



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ И СПЕКТРЫ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА АНАЛОГОВ ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ 1-(β-ОКСИЭТОКСИМЕТИЛ)ЦИТОЗИН И 9-(β-ОКСИЭТОКСИМЕТИЛ)АДЕНИН

Тычинская Л. Ю., Лысов Ю. П., Флорентьев В. Л.

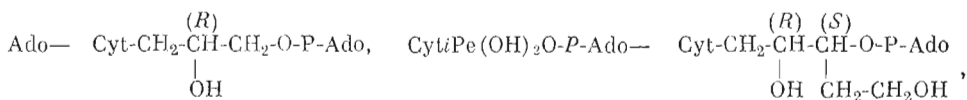
Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Синтезированы аналоги динуклеозидфосфатов, содержащие 1-(β-оксиэтоксиметил)цитозин (НОЕtOMeCyt) и 9-(β-оксиэтоксиметил)аденин (НОЕtOMeAde) в качестве либо 3'-концевого, либо 5'-концевого мономера: AdoMeOEtO-P-Ado, Ado-P-OEtOMeAde, CytMeOEtO-P-Ado, Cyt-P-OEtOMeAde, Ado-P-OEtOMeCyt, а также фосфаты и трифосфаты НОЕtOMeCyt и НОЕtOMeAde. Изучена зависимость спектров КД полученных аналогов динуклеозидфосфатов от температуры в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7) и 6,4 М LiCl и определены термодинамические параметры равновесия в рамках модели двух состояний. Обсуждается роль эфирного кислорода рибозного цикла в организации и стабилизации одноцепочечной спирали олигонуклеотидов.

Аналоги нуклеозидов, содержащие вместо углеводного цикла ациклические заместители, сохраняющие те или иные функциональные группы рибозы, привлекают в последние годы пристальное внимание в связи с широкими возможностями их практического применения как в медицине, так и в биохимических, и физико-химических исследованиях. Так, в частности, было показано [1], что 9-(β-оксиэтоксиметил)гуанин обладает высокой противовирусной активностью при низкой токсичности. Синтезированные в нашей лаборатории оксиалкильные производные нуклеиновых оснований были успешно использованы для изучения механизма действия ряда ферментов [2-4] и в качестве модельных соединений для исследования конформационной ситуации в растворе нуклеотидов [5] и олигонуклеотидов [6].

Настоящее сообщение посвящено получению аналогов, имитирующих цепь C1' - O - C4' - C5' - O - P природных нуклеотидов, синтезу на их основе аналогов динуклеозидфосфатов и изучению физико-химических свойств этих соединений в водном растворе методом КД.

Использованы сокращения в соответствии с рекомендациями IUPAC-IUB по номенклатуре: НОЕtOMeCyt - 1-(β-оксиэтоксиметил)цитозин, НОЕtOMeAde - 9-(β-оксиэтоксиметил)аденин, CytPrO-P-Ado - Cyt-CH₂-CH₂-CH₂-O-P-Ado, CytPr(OH)O-P-



DCC — дициклогексилкарбодимид.

Спектры поглощения и ПМР аналогов динуклеозидфосфатов

| Соединение | Спектры ПМР * | | | | | | | | | | | УФ-спектры | | |
|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------|--------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|---|
| | 8-Н | 2-Н | 6-Н | 5-Н | 1'-CH ₂ | 1'-Н | 2'-Н | 3'-Н | 4'-Н | 5'-Н ₂ | 3'-Н ₂ | 4'-Н ₂ | рН | $\epsilon \cdot 10^{-3}$ M ⁻¹ ·cm ⁻¹ (Жидк. фаз.) |
| AdeMeOEtO-P-Ado | 8,07 с 7,93 с | 7,95 с 7,79 с | | | 5,41 с | 5,86 д (5,3) | 4,56 м | 4,39 м | 4,24 м | 4,04 м | 4,00 м | 3,70 м | 1 7 13 | 23,0 (257) 21,2 (259) 21,6 (259) |
| Ado-P-OEtOMeAde | 8,17 с 8,15 с | 8,04 с 8,00 с | | | 5,60 с | 5,82 д (5,3) | ** | 4,28 м | 4,06 м | 3,85 м' | 3,76 м | 3,64 м | 1 7 13 | 21,8 (257) 20,4 (259) 21,4 (259) |
| CytMeOEtO-P-Ado | 8,39 с | 8,17 с | 7,38 д (7,4) | 5,71 д (7,4) | 5,04 с | 6,06 д (5,5) | 4,73 м | 4,49 м | 4,33 м | 4,09 м | 3,93 м | 3,65 м | 1 7 13 | 18,6 (267) 17,6 (260) 17,6 (260) |
| Cyt-P-OEtOMeAde | 8,15 с | 8,08 с | 7,62 д (7,5) | 5,92 д (7,5) | 5,60 с | 5,76 д (5,0) | 4,42 м | 4,23 м | 3,98 м | 3,80 м | 3,74 м | 3,65 м | 1 7 13 | 19,0 (267) 19,8 (260) 19,8 (260) |
| Ado-P-OEtOMeCyt | 8,15 с | 8,00 с | 7,54 д (7,4) | 5,81 д (7,4) | 5,12 с | 5,92 д (5,2) | ** | ** | 4,40 м | 4,05 м | 3,83 м | 3,83 м | 1 7 13 | 20,6 (267) 20,4 (260) 20,4 (260) |

* Спектры сняты в H₂O.

