



УДК 547.963.32 : 542.91

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ.

XVIII. СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ФЕРМЕНТОВ НУКЛЕИНОВОГО ОБМЕНА *

*Женодарова С. М., Глягина В. П., Смолянинова О. А.,
Поломарев В. М.**Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино*

Для синтеза олигорибонуклеотидов с определенной последовательностью нуклеотидных остатков предложен метод, основанный на комплексном использовании ферментов нуклеинового обмена: рибонуклеаз с различной субстратной специфичностью и полинуклеотидфосфорилазы (ПНФазы). Синтезированы три-, тетра-, пента-, гекса- и гентаолигонуклеотиды.

Для решения многих проблем биохимии и молекулярной биологии необходимы синтетические олиго- и полинуклеотиды с определенной последовательностью нуклеиновых оснований. Основной вклад в развитие методов синтеза олиго- и полинуклеотидов дезокси-ряда сделан Х. Г. Кораной и его сотрудниками, осуществившими синтез генов аланиновой [2] и тирозиновой [3] тРНК. Методы синтеза олигорибонуклеотидов значительно менее разработаны: относительно доступными до последнего времени были лишь тринуклеозиддифосфаты [4, 5], недавно появились работы, в которых синтезированы гекса- [6] и нонануклеотиды [7]. Это связано, прежде всего, со значительной лабильностью межнуклеотидной связи в рибо-ряду в щелочной среде и ее склонностью к изомеризации в кислой среде, что осложняет выбор защитных групп. Кроме того, блокирование гидроксильных групп в нуклеозидах и нуклеотидах при переходе от производных дезоксирибозы к производным рибозы значительно усложняется в связи с наличием в молекуле последней «лишней» гидроксильной группы.

В последние годы, наряду с химическими методами синтеза олигорибонуклеотидов, успешно развиваются ферментативные методы, основанные на использовании различных РНКаз (см. обзор [8], а также работы [9—11]). Наиболее длинный олигорибонуклеотид, полученный этим методом, — октануклеотид $\text{ApUpGp(Ap)}_4\text{A}$ [9]. Определенные ограничения такого метода, не позволяющие получать достаточно длинные олигорибонуклеотиды с любой последовательностью нуклеотидных остатков, связаны с субстратной специфичностью рибонуклеаз.

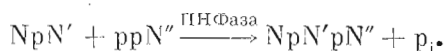
Наиболее целесообразно для синтеза олигорибонуклеотидов, по-видимому, комплексное использование нуклеолитических ферментов: РНКаз с различной специфичностью для получения преимущественно коротких олигонуклеотидов (ди- и три-) и ПНФазы для получения тринуклеозид-

* Сообщение XVII см. [1].

дифосфатов и более длинных олигонуклеотидов. Стратегия синтеза должна определяться нуклеотидной последовательностью, а также доступностью исходных соединений, которые могут быть использованы в качестве субстратов.

Пиримидин-пиримидиновые динуклеотиды наиболее целесообразно синтезировать, используя панкреатическую РНКазу [8, 12], гуанил-пиримидиновые — с участием РНКазы T_1 [8] или РНКазы *Penicillium brevicompactum* [13], аденилил-пиримидиновые — с участием РНКазы *Penicillium brevicompactum* [13]. Тринуклеотиды могут быть синтезированы с помощью панкреатической РНКазы [10, 14], РНКазы T_1 [9], РНКазы *P. brevicompactum* [11]. Однако в некоторых случаях это связано с большими трудностями, например, если на 3'-конце тринуклеотида должен быть пуриновый нуклеозид, а два других нуклеотидных остатка — пиримидиновые. «Трудными» для синтеза, катализируемого РНКазой, являются также пиримидиновые тринуклеотиды (за исключением мономерных). В обоих этих случаях может быть использована ПНФаза [15].

В настоящей работе на примере синтеза тринуклеозиддифосфатов $CpCpA$, $UpCpA$, $ApCpA$, $UpCpG$, $UpUpC$, $GpUpU$, $UpUpC$ и $GpBr^5UpU$ показаны возможности такого комплексного применения ферментов нуклеинового обмена. Тринуклеозиддифосфаты синтезировали по схеме:



Динуклеозидмонофосфаты — акцепторы фосфата в этой реакции — были синтезированы с использованием панкреатической и T_1 РНКаз в условиях, несколько отличающихся от описанных ранее [9, 12]. Результаты приведены в табл. 1. Во всех случаях синтеза проходят с довольно высокими выходами, реакционные смеси легко делятся с помощью электрофореза на бумаге в нейтральном буфере, за исключением $GpBr^5U$, выделявшегося методом препаративной ВХ.

