



УДК 547.963.32.0.7 + 543.422.23

СИНТЕЗ 5'-ТРИФОСФАТОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Будкер В. Г., Зарытова В. Ф., Кюорре Д. Г.,
Кобец Н. Д., Рязанкина О. И.*

*Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

На примере получения pppdTpdT и pprUpUpU описан метод превращения 5'-концевой фосфатной группы олигонуклеотидов в трифосфатную группу. Метод основан на реакции трибутиламмонийпирофосфата в DMF с активными производными олигонуклеотидов, получаемыми предварительной обработкой последних дициклогексилкарбодимидом. В случае рибоолигонуклеотида необходима защита 2'-оксигрупп ацетилизацией во избежание превращения фосфодиэфирных групп в циклические триэфирные, образование которых зарегистрировано методом ^{31}P -ЯМР при действии на рибоолигонуклеотиды DCC и хлорангирида мезитиленакарбоновой кислоты. Показано, что pprUpUpU стимулирует связывание Phe-тРНК с рибосомами *E. coli*.

В последнее время обнаружена возможность получения соответствующих γ -фосфамидов селективной реакцией трифосфатных производных олигонуклеотидов с аминами [1, 2], основанной на превращении трифосфатной группы в триметафосфатную в присутствии водорастворимого карбодимида [3, 4] или DCC [5]. Эта реакция открывает возможность получения аффинных аналогов олигонуклеотидов с реакционноспособной группой на 5'-конце, в частности, для модификации мРНК-связывающего центра на рибосоме.

В литературе описан метод получения трифосфатных производных дезоксиолигонуклеотидов, основанный на реакции триалкиламмонийпирофосфатов с морфолидами олигонуклеотидов [1]. Данные работ [5—8] по исследованию взаимодействия $(\text{pdTpdT})\text{Ac}$ с DCC методом ^{31}P -импульсной спектроскопии позволяют рассчитывать на получение трифосфатов олигонуклеотидов, минуя стадию синтеза их морфолидов, поскольку образующиеся при активации динуклеотида тризамещенные пирофосфаты реагируют с нуклеофилами лишь по менее замещенному фосфатному остатку.

Целью настоящей работы является исследование возможности получения трифосфатов дезокси- и рибоолигонуклеотидов путем их активации DCC с последующей реакцией образующихся активных производных олигонуклеотидов непосредственно с пирофосфатом.

Превращение концевой фосфатной группы олигонуклеотида в трифосфатную исследовано на простейшей модели pdTpdT — динуклеотида с незащищенной 3'-ОН-группой.

Сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид; $(\text{pdTpdT})\text{Ac}$ —3'-O-ацетилтимидилил-(5'→3')-тимидин-5'-фосфат; $(\text{pUpUpU})\cdot\text{nAc}$ —ацетилованный по оксигруппам рибозы олигонуклеотид; MsCOCl — хлорангидрид мезитиленакарбоновой кислоты; МКХ — ионообменная микролоночная хроматография. Остальные сокращения приведены в соответствии с рекомендацией IUPAC—IUB.

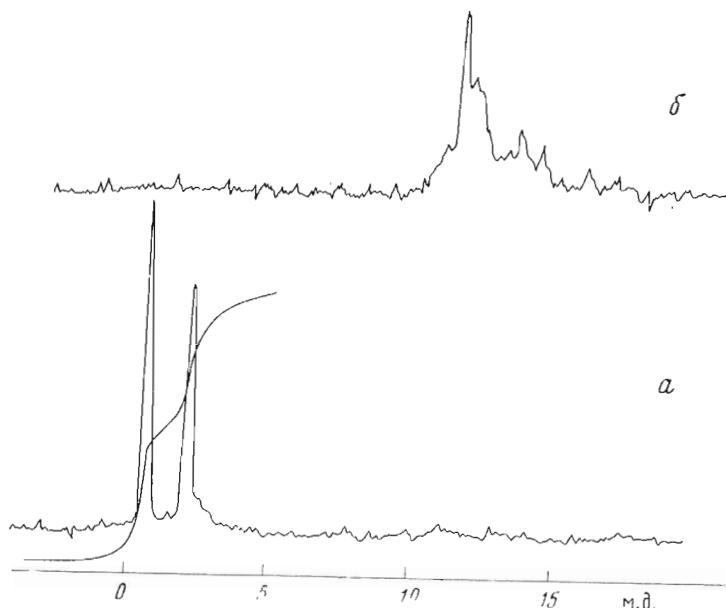
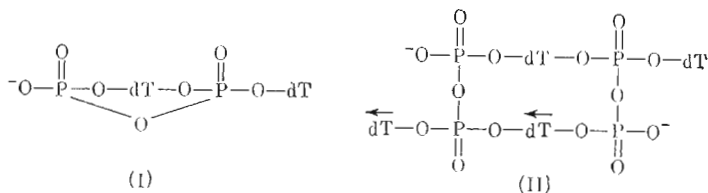