** Сигналы закрыты остаточным сигналом HOD.

Термодинамические параметры равновесия между открытым и закрытым состояниями природных динуклеозидфосфатов и их аналогов в растворе

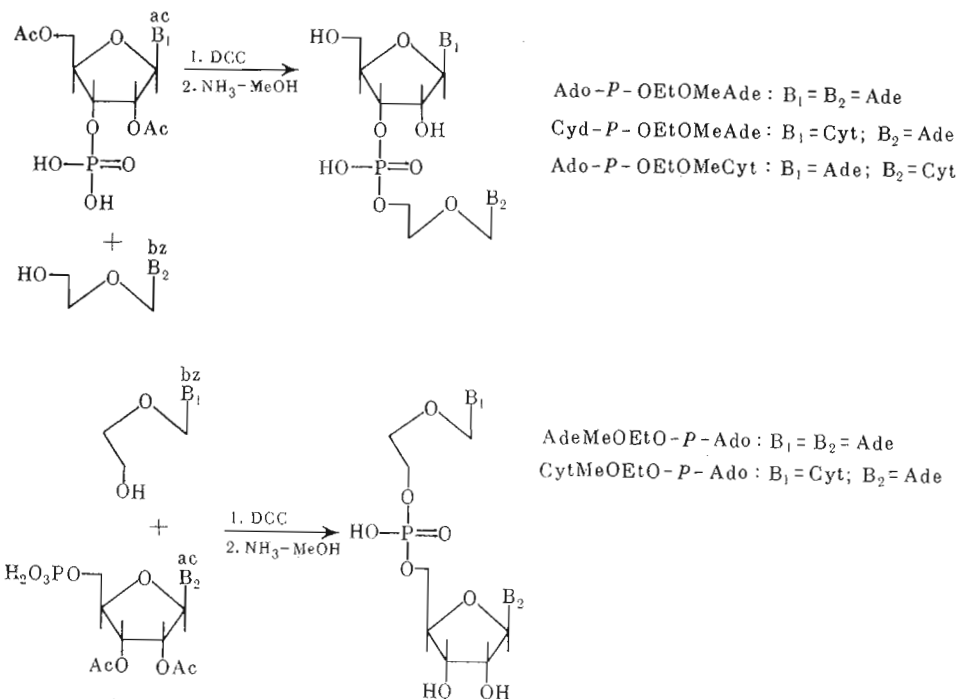
| Соединение | Условия * | $\Delta\bar{H}^\circ$, ккал/моль | $\Delta\bar{S}^\circ$, кал/моль·град | t_m , °C | K° |
|--------------------------|-----------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------|-----------|
| Ado- <i>P</i> -Ado | A | -6,4 | -21,5 | 25 | 0,98 |
| | Б | -4,1 | -14,5 | 10 | 0,69 |
| AdeMeOEtO- <i>P</i> -Ado | A | -8,7 | -30,0 | 17 | 0,67 |
| | Б | -3,6 | -14,5 | -25 | 0,27 |
| Ado- <i>P</i> -OEtOmeAde | A | -6,9 | -23,0 | 27 | 0,99 |
| | Б | -4,9 | -16,5 | 24 | 0,89 |
| Cyd- <i>P</i> -Ado ** | A | -5,8 | -21,0 | 4 | 0,46 |
| | Б | -3,3 | -11,5 | 14 | 0,74 |
| Ado- <i>P</i> -Cyd | A | -6,3 | -21,0 | 27 | 1,07 |
| | Б | -4,6 | -16,5 | 6 | 0,59 |
| Ado- <i>P</i> -OEtMeCyt | A | -8,8 | -32,0 | 2 | 0,29 |
| | Б | -5,5 | -22,0 | -23 | 0,16 |

* A — 0,1 М фосфатный буфер, pH 7; Б — 6,4 М LiCl.

** Данные из работы [6].

После разделения на DEAE-целлюлозе (рис. 1) трифосфаты были выделены в гомогенном состоянии и охарактеризованы хроматографией на бумаге DE-81, спектрами поглощения и ЯМР (табл. 1).

Аналоги динуклеозидфосфатов синтезированы по схеме



Характеристики полученных соединений приведены в табл. 2.

Были изучены некоторые аспекты конформационной ситуации в растворе аналогов динуклеозидфосфатов, поскольку информация такого рода необходима для понимания биохимических свойств этих соединений. Кроме того, в предыдущем сообщении [6] мы высказали предположение

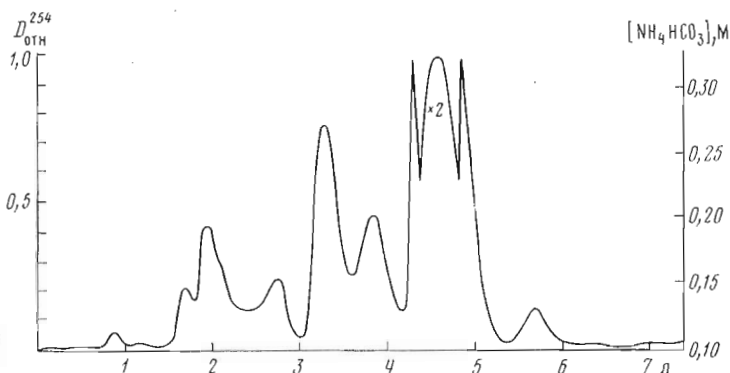


Рис. 1. Кривая выделения AdeMeOEtO-PPP на DEAE-целлюлозе

о существенной роли 1'-О-атома 3'-концевого нуклеотида в стабилизации одноцепочечной спирали олигонуклеотидов за счет образования «скрепок» между этим атомом и гидроксильными группами 5'-концевого мономера через молекулы воды. Синтезированные аналоги динуклеозидфосфатов являются удобными модельными соединениями для проверки этого предположения. В качестве инструмента исследования был выбран метод КД, поскольку он весьма чувствителен к изменению стекинг-взаимодействия в динуклеозидфосфатах. Интерпретацию результатов проводили в рамках модели двух состояний: открытого (I), в котором нуклеиновые основания динуклеозидфосфата разнесены и не взаимодействуют между собой, и закрытого (II), характеризующегося стекинг-взаимодействием оснований:



Терминология модели, аргумента в ее пользу и ее недостатки детально обсуждены в предыдущем сообщении [6].