Следует обратить внимание на то, что скорость реакции весьма существенно зависит от природы акцептора фосфата, а в случае панкреатической рибонуклеазы скорость синтеза и выход динуклеозидмонофосфата определяются не столько структурой донора, сколько структурой акцептора фосфата. Так как обязательное условие проявления активности фермента — точная ориентация субстрата (той группировки в субстрате, которая участвует в реакции) относительно функциональных групп в активном центре, то незначительные отклонения в ориентации должны приводить к резкому уменьшению скорости реакции, катализируемой ферментом. По-видимому, из двух субстратов (донора и акцептора фосфата) панкреатическая рибонуклеаза проявляет в этом смысле более жесткие структурные требования к акцептору.

Синтез тринуклеозиддифосфатов проводили, используя полинуклеотидфосфорилазу *Micrococcus lysodeicticus*, в условиях, описанных в работе [15]. Результаты приведены в табл. 2. Как следует из данных табл. 2, тринуклеозиддифосфат образуется во всех случаях, за исключением синтеза, когда в качестве акцептора фосфата использовали гуанилил-(3'—5')-дезоксиринидин. Выход тринуклеозиддифосфата в этой реакции наиболее сильно зависит от природы донора фосфата: самый высокий выход наблюдался для 5'-дифосфата уридина (20—30%), наименьший — для 5'-дифосфатов пуриновых нуклеозидов (3%).

Влияние структуры гетероциклического основания как 5'-концевого нуклеозида (акцепторы UpC , CpC , ApC и донор фосфата ppA), так и 3'-концевого нуклеозида (акцепторы UpC , UpU и донор ppG , акцепторы GpU , $GpBr^5U$ и донор ppU) в изученных нами системах не выявлено, хотя обращает на себя внимание заметное увеличение выхода в случае $GpBr^5U$.

Особо следует остановиться на «отрицательном» результате с $GpdU$. Замена 2'-гидроксильной группы в углеводной части 3'-концевого нуклео-

Таблица 1

Синтез динуклеозидмонофосфатов, катализируемый рибонуклеазами
 $[N > p] = 0,25 \text{ M}$; $[N'] = 0,75 \text{ M}$; $[\text{РНКаза панкреатическая}] = 0,36 \text{ мг/мл}$;
 $[\text{РНКаза } T_1] = 100 \text{ ед/мл}$

Динуклеозид- монофосфат NpN'	РНКаза	Время синтеза, ч	Выход NpN', % на N > p	
			взятый	израсходо- ванный
UpC	Панкреатическая	2	27,8	64,2
UpU	»	24	18,0	35,3
CpC	»	2	23,4	52,0
GpU	T ₁ *	24	35,8	68,0
GpdU	T ₁	24	25,0	
GpBrU ⁵	T ₁ **	6	32,4	67,9

* [РНКаза T₁] = 200 ед/мл.** Синтез проведен М. И. Хабаровой при $[G > p] = 0,02 \text{ M}$; $[G^*U] = 0,2 \text{ M}$;
[РНКаза T₁] = 200 ед/мл.

Таблица 2

Синтез тринуклеозиддифосфатов, катализируемый ПНФазой
M. lysodeicticus

$[ppU] = [ppG] = [\text{акцептор фосфата}] = 0,01 \text{ M}$; $[ppC] = [ppA] = 1/2$
 $[\text{акцептор фосфата}] = 0,05 \text{ M}$; $[\text{ПНФаза}] = 6 \text{ мг/мл}$

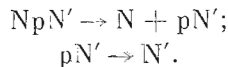
Донор фосфата	Акцептор фосфата	Содержание олигонуклеотидов в реакционной смеси, % на израсходованный акцептор фосфата			
		три-	тетра-	пента-	гекса-
ppU	GpU	20,0	6,6	3,0	2,0*
	GpU**	12,0	4,9	2,8	—
	GpBr ⁵ U	32,0	9,1	4,6	—
	GpdU		Синтез не идет		
ppC	UpU	8,0	3,5	1,7	0,8
ppA	CpC	2,7	—	—	—
	UpC	3,0	—	—	—
ppG	ApC***	2,8	—	—	—
	UpU	5,0	—	—	—
	UpC	2,9	0,6	—	—

* Реакционная смесь содержит 2% гептануклеотида GpUp(Up)U, а гексану-
клеотид не обнаружен.** Буферный раствор содержал Mn²⁺ вместо Mg²⁺.