Рис. 1. Спектры ^{31}P -ЯМР в диметилформамиде: а — pdTpdT , б — $\text{pdTpdT} + \text{DCC}$ (через 45 мин после начала реакции)

За превращениями pdTpdT в присутствии DCC следили с помощью метода ^{31}P -импульсной спектроскопии ЯМР. Как видно из рис. 1, в спектре ^{31}P -ЯМР реакционной смеси отсутствуют сигналы концевых ($\delta -0,9$ м. д.) и межнуклеотидного ($\delta 2,6$ м. д.) атомов фосфора и регистрируется сложный сигнал в области 11—17 м.д. Ранее было показано, что сложный сигнал в этой области принадлежит внутри- и межмолекулярным тризамещенным пирофосфатам [6, 7]. По аналогии с этими данными можно заключить, что в случае активации pdTpdT образуются циклические тризамещенные пирофосфаты (I) и (II)



dT^- — остаток тимидина с 5'-оксигруппой справа и 3'-оксигруппой слева.

Удобным методом анализа образования соединений (I) и (II) служит их быстрая реакция с аминами — морфолином и этилендиамином. Образующиеся 5'-фосфамиды имеют соответственно на один или два отрицательных заряда меньше, чем исходный динуклеотид, и могут быть легко обнаружены ионообменной МКХ (рис. 2).

После активации динуклеотида к реакционной смеси был добавлен избыток трибутиламонийпирофосфата. Через некоторое время в реакционной смеси накапливается соединение, которое по положению на профиле МКХ может быть отнесено к rrpdTpdT (рис. 3). В отличие от морфолина реакция соединений (I) и (II) с пирофосфатом протекает медленно. Через сутки при 20° образуется 50% rrpdTpdT . Более длительное выдерживание реакционной смеси не приводит к увеличению выхода продукта. Наряду с основным продуктом в реакционной смеси образуется некоторое количество 5'-дифосфата — по всей видимости, за счет некоторой де-

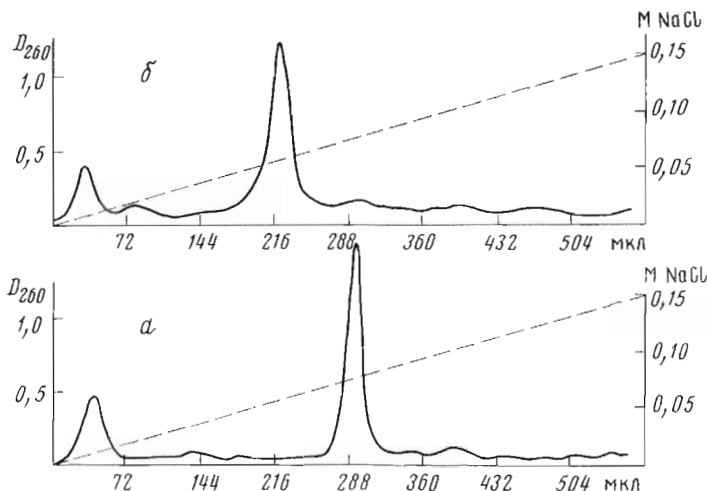


Рис. 2. МКХ при pH 7,5 [16]: *a* — исходной пиридиновой соли $ppdTpdT$; *б* — реакционной смеси, полученной 45-минутной обработкой $ppdTpdT$ ДСС с последующим добавлением 100-кратного молярного избытка морфолина и выдерживанием реакционной смеси в течение 2 ч при 37°

