение интегральных интенсивностей сигналов моно- и диэфирного фосфатов в спектрах реакционных смесей, обработанных водой, так же как и данные анализа с применением ферментов (табл. 2), указывают на существенную деградацию полирибонуклеотида. Гель-хроматография образцов poly(U), подвергшихся действию активирующих реагентов, подтверждает этот факт и дает качественное представление (рис. 2) о молекулярно-весовом распределении образовавшихся олигомеров, часть которых может быть удовлетворительно разрешена ионообменной хроматографией.

Для оценки доли изомеризованных связей образцы poly(U), подвергшиеся действию активирующих агентов, гидролизовали панкреатической РНКазой. В условиях, приводящих к исчерпывающей деградации нативной poly(U), не менее 40% материала этих образцов оказывается

устойчивым к действию фермента и элюируется при хроматографии на ТЕАЕ-целлюлозе в виде олигомеров длиной до тетрамера включительно (рис. 3). Количественный состав продуктов, образующихся в результате ферментативного гидролиза образцов poly(U), а также рассчитанная (без учета терминальной) степень изомеризации представлены в табл. 2.

Усредненные значения степени гидролиза ($\sim 20\%$) и изомеризации ($\sim 25\%$) межнуклеотидных связей в poly(U) могут быть использованы для оценки количества рибоолигонуклеотида, остающегося неизменным после обработки активирующими реагентами. Это количество, очевидно, не может быть больше вероятности того, что при разрыве $\frac{1}{5}$ всех связей в олигомере $(pN)_{x+1}$ уцелеют подряд x связей, т. е. $0,8^x$. Учет изомеризации приводит к значению $0,8^x \cdot 0,75^x$ — вероятности сохранения, кроме того, у олигомера природных $5'$ — $3'$ -фосфодиэфирных связей. Для пентамера ($x = 4$) соответствующие вероятные выходы не выше 0,41 и 0,13.

Несмотря на то что выход с сохранением степени полимерности при малых x оказывается удовлетворительным, использование известных процедур [6—8] для получения производных по $5'$ -терминальному фосфату олигорибонуклеотидов без предварительной защиты $2'$ -ОН-группы рибозы вряд ли целесообразно, поскольку образующийся продукт должен быть гетерогенным, с олигомерной частью, главным образом, неидентичной исходной. Последнее обстоятельство весьма существенно, так как замена природной $3'$ — $5'$ -фосфодиэфирной связи на $2'$ — $5'$ -связь изменяет геометрию олигомеров [11, 12], снижает стабильность комплекментарных комплексов [12, 13]. Кроме того, как было отмечено в работе [14], $2'$ — $5'$ -фосфодиэфирные связи при определенных условиях подвержены гидролитическому расщеплению со скоростью, превышающей скорость гидролиза природных связей приблизительно в 900 раз.

Экспериментальная часть

В работе использованы абсолютированный ДМФА, перекристаллизованный из ацетона бромид цетилтриметиламмония; ДЦК, ТПС и ДФХФ, приготовленные по методам работ [15, 16] и [17] соответственно; ТЕАЕ-целлюлоза (Serva, ФРГ) и биогель А-1,5м (Bio-Rad, США). Водные растворы готовили на бидистиллированной воде.

Калиевую соль poly(U) получали по методике [18], включающей на стадии выделения длительный диализ против растворов, содержащих динатриевую соль EDTA. СТМА-poly(U) получали добавлением к водному раствору полимера двукратного молярного избытка 4% раствора цетавлона. Осадок собирали центрифугированием, промывали трижды водой и сушили в вакуумном эксикаторе над P_2O_5 .

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-НС 12 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в м. д. относительно 85%-ной H_3PO_4 как внешнего стандарта с точностью $\pm 0,2$ м. д. Детали эксперимента описаны в работе [19]. Запись спектров проводили после 300—400 накоплений, среднее время одного накопления 0,6—0,7 с.

Реакцию проводили при 30° непосредственно в ампулах (диаметр 10 мм). Реакционная смесь содержала в 1,5 мл ДМФА 75 мкмоль СТМА-poly(U) и 150 мкмоль активирующего агента. К смеси poly(U) и ДЦК добавляли трифторуксусную кислоту (см. текст). По прекращении изменений в спектрах смесей в ампулы вносили по 0,1 мл воды.

Степень изомеризации и расщепления фосфодиэфирных связей определяли в образцах poly(U), выдержанных с активирующими агентами в описанных выше условиях в течение времени, достаточного для завершения реакции. Далее к смеси добавляли при интенсивном перемешивании 0,15 мл 1М NaI в ацетоне и затем 10 мл ацетона. Осадок собирали

центрифугированием, дважды промывали ацетоном, эфиром и сушили над P_2O_5 в вакууме.