*** Синтезирован по методике [13].

зида на водород приводит к полной потере динуклеозидмонофосфатом ак-
 цепторных свойств, что согласуется с данными работы [16]. При замене
 Mg²⁺ на Mn²⁺, приводящей к усилению включения ppA в присутствии
 d(ppA) [16], образование GpdUpU также не наблюдается, а GpUpU
 в присутствии Mn²⁺ синтезируется с меньшим выходом (см. табл. 2).

Кроме тринуклеозиддифосфата, образуются более длинные олиго-
 нуклеотиды: тетра-, пента-, гекса- и гепта-, причем это особенно характер-
 но, когда в качестве донора используется 5'-дифосфат пиримидинового
 нуклеотида. Реакционная смесь во всех случаях содержит также непро-
 реагировавший акцептор фосфата, 5'-монофосфат и нуклеозид, соответ-
 ствующие исходному дифосфату, и, в зависимости от структуры исходных
 субстратов, то или иное количество нуклеозидов и 5'-монофосфата, кото-
 рые образуются в результате расщепления динуклеозидмонофосфата-
 акцептора:



Характеристики олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	$U_{отн}^*$	R_f^*	Ферментативный гидролиз		
			РНКаза	продукты	отношение оснований
GpU	0,68	0,54(A)	<i>P. brev.</i>	Gp, U	1:1
GpBr ⁵ U		1,34(B)	»	Gp, Br ⁵ U	1:1
GpUpU	0,77	0,70(A)	»	Gp, Up, U	1:0,94:0,9
		0,64(B)			
GpUpUpU	0,85	0,47(A)	»	Gp, Up, U	1:1,98:0,92
		0,28(B)			
Gp(Up) ₃ U	0,87	0,32(A)	»	Gp, Up, U	1:2,9:0,99
		0,14(B)			
Gp(Up) ₅ U	0,89	0,15(A)	»	Gp, Up, U	1:4,9:1,06
		0,06(B)			
GpBr ⁵ UpU	0,82	0,61(A)	»	Gp, Br ⁵ Up, U	1:0,98:0,95
		0,54(B)			
GpBr ⁵ UpUpU	0,87	0,39(A)	»	Gp, Br ⁵ Up + + Up, U	1:0,90:0,91
		0,21(B)			
GpBr ⁵ Up(Up) ₂ U	0,89	0,23(A)	»	Gp, Br ⁵ Up + + 2Up, U	1:0,71:0,97
		0,11(B)			
UpUpC	0,79	0,96(A)	Панкреати- ческая	Up, C	2:1
			То же		
UpUpCpC	0,83	0,68(A)	»	2Up + Cp, C	1,01:1
UpUp(Cp) ₂ C	0,91	0,48(A)	»	2Up + 2Cp, C	0,96:1
UpUp(Cp) ₃ C	0,98	0,44(A)	»	2Up + 3Cp, C	1:1
UpCpG	0,70	0,95(A)	»	Up + Cp, G	1:1,03
UpCpCpG	0,86	0,47(A)	»	Up + Cp, Gp, G	1:0,9
UpUpG	0,77	1,02(A)	»	Up, G	2,1:1
CpCpA	0,80	0,99(A)	»	Cp, A	1,9:1
UpCpA	0,73	0,70(Д)	»	Up + Cp, A	1:1
ApCpA	0,72	1,01(Г)	»	ApCp, A	1:1

* Определены относительно 3'-концевого 5'-мононуклеотида, за исключением характеристик динуклеозидмонофосфатов, определявшихся относительно 5'-концевого нуклеотида.

Таблица 4

УФ-спектры олигонуклеотидов (H₂O, pH ~ 7)

Олигонуклеотид	λ_{\max}	λ_{\min}	$\frac{E_{260}}{E_{280}}$	$\frac{E_{270}}{E_{280}}$	$\frac{E_{280}}{E_{290}}$	$\frac{E_{290}}{E_{280}}$
GpU	258	231	0,85	0,85	0,60	0,28
GpBr ⁵ U	256*	232	0,96	1,01	0,98	0,61
	275	264				
GpUpU	259	231	0,86	0,85	0,50	0,15
GpUpUpU	259	232	0,83	0,83	0,49	0,18
GpBr ⁵ UpU	265	233	0,80	0,99	0,80	0,41
GpBr ⁵ UpUpU	263	233	0,78	0,96	0,71	0,33
UpUpC	264	232	0,79	0,96	0,59	0,26
UpCpG	257	233	0,95	0,90	0,69	0,42
UpUpG	259	231	0,89	0,85	0,55	0,23
CpCpA	264	231	0,82	0,90	0,50	0,31
UpCpA	263	232	0,83	0,91	0,58	0,28

* C₂H₅OH—H₂O (7:3).