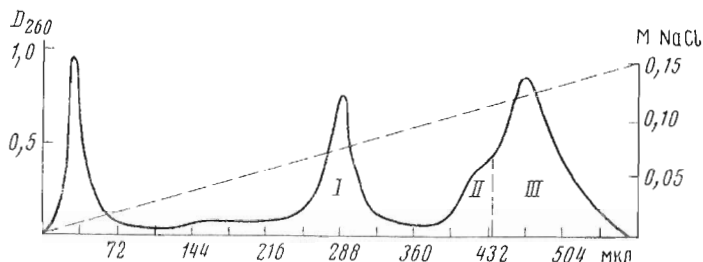


Рис. 3. МКХ при pH 7,5 [16] реакционной смеси, полученной в результате последовательного добавления ДСС к $ppdTpdT$ и через 45 мин трибутиламмонийпирофосфата и выдерживания реакционной смеси в течение суток при 20° в диметилформамиде: *I* — исходный $ppdTpdT$, *II* — $ppdTpdT$, *III* — $pppdTpdT$

градации 5'-трифосфата. Более высокий выход 5'-морфолида динуклеотида ($\sim 80\%$) по сравнению с $pppdTpdT$ скорее всего связан с большей нуклеофильностью морфолина по сравнению с пирофосфатом, что делает его более эффективным конкурентом по отношению к следовым количествам воды, неизбежно присутствующим в используемых растворах.

Продукт реакции выделен ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе в HSO_3^- -форме. Наличие трифосфатной группы подтверждено данными неполного гидролиза щелочной фосфатазой из *E. coli* (фосфогидролаза моноэфиров ортофосфата КФ 3.1.3.1), в результате которого образуется смесь продуктов последовательного дефосфорилирования $pppdTpdT$.

Таким образом, на примере синтеза $pppdTpdT$ показана возможность получения трифосфатов дезоксиолигонуклеотидов, минуя стадию синтеза их морфолидов.

Мы исследовали возможность превращения концевой фосфатной группы рибоолигонуклеотидов в трифосфатную предложенным методом. При обработке $(pU)_7$ дициклогексилкарбодимидом в диметилформамиде с последующим добавлением этилендиамина получена реакционная смесь, содержащая, по данным МКХ на ДЕАЕ-целлюлозе, несколько соединений с зарядом, меньшим, чем аминоэтилаид $(pU)_7$. Это может указывать либо на

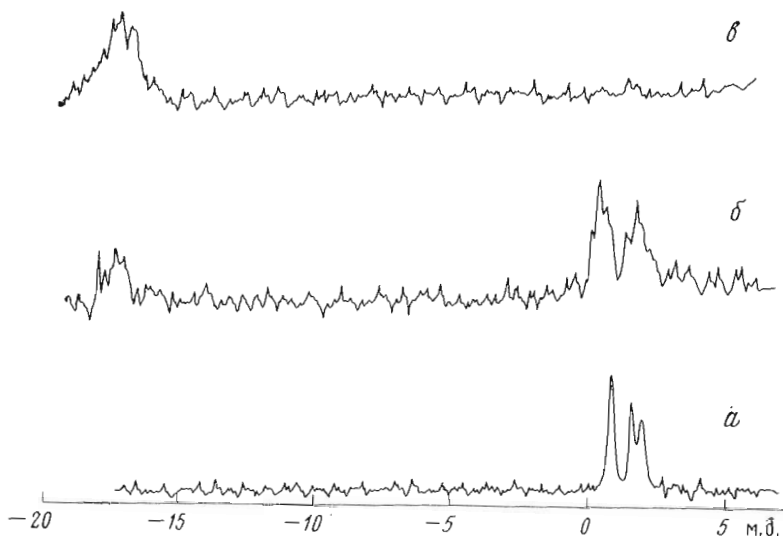


Рис. 4. Спектры ^{31}P -ЯМР в диметилформамиде: *a* — pUpUpU , *б* — реакционной смеси, содержащей pUpUpU и DCC через 45 мин после смешения; *в* — реакционной смеси, содержащей 0,05 ммоль трибутиламмониевой соли ApUp и 1 ммоль MsCOCl в 1,7 мл пиридина через 25 мин после смешения

реакцию амина с фосфодиэфирными группами, либо на разрыв межнуклеотидных связей, т. е. на наличие реакции DCC с межнуклеотидными фосфодиэфирными группами. Чтобы убедиться в существовании такого взаимодействия, мы исследовали спектры ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, используя более короткий олигонуклеотид pUpUpU .

