



УДК 547.963.32 : 542.91

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XIX*. СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ «УНИВЕРСАЛЬНОГО» ОЛИГОНУКЛЕОТИДА
И ИХ АНАЛОГОВ***Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А.,
Хабарова М. И., Антонович Е. Г., Прокофьев М. А.**Институт биологической физики Академии наук СССР, Пуцдино**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Показано, что комплексное использование ферментов нуклеинового обмена является удобным методом синтеза фрагментов «универсального» олигонуклеотида, содержащих также минорные нуклеозиды, как риботимидин и псевдоуридин. Осуществлен синтез тринуклеозиддифосфатов, входящих в состав универсального олигонуклеотида (или являющихся соответствующими аналогами) как с 5'-, так и с 3'-конца.

Известно, что практически во всех исследованных тРНК, независимо от их происхождения, имеется «универсальная» последовательность нуклеотидов СрТрУрСрРу*** [3, 4], функциональная роль которой пока не установлена, но весьма интенсивно изучается [5,6]. Разработка подходов к синтезу этого универсального олигонуклеотида представляет поэтому исключительный интерес.

Сложность синтетической задачи обусловлена прежде всего наличием в структуре олигонуклеотида двух минорных нуклеозидных остатков (риботимидина и псевдоуридина), которые, с одной стороны, трудно доступны, а с другой — весьма лабильны (псевдоуридин). Учитывая эти обстоятельства, мы считали целесообразным применить для синтеза фрагментов универсального олигонуклеотида методы, основанные на использовании различных нуклеолитических ферментов [7]. Преимущества ферментативных методов перед химическими хорошо известны [8], в данном случае они еще более очевидны, так как лабильность исходных соединений требует мягких условий для синтеза и по возможности небольшого числа стадий, а малая доступность рибозилтимина и псевдоуридина приводит к необходимости ограничиваться небольшими количествами вещества.

В настоящей работе исследован синтез тринуклеозиддифосфатов, содержащих рибозилтимин и псевдоуридин и входящих в состав универсального олигонуклеотида (или являющихся соответствующими анало-

* Предварительное сообщение см. [1].

** Сокращения: ПНФаза — полинуклеотидфосфорилаза; РНКаза — рибонуклеаза.

*** Сокращения названий нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов соответствуют общепринятым [2].

Таблица 1

Синтез тринуклеозиддифосфатов, катализируемый рибонуклеазой T₁
 [G > p] = 0,02 M; [G > p]: [UрN] = 1:5; [РНКаза T₁] = 4 ед./мл; 0° С;
 0,01 M фосфатный буфер (рН 7,0)

GpUpN	Время синтеза, ч	Выход GpUpN, %		Гидролиз G > p, %
		на взятый G > p	на израсходованный G > p	
GpUpΨ	5	9,6	26,1	26,4
GpUpU	5	7,8	33,8	15,0

Таблица 2

Синтез тринуклеозиддифосфатов, катализируемый полинуклеотидфосфорилазой
Micrococcus lysodeicticus

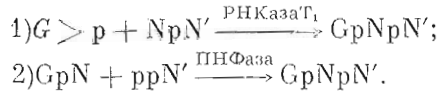
[ppU] = [ppG] = [акцептор фосфата] = 0,01 M; [ppA] = 1/2 [акцептор фосфата] = 0,005 M; [ПНФаза] = 6 мг/мл

Донор фосфата	Акцептор фосфата	Тринуклеозиддифосфат	Выход тринуклеозиддифосфата, %	Донор фосфата	Акцептор фосфата	Тринуклеозиддифосфат	Выход тринуклеозиддифосфата, %
ppU	GpT	GpTpU *	20,3	ppG	UpC	UpCpG	2,6
ppU	GpU	GpUpU *	20,0	ppA	ΨpC	ΨpCpA	5,3
ppG	ΨpC	ΨpCpG	3,9	ppA	UpC	UpCpA	3,0

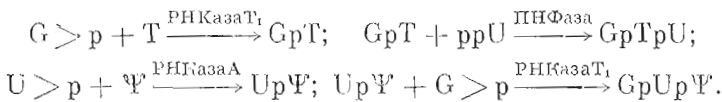
* Реакционная смесь содержит также заметные количества более длинных олигонуклеотидов: GpTpUpU — 6%, GpTpUpUpU — 5% и GpUpUpU — 6,6%, GpUpUpUpU — 3%, GpUpUpUpUpU — 2%.