Были изучены зависимости спектров КД от температуры в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7) и в 6,4 М растворе LiCl. Полученные таким образом кривые плавления были обчислены итерационным методом на ЭВМ Nova-2 по описанному ранее алгоритму [6]. Во всех случаях расчет проводили с «закреплением верхнего параметра», т. е. в предположении, что предельный параметр открытого состояния ($\Delta\epsilon_I$) равен сумме параметров мономеров, образующих динуклеозидфосфат ($\Sigma\Delta\epsilon_m$). Поскольку в изучаемых аналогах динуклеозидфосфатов одна из нуклеотидных единиц ахиральна, $\Delta\epsilon_I$ принимали равным $\Delta\epsilon$ хирального мономера. Разумность такого приближения экспериментально подтверждена нами ранее [10]. Термодинамические параметры равновесия между двумя состояниями приведены в табл. 3. Обращает на себя внимание заметное увеличение $\Delta\bar{H}^0$ и $\Delta\bar{S}^0$ с одновременным понижением t_m при переходе от фосфатного буфера к раствору LiCl. Это явление, отмечавшееся ранее в литературе [11, 12], связано в основном с уменьшением активности воды при высоких концентрациях соли. Тем не менее термодинамические параметры равновесия в обеих средах в ряду изученных соединений изменяются приблизительно параллельно, что указывает на сходство взаимодействий, организуемых закрытое состояние. Кроме того, использование в качестве раствора 6,4 М LiCl значительно расширяет экспериментально доступный температурный интервал (от -60 до $+90^\circ$). При этом достоверность итерации существенно повышается, особенно в случае соединений, для которых величина $\Delta\epsilon_{II} - \Delta\epsilon_I$ относительно мала (например, Cyd-P-OEtOMe Ade).

Сравнение данных, приведенных в табл. 3, показывает, что замещение рибозного цикла на β -оксиэтоксиметильный заместитель в 3'-концевом

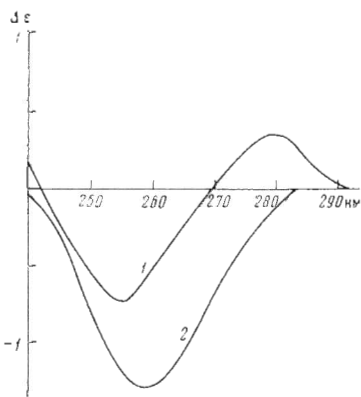


Рис. 2. Спектры КД CytMeOEtO-*P*-Ado (1) и 5'-AMP (2)

пропильный или 4'-оксибутильный заместитель не вызывает существенного уменьшения стабильности закрытого состояния. При этом аналогично природным динуклеозидфосфатам наблюдается четко выраженная зависимость спектров КД от температуры. Однако в случае CytMeOEtO-*P*-Ado изменение спектров КД в изученном интервале не намного превышает экспериментальную ошибку. Возможны два объяснения этого факта: 1) термодинамическая невыгодность стекинг-взаимодействия (точнее, близкое к нулю значение ΔH°), 2) малое различие между предельными спектрами открытого и закрытого состояний. Критерием для отсутствия стекинг-взаимодействия является сходство спектра КД аналога динуклеозидфосфата со спектром хирального мономера, т. е. 5'-AMP. Как видно из рис. 2, спектр CytMeOEtO-*P*-Ado принципиально отличается от спектра 5'-AMP, причем наблюдается характерное для закрытого состояния расщепление на две полосы с противоположным знаком эффекта Коттона. Остается второе объяснение, а именно малая величина $\Delta \epsilon_{11} - \Delta \epsilon_t$. Такое предположение подтверждается поведением AdeMeOEtO-*P*-Ado. И в этом случае при понижении температуры увеличивается преимущественно амплитуда коротковолнового (254 нм) отрицательного экстремума. Температурный градиент при этом несколько больше, чем для CytMeOEtO-*P*-Ado, но на порядок меньше, чем для природных динуклеозидфосфатов. При повышении температуры спектры КД AdeMeOEtO-*P*-Ado и CytMeOEtO-*P*-Ado стремятся к спектру 5'-AMP. Сходное явление было отмечено ранее [6] для аналога Cyt*P*-Ado, несущего в качестве 5'-концевого мономера 1-(2'(R), 3'-диоксипропил)цитозин, но конфигурации при атоме C2' эквивалентный природным нуклеозидам. При понижении температуры изменения в спектрах КД этого соединения заключаются в сдвиге максимума отрицательного экстремума к 254 нм с некоторым увеличением амплитуды и в появлении положительного экстремума при 278 нм. Интересно, что Cyt*i*Pr(OH)₂O-*P*-Ado, в котором конфигурация при атоме C2' энантиомерна природной, по температурной зависимости спектров КД весьма сходен с Cyt*P*-Ado и Cyt*P*PrO-*P*-Ado. На возможных причинах рассмотренных соотношений мы остановимся ниже.