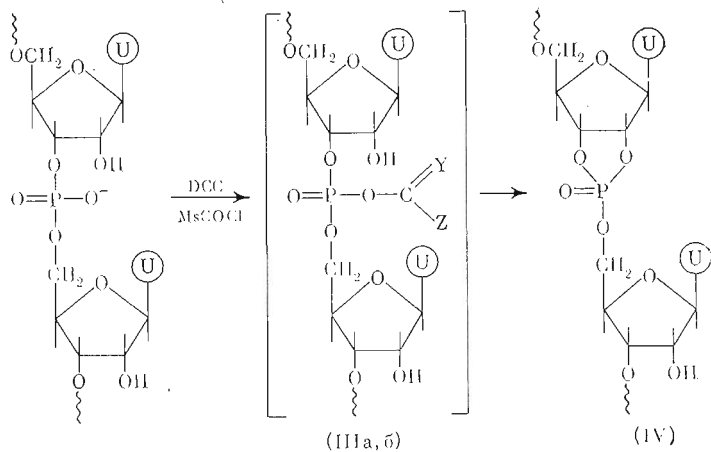
При взаимодействии pUpUpU с DCC в спектрах ^{31}P -ЯМР регистрируется сложный сигнал в области -18 м. д. (рис. 4б), типичной для пятичленных циклических фосфотриэфирных групп [9]. Поскольку величина δ для триэфиров с различными алкильными заместителями различается незначительно, сигналы в области -18 м. д. можно отнести к сигналам циклических фосфотриэфирных групп.

Такие же сигналы появляются при добавлении хлорангидрида мезитилекарбоновой кислоты к ApUp (рис. 4в), что указывает на образование циклических ди- и триэфиров. После длительного выдерживания реакционной смеси или добавления воды сигналы в области -18 м. д. исчезают и появляются сигналы в области, соответствующей концевому и межнуклеотидному фосфатам.

Следовательно, фосфодиэфирные группы могут взаимодействовать с DCC и MsCOCl с образованием активных промежуточных производных (скорее всего, (IIIa) или (IIIб)), которые атакуются внутримолекулярно соседней 2'-ОН-группой с накоплением циклического фосфотриэфира (IV). Последний при обработке водой или другими нуклеофилами может реагировать либо с раскрытием цикла с образованием смеси $2' \rightarrow 5'$ - и $3' \rightarrow 5'$ -фосфодиэфиров, либо с разрывом межнуклеотидной связи (схема).

Чтобы избежать образования циклических фосфотриэфиров, мы ацетилировали оксигруппы остатка рибозы уксусным ангидридом в 5% диметилформамиде, как описано в работе [10]. От избытка ацетата натрия освобождались гель-фильтрацией на сефадексе G-10. Получен препарат $(\text{pUpUpU}) \cdot \text{nAc}$ с содержанием ацетильных групп 80% от теоретического. Наличие ацетильных групп оценивали с помощью гидроксамовой реакции [10].

Активацию $(\text{pUpUpU}) \cdot \text{nAc}$ с помощью DCC проводили аналогично активации pdTpdT в безводном диметилформамиде, при этом в спектре



a: Y = N—C₆H₁₁, Z = NH—C₆H₁₁; б: Y = O, Z = (CH₃)₃C₆H₂

³¹P-ЯМР наблюдали исчезновение сигналов с δ 1,2 и 2,2 м. д. исходного соединения и одновременное появление сигналов в области 11—17 м. д.

При добавлении морфолина к аликвоте реакционной смеси методом МКХ регистрировалось соединение с тремя отрицательными зарядами, что соответствует 5'-морфолиду рибоолигонуклеотида (рис. 5). Таким образом, в этом случае реакция протекает в основном с образованием тризамещенных пирофосфатов типа (I) и (II).

5'-Трифосфатные производные рибоолигонуклеотида получали добавлением к реакционной смеси DCC и (pUpUpU)·nAc избытка трибутиламмонийпирофосфата. Степень протекания реакции определяли методом МКХ.