гами) как с 5'-, так и с 3'-конца: Gp'TpU, GpUpΨ (аналоги GpTpΨ), ΨpCpG и ΨpCpA*.

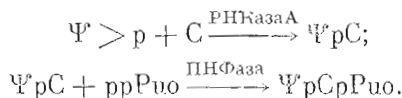
Синтез тринуклеозиддифосфатов, содержащих остаток гуанозина на 5'-конце, может быть осуществлен двумя путями:



На примере синтеза GpUpU нами исследованы оба варианта. Оказалось, что выходы GpUpU в обоих случаях отличаются немного (см. табл. 1 и 2) и, следовательно, «стратегия» синтеза должна определяться главным образом доступностью тех или иных исходных реагентов. Так как относительно доступными среди минорных компонентов тРНК являются соответствующие нуклеозиды (коммерческие препараты), для синтеза аналогов GpTpΨ, имеющих минорный компонент в центре и на 3'-конце, были выбраны различные пути:



Тринуклеозиддифосфаты ΨpCpG и ΨpCpA, имеющие остаток псевдоуридина на 5'-конце, синтезировали по общей схеме:



* В тРНК^{fMet} из *E. coli* и тРНК^{Ser} из дрожжей GpTpΨpCpPuO содержит Puo-A, во всех остальных тРНК — Puo-G.

Синтез динуклеозидмонофосфатов GrN, катализируемый РНКазой T₁
 $[G > p] = 0,0625 \text{ M}$; $[G > p] : [N] = 1 : 3$; $[РНКазы T_1] = 50 \text{ ед./мл}$; $0,01 \text{ M}$
 фосфатный буфер (рН 7,0)

GrN	Время синтеза, ч	Состав реакционной смеси, %				Синтез / Гидролиз*	Выход GrN, % на израсходованный G > p
		GrN	GrG > p	Gr	G > p		
GrT	22	30,4	2,5	13,4	53,7	2,3	65,6
GrΨ	6	17,8	3,0	14,8	64,4	1,2	47,1
GrU	6	21,8	4,1	11,4	62,7	1,9	50,4
GrdT	24	18,2	2,4	14,2	65,1	1,3	52,1

* Под отношением синтез/гидролиз подразумевается отношение количества нуклеозид-2',3'-циклофосфата, пошедшего на образование динуклеозидмонофосфата, к количеству нуклеозид-2',3'-циклофосфата, распавшегося до нуклеозид-3'-фосфата за одно и то же время.

Таблица 4

Синтез динуклеозидмонофосфатов, катализируемый панкреатической РНКазой

Динуклеозидмонофосфат NpN'	Время синтеза, ч	Состав реакционной смеси, %			Синтез / Гидролиз	Выход, % на N > p
		NpN'	Np	N > p		
ΨpC *	4	19,7	14,6	65,7	1,3	57,4
UpC *	2	27,8	16,5	56,7	1,7	64,2
UpΨ	8 **	10,3	45,2	44,5	0,2	18,6
	24 ***	5,3	56,3	38,4	0,09	8,6
UpU	1,5 **	13,4	25,3	61,3	0,5	34,7
	24 ***	7,4	43,6	49,0	0,1	14,5

* $[N > p] = 0,25 \text{ M}$; $[C] = 0,75 \text{ M}$; $[РНКазы] = 0,4 \text{ мг/мл}$; $0,05 \text{ M}$ трис-НСl буфер (рН 7,6);

** $[U > p] = 0,05 \text{ M}$; $[N'] = 0,15 \text{ M}$; $[РНКазы] = 0,17 \text{ мг/мл}$; $0,05 \text{ M}$ трис-НСl буфер (рН 7,6);

*** $[U > p] = 0,25 \text{ M}$; $[N'] = 0,75 \text{ M}$; $[РНКазы] = 1 \text{ мг/мл}$; 50%-ный пиридин.

Этот вариант, по нашему мнению, является наиболее целесообразным, так как присоединение пуринового остатка к динуклеотиду с использованием РНКазного катализа, во-первых, требует предварительной защиты пиримидин-пиримидиновой межнуклеотидной связи, а, во-вторых, как правило, дает низкие выходы даже на уровне динуклеотидов [9]. Эти же недостатки были бы свойственны и другому варианту: присоединение динуклеозидмонофосфата СрР₁₀ к Ψ > Р.