Очень важно знать конформационные параметры закрытого состояния. В этом отношении наиболее информативны предельные спектры КД закрытого состояния, которые легко рассчитать исходя из экспериментальных спектров и термодинамических параметров равновесия между двумя состояниями (рис. 3)*. Однако существующие теоретические концепции

* Поскольку спектр КД CytMeOEtO-*P*-Ado изменяется в зависимости от температуры очень незначительно, что затрудняет машинный расчет предельных спектров, спектр закрытого состояния рассчитывали по формуле $\Delta \epsilon_{11} = 2\Delta \epsilon_m - \Delta \epsilon_t$, принимая $t_m = 10^\circ$.

нуклеотиде динуклеозидфосфата незначительно сказывается на относительной стабильности закрытого состояния. В то же время, как было показано ранее [6], аналог Cyt*P*-Ado, содержащий в качестве 3'-концевого фрагмента 9-(4'-оксибутил)аденин, существует в открытом состоянии во всем изученном интервале температур. Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение о важной роли 1'-О-атома рибозного цикла 3'-концевого мономера динуклеозидфосфата в стабилизации закрытого состояния.

Неожиданным оказалось спектральное проведение CytMeOEtO-*P*-Ado. Действительно, ранее было показано [6], что замена углеводного остатка в 5'-концевом фрагменте Cyt*P*-Ado и Ado-*P*-Ado на 3'-окси-

[13—15] в силу своей приближенности не позволяют количественно связать знак и амплитуду эффекта Коттона с конформационными параметрами динуклеозидфосфата. Интерпретация осложняется анизотропией КД вдоль и перпендикулярно оси спирали [16], при этом $\Delta\epsilon_{\parallel}$ и $\Delta\epsilon_{\perp}$ различаются знаком и намного превосходят по абсолютной величине $\Delta\epsilon$ экспериментальное, так что последнее представляет малую разность двух больших величин; оба компонента по-разному реагируют на изменение конформационных параметров. Наконец, при изучении аналогов динуклеозидфосфатов отсутствует четкий критерий того, что в равновесии участвуют именно два состояния*. Низкие амплитуды спектров КД закрытого состояния могут быть следствием взаимной компенсации спектров двух или более закрытых конформеров. В связи с этим мы ограничимся лишь некоторыми качественными выводами о конформации закрытого состояния.

Из общих стереохимических соображений можно ожидать восемь типов закрытых конформаций. Динуклеозидфосфаты могут образовывать правую (*P*) или левую (*M*) спираль (рис. 4). Кроме того, поскольку стороны нуклеинового основания, стереохимически неэквивалентны, для каждой из спиралей возможны четыре типа стекинга. Обозначим индексом «*a*» ту сторону нуклеинового основания, для которой движение вокруг N1 в пиримидиновых соединениях или N9 в пуриновых от C1' к C2 (C4) и далее к C6 (C8) происходит по часовой стрелке. Противоположную сторону обозначим индексом «*b*» (рис. 5). Тогда как для *P*-, так и для *M*-спиралей возможны «*aa*»-, «*bb*»-, «*ab*»- и «*ba*»-типа стекинга (первый индекс относится к 5'-, а второй — к 3'-концевому мономеру динуклеозидфосфата). До настоящего времени в кристалле наблюдали лишь *P^{ba}*-конформацию [18, 19], представленную на рис. 6а. Теоретический конформационный анализ одно- и двухцепочечных олигонуклеотидов также обычно основывался на регулярной *P^{ba}*-последовательности. Однако для объяснения экспериментальных результатов при изучении динуклеозидфосфатов в водных растворах методами ЯМР [20, 21] и быстрой кинетики [22] было постулировано наличие в равновесной смеси неканонических конформеров, таких, как *M^{aa}* и *P^{aa}* или *P^{bb}*. Кроме того, недавние конформационные расчеты показывают, что стерически разрешены как неканонические конформации одно- и двухцепочечных полинуклеотидов в целом [23, 24], так и отдельные конформационно необычные участки в двухцепочечной канонической спирали ДНК [25, 26]. Причем авторы придают таким участкам важное значение в биологическом функционировании нуклеиновых кислот. Один из примеров неканонического конформера Ado-*P*-Ado приведен на рис. 6б. Таким образом, в настоящее время очевидно, что при изучении динуклеозидфосфатов и их аналогов в водных растворах необходимо учитывать возможность участия в равновесии необычных закрытых конформеров.

Как видно из рис. 3, предельные спектры КД закрытых состояний всех изученных соединений, так же как и природных динуклеозидфосфатов, характеризуются расщеплением длинноволнового КД мономеров на две полосы при ~252 и 274 нм с точкой перемены знака при ~265 нм. Такую форму спектра КД в рамках существующих концепций обычно связывают со стекинг-взаимодействием нуклеиновых оснований. По основным признакам предельные спектры можно разделить на три группы. Первая (AdeMeOEtO-*P*-Ado и CytMeOEtO-*P*-Ado) — канонического вида с положительным экстремумом при 274 нм и отрицательным при 252 нм (рис. 3б). В рамках существующих теоретических концепций такая форма спектров КД свидетельствует о том, что усредненная конформация закрытого состояния соответствует типу *P^{ba}*. Меньшую по сравнению с природными динуклеозидфосфатами амплитуду КД можно объяснить либо изменением конформационных параметров закрытого состояния (например, уменьше-

* Наличие изобестической точки на температурных зависимостях спектров КД не может в данном случае служить доказательством модели двух состояний [17].