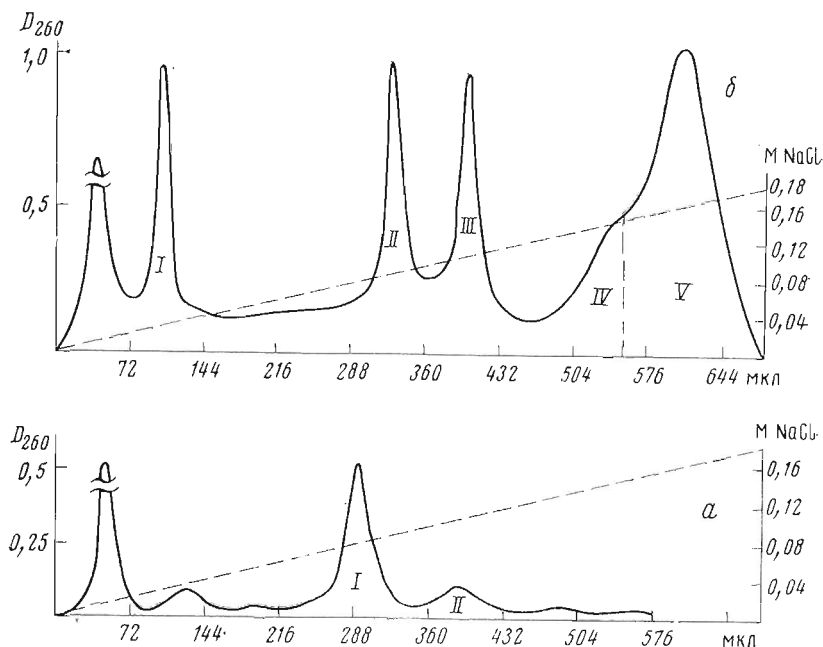


Рис. 5. МКХ при pH 7,5 [16] реакционных смесей, полученных 45-минутной обработкой (pUpUpU)·nAc DCC: а — после добавления 100-кратного молярного избытка морфолина (I — морфолид олигонуклеотида, II — исходный (pUpUpU)·nAc); б — после добавления трибутиламмонийпирофосфата и выдерживания смеси в течение суток при 20° в диметилформамиде (I, II — не идентифицированы, III — (pUpUpU)·nAc, IV — (ppUpUpU)·nAc, V — (pppUpUpU)·nAc). Деацетилирование продуктов и хроматографии специально не исследовалось

Перед выделением продукта ионообменной хроматографией реакционную смесь выдерживали 6 ч при 37° в 2 М Трис-НСI-буфере (рН 8,8) для снятия ацетильных защит [11]. Продукт rrrUpUpU, полученный с выходом 40%, охарактеризован анализом продуктов неполного гидролиза щелочной фосфатазой. При МКХ гидролизата обнаружены пики, соответствующие продуктам последовательного дефосфорилирования rrrUpUpU.

Данные по стимулирующему действию rrrUpUpU на связывание Rhe-тРНК с рибосомами *E. coli* (таблица) свидетельствуют о том, что наличие трифосфатной группы не препятствует взаимодействию тринуклеотида с Rhe-тРНК и рибосомами, т. е. производные такого типа могут использоваться в качестве аналогов кодонов.

Экспериментальная часть

В работе использовали pdTpdT и DCC, синтезированные в группе наработки НИОХ СО АН СССР; rUpUpU получен гидролизом полиуридиловой кислоты * эндонуклеазой из змеиного яда кобры с последующей хроматографией на DEAE-целлюлозе в системе NH_4HCO_3 — водный диоксид. ArUp получен в ОХЦ НИОХ СО АН СССР. MgSOCl любезно предоставлен Т. С. Ломакиной (НИОХ СО АН СССР). Регистрацию оптической плотности элюата при МКХ осуществляли при помощи разработанного в НИОХ микроспектрофотометра МСФП-3 [12].

Хроматографию на бумаге Whatman-3ММ проводили в системе изомасляная кислота — аммиак — вода (66 : 1 : 33), препаративную хроматографию — на DEAE-целлюлозе (DE-52, Whatman).

Для аналитических целей использовали щелочную фосфатазу *E. coli* (предоставлена Г. Т. Бабкиной, НИОХ СО АН СССР).