Результаты синтезов приведены в табл. 1 и 2. Катализируемый рибонуклеазой T₁ синтез тринуклеозиддифосфатов типа GrUpN практически мало зависит от природы 3'-концевого нуклеозида в динуклеозидмонофосфате — акцепторе фосфата, что совпадает с данными работы [10] для других субстратов. Выход GrUpN достаточно высок, а субстраты, не вошедшие в реакцию, легко регенерируются, хотя следует отметить, что потери акцептора — динуклеозидмонофосфата выше, чем потери донора, и что UpΨ труднее регенерируется, чем UpU.

Синтез тринуклеозиддифосфатов с участием ПНФазаы *M. lysodeicticus* осуществляли в условиях, предложенных в работе [11]. Как уже отмечалось ранее [7], лучшие результаты были получены в синтезах с использованием в качестве донора фосфата 5'-дифосфата уридина. При этом наряду с тринуклеозиддифосфатом образуются более длинные олигонуклеотиды (тетра-, пента- и т. д.), которые довольно легко могут быть выделены из реакционной смеси хроматографированием на бумаге в системе этанол — ацетат аммония.

Динуклеозидмонофосфаты, необходимые как исходные субстраты для синтеза тринуклеозиддифосфатов, также были получены ферментативно:

Характеристики олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	$U_{отн}$	R_f (система)	Ферментативный гидролиз		
			РНКаза	Продукты	Отношение оснований
GrT	0,65 *	0,52(A)	<i>P. brev.</i>	Gr, T	0,96 : 1
GrΨ	0,68 *	0,46(A)	»	Gr, Ψ	0,87 : 1
GrU	0,68 *	0,54(A)	»	Gr, U	1 : 1
UrΨ	0,68 *	1,12 *(B)	Панкреатическая	Ur, Ψ	1 : 1,04
UrΨр	—	0,18(A)	То же	Ur, Ψр	1 : 1
ΨрC	0,63 *	0,27(B)	»	Ψр, C	1 : 0,9
UrC	0,63 *	0,28(B)	»	Ur, C	1 : 1
GrTpU	0,73 **	0,68 *(B)	<i>P. brev.</i>	Gr, Tp, U	1 : 0,94 : 1
GrUrΨ	0,89 *	0,51 *(B)	»	Gr, Ur, Ψ	1,16 : 1,04 : 1
GrUrU	0,75 **	0,65 *(B)	»	Gr, Ur, U	1 : 1 : 0,93
ΨрCpC	0,74 **	1,0 *(A)	Панкреатическая	Ψр, Cp, C	1,03 : 1 : 1,09
UrCpC	0,72 **	1,0 *(A)	То же	Ur, Cp, C	1 : 1 : 1,15
ΨрCpA	0,73 **	0,1 (B)	»	Ψр, Cp, A	1,06 : 1 : 1,06
UrCpA	0,70 **	0,1 (B)	»	Ur, Cp, A	1 : 1 : 1,09
GrTpUrU	0,83 **	0,3 *(B)	<i>P. brev.</i>	Gr, Tp, Ur, U	1 : 0,84 : 0,97 : 1,0
GrTpUrUrU	0,89 **	0,14 *(B)	»	Gr, Tp, Ur, U	1 : 0,92 : 1,89 : 1,1

* Определены относительно 5'-нуклеотида.

** Определены относительно 3'-нуклеотида.

GrT, GrU, GrΨ — с участием РНКазы T₁; ΨрC, UrΨ — с участием панкреатической РНКазы. Результаты синтезов представлены в табл. 3 и 4.

Синтез динуклеозидмонофосфатов типа GrN осуществляли в условиях, пайденных оптимальными для GrdT в случае использования рибонуклеазы T₁ (учитывался выход GrdT и растворимость dT в условиях синтеза). Псевдоуридин в этих условиях также полностью растворяется. Анализ данных табл. 3 показывает, что наибольший выход получен в случае, когда акцептором фосфата был риботимидин, результаты с тимидином, уридином и псевдоуридином практически одинаковы, только в случае уридина стабилизирующее действие акцептора фосфата [12] приводит к более высокому отношению синтез/гидролиз, чем для псевдоуридина и тимидина.