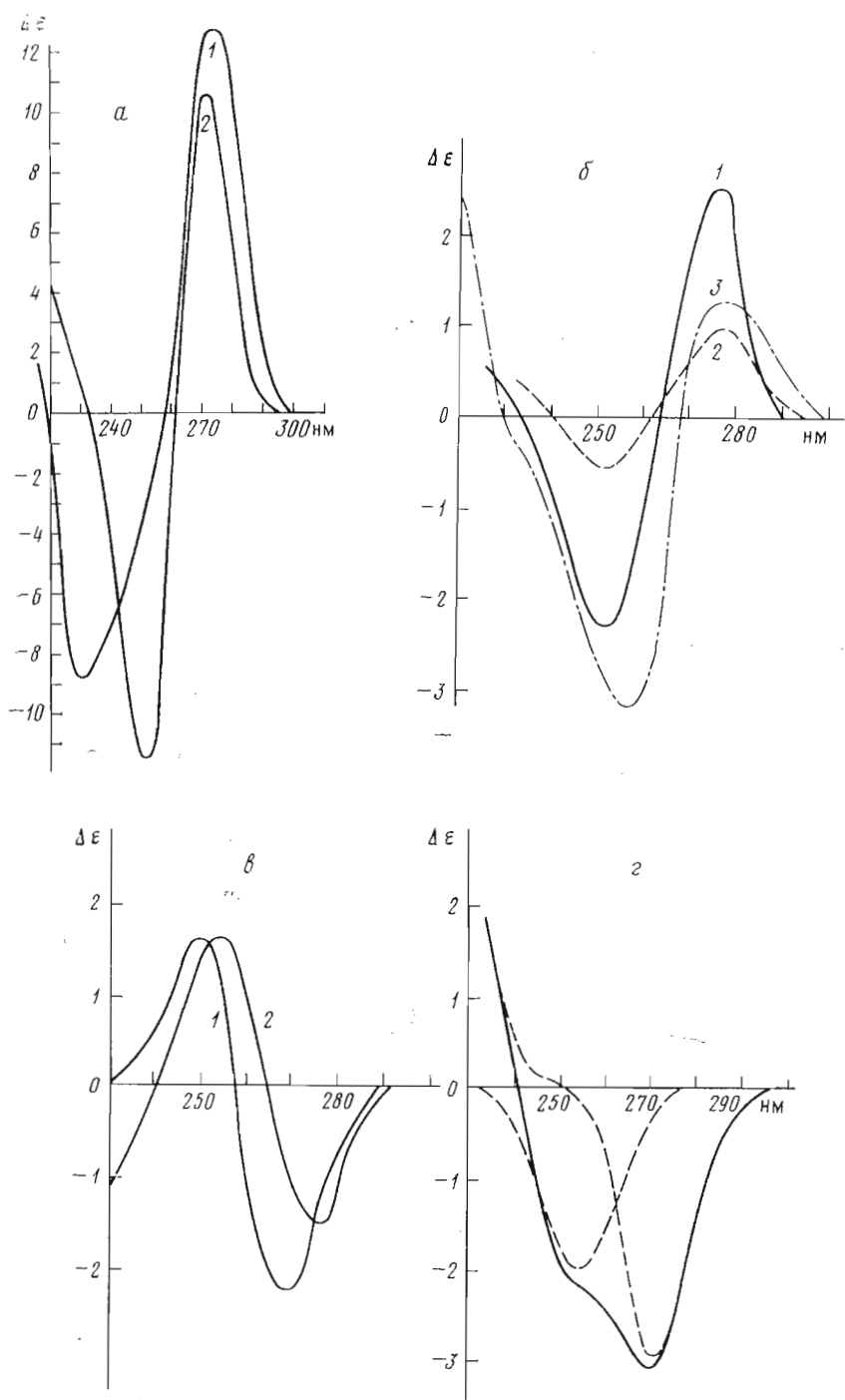


Рис. 3. Предельные спектры КД закрытого состояния: а — Cyt-*P*-Ado (1), Ado-*P*-Ado (2); б — AdeMeOEtO-*P*-Ado (1), CytMeOEtO-*P*-Ado (2), CytPr(OH)O-*P*-Ado (3); в — Ado-*P*-OEtOMeAde (1), Cyt-*P*-OEtOMeAde (2); г — Ado-*P*-OEtOMeCyt (пунктиром обозначено разложение спектрального контура на составляющие)

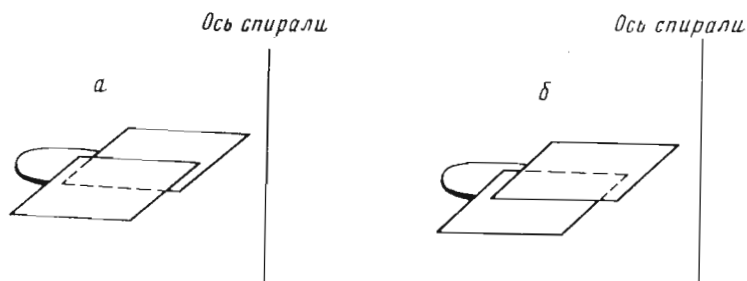


Рис. 4

Рис. 4. Схематическое изображение правой (а) и левой (б) спиралей динуклеозидфосфата