Спектры ^{31}P -ЯМР записаны на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ В-NC12 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены относительно H_3PO_4 как внешнего стандарта. Диаметр ампулы 10 мм, объем реакционной смеси 1,5 мл. Рибосомы выделяли из *E. coli* MRE-600 методом, описанным в работе [13], тРНК из *E. coli* MRE-600 — способом, охарактеризованным ранее [14]. Аминоацилирование тРНК L -[^{14}C]фенилаланином (удельная активность 100 мКи/ммоль, ЧССР) проводили по стандартной методике [15]. poly(U) — препарат производства СКТБ БАВ (Новосибирск), ультрафильтры фирмы Chemapol (ЧССР). Счет радиоактивности вели в сцинтилляционном счетчике Mark-1 (Nuclear Chicago, США) с использованием сцинтилляционной жидкости: 1 л толуола, 4 г РРО, 0,1 г РОРОР. Эффективность счета — 92%.

*Бис(три-*n*-бутиламмоний)пирофосфат*. 1,33 г (5 ммоль) прокаленного $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ растворяли в 50 мл воды и наносили на колонку со 100 мл дауэкса 50×8 в пиридиневой форме. Смола промывали 400 мл 10% водного пиридина. К элюату добавляли 2,35 мл трибутиламина (10 ммоль). Элюат упаривали до сиропообразной массы и остаток высушивали азеотропной отгонкой с абсолютным пиридином (3×10 мл), а затем с сухим бензолом (3×5 мл). Остаток растворяли в 5 мл абсолютного диметилформамида, перегнанного в вакууме и высушенного над молекулярными ситами типа 4А.

pppdTpdT. 62 мг (87,4 мкмоль) пиридиневой соли pdTpdT растворяли в 1,2 мл сухого диметилформамида, добавляли 0,26 мл 1 М раствора DCC в том же растворителе (260 мкмоль) и оставляли на 45 мин при 20° (рис. 1), затем добавляли 1,4 мл 1 М раствора дитрибутиламмонийпирофосфата в диметилформамиде. Степень протекания реакции определяли с помощью ионообменной МКХ (рис. 3). После 24 ч реакции при 20° смесь разбавляли водой до 150—200 мл и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой DE-52 ($0,7 \times 25$ см) в HCO_3^- -форме и хроматографировали в линейном гра-

* Предоставлена С. К. Василенко.

диснте концентрации 0 — 0,3 М NH_4HCO_3 в 15% водном диоксиде, рН: 7,5. Хроматографический профиль аналогичен приведенному на рис. 3. Пики I, II, III, по данным БХ и повторной МКХ в условиях Томлинсона — Тенера [16], идентифицированы как pdTpdT, ppdTpdT и pppdTpdT соответственно. Фракции, содержащие pppdTpdT, объединяли и упаривали в вакууме досуха. Выход pppdTpdT составил 50%. При частичном гидролизе продукта щелочной фосфатазой (на 4 ОЕ₂₆₀ продукта в 0,1 мл 0,1 М Трис-НСl, рН 8, добавляли 0,1 мл фермента (125 000 ед/мл) и выдерживали 4 ч при 37°) и последующем анализе реакционной смеси МКХ на ДЕАЕ-целлюлозе при рН 7,5 в условиях методики [16] обнаруживали 4 пика, соответствующие pppdTpdT и продуктам его последовательного дефосфорилирования.

Матрица	Величина связывания [¹⁴ C]Phe-тРНК, мкмоль/ /мкмоль рибосом
poly(U)	0,35
pUpUpU	0,15
pppUpUpU	0,17
---	0,05

Гидролизат проанализирован дополнительно с помощью БХ. При этом обнаружены продукты с R_f 0,52 (dTpdT), 0,31 (pdTpdT), 0,22 (ppdTpdT) и 0,12—0,15 (pppdTpdT). При анализе продуктов неполного фосфо-

моноэстеразного гидролиза ppdTpdT с помощью БХ обнаружены три соединения с R_f 0,52 (dTpdT), 0,31—0,32 (pdTpdT) и 0,20—0,22 (ppdTpdT).

(pppUpUpU)·nAc получали аналогично pppdTpdT. 20 мг пиридиниевой соли (pUpUpU)·nAc растворяли в 0,3 мл диметилформамида и добавляли 0,06 мл 1 М раствора DCC в диметилформамиде. Смесь выдерживали 45 мин при 20°, добавляли 1 мл сухого диметилформамида и записывали спектр ³¹P-ЯМР. Основная интенсивность соответствует сигналам в области 10—17 м. д. После записи спектра смесь упаривали в вакууме до конечного объема 0,3 мл, добавляли к ней 0,3 мл 1 М раствора бис(трибутил-аммоний)пирофосфата в диметилформамиде и оставляли на сутки при 20°. Степень протекания реакции определяли ионообменной МКХ (см. рис. 5б). Трифосфат выделен ионообменной хроматографией с выходом 40% и охарактеризован анализом продуктов неполного гидролиза щелочной фосфомоноэстеразой, как описано для pppdTpdT. При МКХ гидролизата обнаружены 4 пика, соответствующие pppUpUpU и продуктам последовательного его дефосфорилирования.