Синтез UrΨ (и UrU соответственно) проводили при разных концентрациях субстратов, применяя в случае высокой концентрации 50%-ный водный пиридин [8] в качестве среды для реакции, так как псевдоуридин плохо растворим в воде. Максимальная концентрация UrΨ в реакционной смеси оказалась практически одинаковой в обоих случаях, однако предпочтительнее работать в водном буферном растворе, так как в пиридине равновесная концентрация UrΨ устанавливается значительно медленнее, а донор фосфата расщепляется сильнее, что приводит к низкому выходу UrΨ. Аналогичное влияние среды на ход синтеза прослеживается и в случае UrU. Чтобы проверить, чем обусловлен низкий выход UrΨ в водном буфере — плохой растворимостью субстрата (и, следовательно, невозможностью создать оптимальную концентрацию акцептора фосфата в реакционной смеси) или специфичностью фермента, мы провели синтез UrΨр при начальных концентрациях субстратов и фермента, соответствующих оптимальным (см. табл. 4); аммонийная соль псевдоуридиловой кислоты хорошо растворяется в водном буфере. Оказалось, что UrΨр образуется в незначительных количествах, при этом выделение его из реакционной смеси обычным способом затруднено вследствие сходства поведения UrΨр и Ur как при электрофорезе, так и при хроматографиро-

УФ-спектры олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\frac{E_{250}}{E_{260}}$	$\frac{E_{270}}{E_{280}}$	$\frac{E_{280}}{E_{290}}$	$\frac{E_{290}}{E_{280}}$
GpT	259 ^{1*}	231	0,85	0,92	0,67	0,32
GpУ	256 ^{1*}	231	0,93	0,83	0,63	0,32
GpU	258 ^{1*}	231	0,90	0,85	0,60	0,28
УрУ	{ 264 ^{2*}	236	0,70	0,93	0,44	0,09
	{ 265 ^{3*}	247	0,81	1,0	0,80	0,61
УрС	{ 278 ^{2*}	252	0,91	1,24	1,32	1,02
	{ 267 ^{3*}	236	0,79	1,04	0,73	0,30
УрС	267 ^{2*}	246	0,96	1,0	0,80	0,30
GpTpU	259 ^{1*}	233	0,83	0,89	0,62	0,29
GpUpУ	{ 258 ^{2*}	233	0,89	0,89	0,68	0,48
	{ 264 ^{3*}	242	0,91	0,98	0,82	0,42
GpUpU	257 ^{4*}	228	0,92	0,83	0,54	0,21
УрСрG	258 ^{1*}	232	0,94	0,91	0,70	0,38
УрСрG	257 ^{1*}	233	0,95	0,90	0,69	0,42
УрСрA	264 ^{3*}	233	0,80	0,94	0,58	0,27
УрСрA	264 ^{3*}	233	0,79	1,0	0,68	0,29
GpTpUpU	260 ^{1*}	232	0,81	0,85	0,58	0,24

^{1*} В воде. ^{2*} В 0,1н. HCl. ^{3*} В 0,1н. КОН.

^{4*} В смеси этанол — вода (7 : 3).

вании в различных системах растворителей в отличие от монотонных пиримидин-пиримидиновых динуклеотидов. Так как замена нуклеозида на нуклеотид в качестве акцептора фосфата, как правило, не оказывает большого влияния на выход, можно считать, что низкие выходы УрУ и СрУ [13] в реакциях, катализируемых панкреатической РНКазой, связаны с особыми требованиями фермента к структуре акцептора фосфата.

Все синтезированные динуклеозидмонофосфаты и тринуклеозиддифосфаты очищали с помощью хроматографии и электрофореза на бумаге, подтверждая структуру полученных соединений обычными способами. Характеристики олигонуклеотидов приведены в табл. 5, 6.