Рис. 5. а — сторона нуклеинового основания в пиримидиновых и б — в пуриновых нуклеозидах

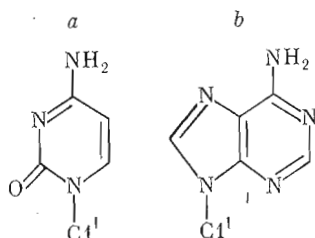


Рис. 5

нием угла между направлениями поляризации моментов перехода нуклеиновых оснований), либо, как указывалось выше, наличием в равновесной смеси закрытых конформеров с противоположным знаком эффекта Коттона, что, на наш взгляд, представляется более вероятным (см. ниже). Здесь уместно вспомнить описанное выше спектральное поведение $\text{CytPr}(\text{OH})\text{O}-P\text{-Ado}$. В предыдущем сообщении [27] мы отнесли отличие предельного спектра КД закрытого состояния $\text{CytPr}(\text{OH})\text{O}-P\text{-Ado}$ от спектра $\text{Cyd}-P\text{-Ado}$ на счет собственного дихроизма 5'-концевого мономера. Однако, как видно из рис. 3б, предельный спектр $\text{CytPr}(\text{OH})\text{O}-P\text{-Ado}$ практически совпадает со спектрами $\text{AdeMeOEtO}-P\text{-Ado}$ и $\text{CytMeOEtO}-P\text{-Ado}$, в которых 5'-нуклеотидная часть ахиральна. Таким образом, следует признать, что высказанное ранее предположение не соответствует вновь полученным экспериментальным данным. Причину сходства предельных спектров КД необходимо искать в сходстве влияния 2'-эфирного кислорода $\text{AdeMeOEtO}-P\text{-Ado}$ и $\text{CytMeOEtO}-P\text{-Ado}$ и 2'-окси-группы $\text{CytPr}(\text{OH})\text{O}-P\text{-Ado}$ на конформационную ситуацию в растворе аналогов динуклеозидфосфатов. Очевидно, что это влияние может проявляться лишь через образование водородных связей.

Вторая группа спектров ($\text{Ado}-P\text{-OEtOMeAde}$ и $\text{Cyd}-P\text{-OEtOMeAde}$), зеркальных по отношению к спектрам первой, характеризуется отрицательным экстремумом при ~ 274 нм и положительным при ~ 252 нм (рис. 3в). В этом случае, исходя из принятых представлений, можно говорить либо о M^{aa} -, либо о P^{ab} -усредненной конформации закрытого состояния.

Наконец, третью группу составляет всего одно соединение — $\text{Ado}-P\text{-OEtOMeCyt}$. Как видно из рис. 3г, разложение спектрального контура дает две отрицательные полосы с максимумами при 254 и 272 нм. Такое спектральное поведение можно объяснить в предположении, что усредненная конформация закрытого состояния относится к M^{aa} - или P^{bb} -типу.

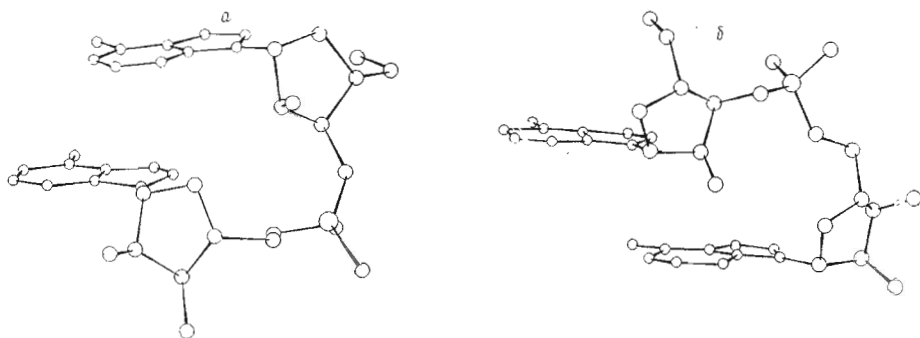


Рис. 6. Модели канонического P^{ba} (а) и неканонического M^{ba} (б) конформеров молекулы Ado-*P*-Ado

На наш взгляд, очень важен тот факт, что сходство или различие предельных спектров закрытого состояния не является случайным, а однозначно определяется химическим строением изученных соединений. Таким образом, обнаруженные нами закономерности носят, вероятно, общий характер и дальнейшее изучение синтезированных аналогов динуклеозидфосфатов представляет определенный интерес для выяснения роли внутримолекулярных водородных связей и взаимодействия с водой в организации и стабилизации одноцепочечных спиралей олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

Спектры КД снимали на дихрографе Roussel-Jouan II (Франция), используя кювету с l 2 см при чувствительности 10^{-5} . В качестве растворителей использовали 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0) и 6,4 М раствор LiCl. Концентрация аналогов динуклеозидфосфатов во всех случаях была близка к $5 \cdot 10^{-5}$ М. Зависимость спектров КД от температуры изучали в интервале от -70 до 80° в растворе LiCl и от 0 до 80° в 0,1 М фосфатном буфере. Спектры ПМР записывали на спектрометре XL-100 (Varian, США). УФ-спектры снимали на приборе Specord UV VIS (ГДР).