Комплекс pppUpUpU с рибосомами и [¹⁴C]Phe-тРНК получали в условиях методики Ниренберга и Ледера [17]: 0,2 мл инкубационной смеси содержали 10 ед. A₂₆₀ рибосом, 2 ед. A₂₆₀ [¹⁴C]Phe-тРНК, 10 мкг pppUpUpU в буфере следующего состава: 0,1 М Трис-НСl (рН 7,2), 0,05 М NH₄Cl, 0,03 М MgCl₂. Условия инкубации: 20 мин при 25°. Тройной комплекс наносили на ультрафильтры марки HUF5, отмывали от несвязавшейся [¹⁴C]Phe-тРНК тем же буфером (3 × 3 мл) и считали радиоактивность высушенных фильтров в толуольном сцинтилляторе. Результаты представлены в таблице.

Авторы приносят благодарность А. В. Лебедеву за помощь в выполнении эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мшешина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. (1976) Биоорган. химия, 2, 179—188.
2. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Нетесов С. В. (1976) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 1, 117—123.
3. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1975) Биоорган. химия, 1, 611—615.
4. Бабкина Г. Т., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кнорре Д. Г., Ковригина В. С. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 3, 128—132.
5. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В. (1975) Биоорган. химия; 1, 793—799.
6. Knorre D. G., Lebedev A. V., Zarytova V. F. (1976) Nucl. Acids Res., 3, 1401—1418.
7. Бадашкеева А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Шубина Т. Н. (1975) Докл. АН СССР, 222, 97—100.

8. Бадашкева А. Г., Зарытова В. Ф., Урманов И. Х., Шубина Т. Н. (1976) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 1, 124—130.
9. Blackburn G. M., Cohen J. S., Todd A. (1964) *Tetrahedron Lett.*, 2873—2879.
10. Кнорре Д. Г., Мальшева А. Н., Пустошилова Н. М., Севастьянов А. В., Шамовский Г. Г. (1966) *Биохимия*, 31, 1181—1186.
11. Прессман Л. С., Шамовский Г. Г. (1971) *Молекулярн. биология*, 5, 375—383.
12. Власов В. В., Грачев М. А., Комарова Н. И., Кузьмин С. В., Мензорова Н. И. (1972) *Молекулярн. биология*, 6, 809—816.
13. Nirenberg M. W., Matthaei H. (1961) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 47, 1588—1602.
14. Сандахчиев Л. С., Старостина В. К., Стефанович Л. Е., Чучаев В. М. (1967) *Молекулярн. биология*, 1, 463—466.
15. Кнорре Д. Г., Сиротюк В. И., Стефанович Л. Е. (1967) *Молекулярн. биология*, 1, 837—841.
16. Tomlinson R. V., Tener G. M. (1963) *Biochemistry*, 2, 697—702.
17. Nirenberg M. W., Leder P. (1964) *Science*, 145, 1399—1407.

Поступила в редакцию
3.VIII.1976

THE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDE 5'-TRIPHOSPHATES

BUDKER V. G., ZARYTOVA V. F., KNORRE D. G., KOBETS N. D.,
RYAZANKINA O. I.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A method is proposed for the synthesis of ribo- and deoxyribooligonucleotide 5'-triphosphates. The method, which was exemplified by synthesizing, pppdTpdT and pppUpUpU involves activation of the 5'-terminal phosphomonoester group by the reaction of oligonucleotide with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) in dimethylformamide followed by treatment of the reaction mixture with inorganic pyrophosphate. In the case of ribonucleotides, 2'-hydroxy groups are to be protected to avoid converting of the phosphodiester groups to cyclic triester groups. The formation of cyclic phosphotriesters was registered by the NMR-³¹P spectroscopy on the interaction of ribooligonucleotides with DCC and mesitylenecarboxylic acid chloride. It was shown that pppUpUpU stimulates Phe-tRNA binding to ribosomes of *E. coli*.