Причина, вызывающая это расщепление, не ясна. Не исключено, что коммерческий препарат ПНФазы, использовавшийся в работе, содержит примеси ферментов, имеющих фосфодиэстеразную и фосфатазную активности. Однако контрольные опыты по инкубированию динуклеозидмонофосфата с ПНФазой в отсутствие донора фосфата не обнаружили фосфоролитического расщепления динуклеотида. Нельзя объяснить это и химиче-

ским расщеплением, так как в смеси обнаружен не Np , а pN' . Структура продуктов расщепления NpN' подтверждалась хроматографированием на бумаге, пропитанной 0,5%-ным раствором бората аммония, в системе Б (см. «Экспериментальную часть») и УФ-спектрофотометрией.

Все синтезированные олигонуклеотиды очищались дополнительно БХ в различных системах и анализировались обычными способами. Характеристики олигонуклеотидов приведены в табл. 3 и 4.

Экспериментальная часть

В работе использовали Na^+ -соли 2',3'-циклофосфатов уридина и аденозина, 5'-дифосфатов уридина, цитидина и аденозина, цитидин, уридин, 5-бромуридин и панкреатическую РНКазу фирмы «Reanal» (Венгрия), дициклогексилгуанидиниевые соли 2',3'-циклофосфатов цитидина и гуанозина, дезоксиуридин, РНКазу T_1 и ПНФазу *Micrococcus lysodeicticus* фирмы «Calbiochem» (США) и 5'-дифосфат гуанозина (Na^+ -соль) фирмы «Merck» (ФРГ). Дициклогексилгуанидиниевые соли $G > p$ и $C > p$ превращали в аммониевые обработкой дауэксом 50 W (NH_4^+ -форма); 5'-дифосфаты очищали перед использованием хроматографией в системе А, остальные субстраты применяли без дополнительной очистки. РНКаза *P. brevicompactum* была выделена С. И. Безбородовой и соавт. [17]. Активность ПНФазы определяли по методике, изложенной в работе [18].

Хроматографию и электрофорез проводили на ленинградской бумаге марки «медленная», предварительно промытой 2 н. HCl , 0,5%-ным раствором динатриевой соли ЭДТА и водой. При хроматографировании использовали следующие системы растворителей: А — этанол — конц. аммиак — вода (65 : 10 : 25), Б — пропанол-2 — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2), В — этанол — 1 М ацетат аммония (7 : 3), Г — пропанол-1 — конц. аммиак — вода (55 : 10 : 35), Д — бутанол-1 — вода — уксусная кислота (5 : 3 : 2). Вертикальный электрофорез (прибор фирмы «Labor», Венгрия) проводили в течение 2 ч при напряжении 20 В/см в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония.

УФ-спектры снимали на спектрофотометре «Specord» (ГДР) с автоматической записью.

Гидролиз олигонуклеотидов. а) 3—4 ОЕ олигонуклеотида растворяли в 0,05 мл трис- HCl буфера (рН 7,6), содержащего панкреатическую РНКазу (~ 1 мг/мл), и инкубировали 3 ч при 37° или оставляли на ночь при ~20°; б) 3—4 ОЕ олигонуклеотида растворяли в 0,02 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 5,2), содержащего РНКазу; *P. brevicompactum* (~1 ед/мл) [13]. Объем смеси доводили до 0,05 мл буферным раствором, не содержащим фермента, и оставляли на ночь при 20°. Во всех случаях гидролизаты анализировали БХ в системах А или Б и УФ-спектрофотометрией.

Синтез динуклеозидмонофосфатов. 125 мкМ нуклеозид-2'3'-циклофосфата и 375 мкМ нуклеозида в 0,5 мл буферного раствора инкубировали при ~0° с РНКазой (панкреатической или T_1). Условия проведения и результаты экспериментов приведены в табл. 1. Реакционные смеси делили методом препаративного электрофореза на бумаге во всех случаях, за исключением синтеза $GrVt^{5U}$, когда для разделения смеси применяли БХ в системе В в течение 24 ч или двукратное хроматографирование в системе Б. Динуклеозидмонофосфаты очищали дополнительно БХ в системах А или Б.