Защищенные по аминогруппе гетероциклического основания аналоги нуклеозидов. К суспензии 1-(β -ацетоксиэтоксиметил)цитозина или 9-(β -ацетоксиэтоксиметил)аденина (1 ммоль) [27] в 2,5 мл абсолютного пиридина добавляли 1,5 ммоль (0,17 мл) бензоилхлорида и смесь перемешивали на магнитной мешалке 16 ч при 20° . Добавляли 0,5 мл H_2O , перемешивали 2 ч при 20° и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в хлороформе, промывали водой, раствором $NaHCO_3$, вновь водой, сушили и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 10 мл этанола, добавляли 10 мл 2 н. NaOH и смесь выдерживали 15 мин при 20° . К полученному раствору добавляли дауэкс 50 (пиридиновая форма) до рН 7. Фильтровали, промывали осадок 10% водным пиридином и объединенные фильтраты упаривали в вакууме досуха. Остаток перекристаллизовывали либо из этанола ($HOEtOMeAde$), либо из этилацетата ($HOEtOMeCyt$). Выходы 60—65%. Спектры ПМР приведены в табл. 1.

Аналоги нуклеотидов. Смесь 1 ммоль $HOEtOMeAde$ или $HOEtOMeCyt$ с 2 мл стандартного раствора цианэтилфосфата высушивали многократным упариванием с абсолютным пиридином. К остатку, растворенному в 3 мл абсолютного пиридина, добавляли 10 ммоль дициклогексилкарбодимид. Смесь перемешивали на магнитной мешалке 3 сут при 20° , добавляли 3 мл H_2O и перемешивали еще 12 ч при 20° . Осадок отфильт-

ровывали, промывали 20% водным пиридином, объединенные фильтраты экстрагировали эфиром, водный слой упаривали до половины объема и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, 1 л). Колонку промывали водой до отсутствия УФ-поглощения при 254 нм и элюировали раствором NH_4HCO_3 (линейный градиент от 0 до 0,06 М, объем 10 л). Фракции, содержащие фосфат, объединяли, упаривали в вакууме досуха, 5 раз упаривали с 10 мл воды, растворяли в 20 мл воды и лиофилизировали.

А. Лиофилизированный остаток растворяли в 5 мл полунасыщенного при 0° раствора аммиака в метаноле. Раствор перемешивали 16 ч и упаривали в вакууме досуха. Остаток растворяли в 5 мл 1 н. раствора LiOH, выдерживали 5 мин при 20°, доводили pH до 7,5 с 2 н. HCl и упаривали в вакууме досуха. Размещивали с абсолютным этанолом, переносили на фильтр, тщательно промывали этанолом, затем эфиром и сушили. Выход литиевых солей CytMeOEtO-P и AdeMeOEtO-P 80—83%.

Б. Лиофилизированный остаток растворяли в 5 мл 1 н. раствора LiOH, выдерживали 5 мин при 20°, доводили pH до 7,5 с 2 н. HCl и упаривали в вакууме досуха. Остаток размещивали с абсолютным этанолом, переносили на фильтр, промывали абсолютным этанолом, эфиром и сушили.

Выход литиевых солей CytMeOEtO-P и AdeMeOEtO-P 82—87%.

Аналоги нуклеозидтрифосфатов. Литиевые соли CytMeOEtO-P или AdeMeOEtO-P (0,5 ммоль) переводили в пиридиновые и к раствору соли в 50 мл 50% водного пиридина добавляли 0,125 мл три-*n*-бутиламина. Раствор упаривали в вакууме досуха и остаток высушивали пятикратным упариванием с абсолютным пиридином и двукратным — с сухим диметилформамидом. Растворяли в 5 мл сухого диметилформамида и добавляли раствор 400 мг (2,5 ммоль) карбонилдимидазола в 5 мл диметилформамида. Смесь перемешивали на магнитной мешалке 5 ч при 20°, после чего добавляли 0,1 мл абсолютного метанола и затем при энергичном перемешивании раствор 2,5 ммоль ди(три-*n*-бутиламмониевой) соли пиррофосфорной кислоты в 15 мл сухого диметилформамида. Смесь перемешивали 16 ч при 20°, добавляли 100 мл воды, выдерживали 2 ч и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (HCO_3^- -форма, 500 мл). Промывали водой до отсутствия УФ-поглощения при 254 нм и элюировали раствором NH_4HCO_3 (линейный градиент от 0,1 до 0,4 М, объем 10 л). Типичная кривая разделения приведена на рис. 1. Фракции, содержащие нуклеотид, упаривали в вакууме досуха, NH_4HCO_3 удаляли пятикратным упариванием с 20 мл H_2O , остаток растворяли в 20 мл H_2O и лиофилизировали. Выход аммонийных солей CytMeOEtO-PPP и AdeMeOEtO-PPP 56—62%. Характеристики спектров поглощения и ПМР приведены в табл. 1.

Аналоги динуклеозидфосфатов. Смесь полностью ацетилированного природного 3'- или 5'-нуклеотида (2 ммоль) с *N*-бензоилированным аналогом нуклеозида (1 ммоль) высушивали трехкратным упариванием с абсолютным пиридином, растворяли в 10 мл абсолютного пиридина и добавляли 10 ммоль дициклогексилкарбодимида. Смесь перемешивали 4 сут при 20°. Затем добавляли 10 мл H_2O и перемешивали 16 ч. Отфильтровывали осадок, промывали 20% пиридином, объединенные фильтраты экстрагировали петролейным эфиром, упаривали досуха и 3 раза упаривали с 10 мл этанола. Остаток растворяли в полунасыщенном при 0° метанольном растворе аммиака (5 мл на 1 ммоль ацильных групп) и перемешивали 16 ч. Упаривали досуха, растворяли в 100 мл воды и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой. Элюировали раствором NH_4HCO_3 (линейный градиент от 0 до 0,08 М, объем 10 л). Выходы аналогов динуклеозидфосфатов от 45 до 60%. Характеристики ПМР-спектров приведены в табл. 2.