Гидролиз poly(U), подвергшейся действию активирующих агентов, проводили в 0,1М Трис-НСI-буфере (рН 7,5) при 37° в присутствии панкреатической РНКазы. Гидролизаты хроматографировали на микроколонке (объем 60 мкл, длина 50 мм) с ТЕАЕ-целлюлозой в системе Томлинсона — Тенера [20]. Скорость элюции была 335 мкл/ч. Оптическую плотность в элюате регистрировали с помощью микроспектрофотометра [21].

Соотношение концевого и межнуклеотидного фосфатов в образцах определяли, обрабатывая их в 0,1 М Трис-НСI-буфере (рН 8,9), содержащем 0,01 М $Mg(CH_3COO)_2$, последовательно щелочной фосфатазой и ядом гюрзы и измеряя на каждой стадии ортофосфат по методике работы [22].

Гель-хроматография выполнена на колонке (2,5 × 95 мм) с биогелем А-1,5 м, уравновешенным 0,05 М какодилатным буфером, рН 7. Образец наносили в объеме 1,9 мкл и элюировали буфером со скоростью 725 мкл/ч. Оптическую плотность в элюате регистрировали с помощью микроспектрофотометра. V_0 определяли по объему элюции голубого декстрана, $V_0 + V_i$ — по объему элюции хромата калия.

Авторы благодарят проф. Д. Г. Кнорре, стимулировавшего выполнение настоящей работы, и А. В. Лебедева, записавшего спектры ^{31}P -ЯМР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корана Г. (1964) Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты, «Мир», М.
2. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В. (1976) Биоорган. химия, 2, 189—198.
3. Knorre D. G., Lebedev A. V., Zarytova V. F. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 1401—1418.
4. Будкер В. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Кобец Н. Д., Рязанкина О. И. (1977) Биоорган. химия, 3, 618—625.
5. Друца В. Л., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1977) Докл. АН СССР, 233, 595—597.
6. Гринева Н. И., Ломакина Т. С. (1972) Ж. общ. химии, 42, 1630—1634.
7. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. (1976) Биоорган. химия, 2, 179—188.
8. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 903—911.
9. Smith M. S., Moffat G., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6204—6212.
10. Blackburn G. M., Cohen J. C., Todd A. R. (1964) Tetrahedron Lett., 39, 2873—2879.
11. Kondo N. S., Holmes H. M., Stempel L. M., Ts'o P. O. P. (1970) Biochemistry, 9, 3479—3498.
12. Tazawa I., Tazawa S., Stempel L. M., Ts'o P. O. P. (1970) Biochemistry, 9, 3499—3514.
13. Michelson A. M., Monny C. (1967) Biochim. et biophys. acta, 149, 107—126.
14. Usher D. A., McHale A. H. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 1149—1153.
15. Schmidt E., Hitzler F., Lander E. (1938) Chem. Ber., 71, 1933—1938.
16. Lohrmann R., Khorana H. G. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 6212—6222.
17. Brigl P., Müller H. (1939) Chem. Ber., 72, 2121—2130.
18. Райт А. С., Райт В. К., Салганик Р. И. (1976) Биоорган. химия, 2, 706—712.
19. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 126—131.
20. Tomlinson R. V., Tener G. M. (1963) Biochemistry, 2, 697—702.
21. Власов В. В., Грачев М. А., Комарова Н. И., Кузьмин С. В., Мензорова Н. И. (1972) Молекулярн. биология, 6, 809—816.
22. Eibl H., Lands W. E. M. (1969) Anal. Biochem., 30, 51—57.

Поступила в редакцию
12.IV.1977

ACTION OF ACTIVATING REAGENTS ON INTERNUCLEOTIDE LINKAGES OF A POLYRIBONUCLEOTIDE

ZARYTOVA V. F., RYTE V. C., CHERNIKOVA T. S.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, and Novosibirsk State University, Novosibirsk*

The products of the interaction of small excesses of 2,4,6-triisopropylbenzenesulphonyl chloride, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, diphenyl chlorophosphate and tetraphenyl pyrophosphate with celytrimethylammonium salt of poly(U) in DMFA were investigated. Under the action of activating reagents, internucleotide phosphate groups of poly(U) were quantitatively converted to the compounds characterized by chemical shifts -17.5 and -16.9 p.p.m. (85% H_3PO_4 as a reference) that were identified as cyclic phosphotriesters differing by their configurations. Digestion of phosphotriesters leads to degradation (20%) and isomerization (25%) of internucleotide linkages in poly(U). The limitations in applicability of the procedures, currently used to prepare the 5'-phosphate derivatives of deoxyoligonucleotides, are discussed in relation to the synthesis of corresponding reactive ribooligonucleotide derivatives.