Синтезы с участием ПНФазы. 5 мкМ динуклеозидмонофосфата, 5 мкМ нуклеозид-5'-дифосфата (в случае ppU и ppG) или 2,5 мкМ (для ppC и ppA) и 3 мг фермента растворяли в 0,5 мл 0,05 М трис- HCl буфера, содержащего 0,01 М $MgCl_2$ и 0,05 мМ ЭДТА, и инкубировали при 37°. Через 2 ч всю реакционную смесь наносили на бумагу (33 см) и хроматографировали нисходящим способом в системе А в течение ~15—20 ч.

Полосы, соответствующие различным компонентам реакционной смеси, элюировали водой и анализировали с помощью электрофореза и хроматографии в системе В, а также ферментативного гидролиза и УФ-спектрофотометрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. (1974) Ж. общ. химии, 44, 446—449.
2. Khorana H. G., Agarwal K. L., Büchi H., Caruthers M. H., Gupta N. K., Klepepe K., Kumar A., Ohtsuka E., Rajbhandary U. L., van de Sande J. H., Sgaramella V., Terao T., Weber H., Yamada T., (1972) J. Mol. Biol., 72, 209—217.
3. Basmer P., Agarwal K., Caruthers M. H., Cashion P. J., Fridkin M., Jay E., Kumar A., Loewen P. C., Ohtsuka E., van de Sande J. H., Siderova N., Rajbhandary U. L. (1971) Fed. Proc., 30, 1314—1315.
4. Lehrmann R., Söll D., Hayatsu H., Ohtsuka E., Khorana H. G. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 819—829.
5. Holy A., Smrt J. (1966) Collect. Czech. Chem. Commun., 31, 3800—3816.
6. Ohtsuka E., Ubasawa M., Ikchaha M. (1971) J. Amer. Chem. Soc., 93, 2296—2301.
7. Ohtsuka E., Ubasawa M., Morioka Sh., Ikehara M. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 4725—4733.
8. Женодарова С. М., (1970) Усп. химии, 39, 1479—1493.
9. Mohr S. C., Thach R. E. (1969). J. Biol. Chem., 244, 6566—6576.
10. Кавуниенко А. П., Морозова Э. Н., Тихомирова-Сидорова Н. С. (1971) Ж. общ. химии, 41, 226—232, 679—687.
11. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 787—793.
12. Тихомирова-Сидорова Н. С., Устюжанин Г. Е., Коган Э. М. (1967) Биохимия, 32, 867—872.
13. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1972) Молекулярн. биология, 6, 682—688.
14. Gassen H. G., Nolte R. (1971) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 44, 1410—1415.
15. Leder Ph., Singer M. F., Brimacombe R. L. C. (1965) Biochemistry, 4, 1561—1567.
16. Chou J. I., Singer M. F. (1971). J. Biol. Chem., 246, 7486—7505.
17. Безбородова С. И., Ильина Т. В., Крупянко В. И. (1971) Докл. АН СССР, 196, 1460—1462.
18. Singer M. F., O'Brien B. M. (1963). J. Biol. Chem., 238, 328—334.

Поступила в редакцию *
19.XI.1974

STEPWISE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES. XVIII. SYNTHESIS OF OLIGORIBONUCLEOTIDES BY COMBINATION OF DIFFERENT NUCLEOLYTIC ENZYMES

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SMOLYANINOVA O. A.,
PONOMAREVA V. M.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

A method for the synthesis of oligoribonucleotides of definite sequence is proposed. It is based on the combined use of nucleolytic enzymes, i. e. ribonucleases with different substrate specificity and polynucleotide phosphorilases. One of the variants of this method was tested: RNases A or T₁ catalyzed synthesis of dinucleoside monophosphates ($N > p + N' \xrightarrow{RNase} NpN'$) and the synthesis of trinucleoside diphosphates by polynucleotide phosphorilase *M. lysodeicticus* ($NpN' + ppN'' \xrightarrow{PNase} NpN'pN''$). The following oligoribonucleotides were synthesized according to the above scheme: dinucleoside monophosphates, trinucleoside diphosphates, tetranucleoside triphosphates, pentanucleoside tetraphosphates, hexanucleoside pentaphosphate and heptanucleoside hexaphosphates.

* Статья из портфеля редакции «Журнал общей химии»; дата поступления — 21.VII.1974