Авторы благодарят Л. И. Колобушкину (ИМБ АН СССР) за помощь в выполнении эксперимента и В. Б. Журкина (ИМБ АН СССР) за критическое обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schaffer H. J., Beauchamp L., Miranda de P., Elion G. B., Bauer D. J., Collins P. (1978) *Nature*, **272**, 583-585.
2. Gottikh B. P., Kravetsky A. A., Kukhanova M. K., Jatsyna A. A., Kritzyn A. M., Florentiev V. L. (1973) *Mol. Biol. Repts*, **1**, 173-178.
3. Тарусова Н. Б., Викторова Л. С., Цилевич Т. Л., Вигестане Р. Я., Куханова М. К., Краевский А. А., Готтих В. П. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 69-74.
4. Прасолов В. С., Михайлов С. Н., Крицын А. М., Флорентьев В. Л. (1975) *Докл. АН СССР*, **221**, 1226-1228.
5. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Мишарин Ю. А., Падюкова Н. Ш., Флорентьев В. Л. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 1338-1350.
6. Лысов Ю. П., Щелкина А. К., Тычинская Л. Ю., Флорентьев В. Л. (1978) *Молекулярн. биология*, **12**, 443-455.
7. Ikehara M., Ohtsuka E., Kitagawa S., Yagi K., Tomura Y. (1961) *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 2679-2685.
8. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Колобушкина Л. И., Падюкова Н. Ш., Флорентьев В. Л. (1975) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, **8**, 1846-1850.
9. Maeda M., Patel A. D., Hampton A. (1977) *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2843-2853.
10. Крицын А. М., Михайлов С. Н., Степанов С. В., Флорентьев В. Л. (1978) *Молекулярн. биология*, **12**, 233-239.
11. Davis R. C., Tinoco I. (1968) *Biopolymers*, **6**, 223-242.
12. Powell J. T., Richards E. G., Gratzner W. B. (1972) *Biopolymers*, **11**, 235-250.
13. Bush C. A., Tinoco I. (1967) *J. Mol. Biol.*, **23**, 601-614.
14. Cech C. L., Hug W., Tinoco I. (1976) *Biopolymers*, **15**, 131-152.
15. Cech C. L., Tinoco I. (1977) *Biopolymers*, **16**, 43-65.
16. Chung S., Holzwarth G. (1975) *J. Mol. Biol.*, **92**, 449-466.
17. Cohen M. D., Fischer E. (1962) *J. Chem. Soc.*, 3044-3051.
18. Rosenberg J. M., Seemans N. C., Day R. O., Rich A. (1976) *J. Mol. Biol.*, **104**, 145-167.
19. Seeman N. C., Rosenberg J. M., Suddath F. L., Kim J. J. P., Rich A. (1976) *J. Mol. Biol.*, **104**, 109-144.
20. Lee C. H., Tinoco I. (1977) *Biochemistry*, **16**, 5403-5414.
21. Esra F. S., Lee C. H., Kondo N. S., Danyluk S. S., Sarma R. H. (1977) *Biochemistry*, **16**, 1977-1978.
22. Aubard J., Meyer J. J., Dubois J. E. (1977) *Chem. Instrum.*, **8**, 1-16.
23. Broyde S. B., Wartell R. M., Stellman S. D., Hingerty B. (1978) *Biopolymers*, **17**, 1485-1506.
24. Broyde S. B., Wartell R. M., Stellman S. D., Hingerty B., Langridge R. (1975) *Biopolymers*, **14**, 1597-1613.
25. Yathindra N., Sundaralingam M. (1976) *Nucl. Acids Res.*, **3**, 729-747.
26. Rodley G. A., Scobie R. S., Bates R. H. T., Lewitt R. M. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2959-2963.
27. Тычинская Л. Ю., Флорентьев В. Л. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 1461-1463.

Поступила в редакцию
16.XI.1978

SYNTHESIS AND CIRCULAR DICHROISM SPECTRA OF DINUCLEOSIDE PHOSPHATE ANALOGS CONTAINING 1-(β -HYDROXYETHOXYMETHYL)CYTOSINE AND 9-(β -HYDROXYETHOXYMETHYL)ADENINE

TYCHINSKAYA L. Yu., LYSOV Yu. P., FLORENTIEV V. L.

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The analogs of dinucleoside phosphates were synthesized which contain 1-(β -hydroxyethoxymethyl)cytosine (CytMeOEtOH) and 9-(β -hydroxyethoxymethyl)adenine (AdeMeOEtOH) either at 3'-end or at 5'-end, namely AdeMeOEtO-*P*-Ado, Ado-*P*-OEtOMeAde, CytMeOEtO-*P*-Ado, Cyt-*P*-OEtOMeAde, Ado-*P*-OEtOMeCyt. Besides, mono- and triphosphates of CytMeOEtOH and AdeMeOEtOH were prepared. The temperature dependence of CD spectra of dinucleoside phosphate analogs was examined (0.1 M phosphate buffer pH 7; 6.4 M LiCl) and thermodynamic parameters for the equilibrium described by the two-state model were determined. The contribution of ether oxygen of ribose ring into the organization and stabilization of the single-stranded helix of oligonucleotides was discussed.