Экспериментальная часть

В работе использовали цитидин, уридин-2'3'-циклофосфат (Na⁺-соль), 5'-дифосфаты уридина и аденозина (Na⁺-соли), а также панкреатическую РНКазу фирмы «Reanal» (Венгрия), гуанозин-2',3'-циклофосфат (дидиклогексилгуанидиниевую соль), РНКазу T₁ и ПНФазу *M. lysodeicticus* фирмы «Calbiochem» (США), уридин и 5'-дифосфат гуанозина (Na⁺-соль) фирмы «Merck» (ФРГ), псевдоуридин и рибозилтимин фирмы «Serva» (ФРГ) и тимидин фирмы «Fluka» (Швейцария). Дидиклогексилгуанидиниевую соль G > p превращали в аммониевую обработкой дауэксом 50W (NH₄⁺-форма), 5'-дифосфаты нуклеозидов очищали хроматографией на бумаге в системе А, остальные субстраты использовали без дополнительной очистки. 2',3'-циклофосфат псевдоуридина был получен из псевдоуридина фосфорилированием по методике, предложенной в работе [14], неспецифичная РНКаза *P. brevicompactum* выделена С. И. Безбородовой и соавт. [15].

Хроматографию и электрофорез проводили на ленинградской бумаге марки «медленная», предварительно промытой 2 н. HCl, 0,5%-ным раствором натриевой 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 (5 : 2). Вертикальный электрофорез

проводили в течение 2 ч при напряжении 20 В/см в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония (рН 7,6).

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

Гидролиз олигонуклеотидов. 3—4 ОЕ олигонуклеотида растворяли в 0,02 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 5,2), содержащего РНКазу *P. brevicompactum* в концентрации ~1 ед/мл. Объем раствора доводили до 0,05 мл буферным раствором, не содержащим фермента, и оставляли на ночь при ~20°. В ряде случаев (пиримидин-пиримидиновые последовательности в олигонуклеотидах) применяли панкреатическую РНКазу при концентрации ~1 мг/мл и трис-НСl буфер (рН 7,6). Во всех случаях гидролизаты анализировали БХ в системах А или Б и УФ-спектрофотометрией.

Синтез олигонуклеотидов, катализируемый РНКазами. Смесь нуклеозид-2',3'-циклофосфата и нуклеозида (или динуклеозидмонофосфата) инкубировали с ферментом при ~0°. Начальные концентрации субстратов и фермента, а также состав буферного раствора приведены в табл. 1—3. Как правило, общий объем реакционной смеси составлял 0,05—0,1 мл. Пробы реакционной смеси или всю реакционную смесь через определенные промежутки времени анализировали методом электрофореза или БХ в системе Б (GrUp Ψ) с последующим УФ-спектрофотометрированием элюатов пятен, соответствующих определенным компонентам реакционной смеси. Все олигонуклеотиды очищались дополнительно БХ в системах А или Б.

Синтез тринуклеозиддифосфатов, катализируемый ПНФазой Micrococcus lysodeicticus. Смесь динуклеозидмонофосфата и 5'-дифосфата нуклеозида растворяли в 0,05 М трис-НСl буфере (рН ~ 9), содержащем 0,05 М ЭДТА и 0,01 М MgCl₂, и инкубировали при 37° в течение 2 ч с ПНФазой *M. lysodeicticus*. Начальные концентрации субстратов и фермента приведены в табл. 4. Реакционную смесь, объем которой, как правило, составлял 0,6—0,8 мл, наносили на бумагу и хроматографировали в системе А 17—20 ч, а затем 48 ч в системе Б или повторно в системе А. Полосы, содержащие тринуклеозиддифосфат и исходный динуклеозидмонофосфат, элюировали и подвергали электрофорезу. Выделенные вещества очищали рехроматографией в системе Б и анализировали, как указано выше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, 217, 221—223.
2. Commission on Biochemical Nomenclature IUPAC-IUB (1971) Biochimet. biophys. acta, 247, 1—12.
3. Венкстерн Т. В. (1970) Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот, «Наука», М.
4. Pongs O., Nierhaus K. H., Erdmann V. A., Wittmann H. G. (1974) FEBS Lett., 40, Supplement, S28—S37.
5. Erdmann V. A., Sprinzl M., Pongs O. (1973) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 54, 942—948.
6. Schwarz U., Lührmann R., Gassen H. G. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 56, 807—814.
7. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. (1975) Биоорганич. химия, печатается в этом номере, стр. 598—603.
8. Женодарова С. М., (1974) в сб.: Нуклеазы микроорганизмов под ред. Безбородова А. М., стр. 300—326, «Наука», М.
9. Женодарова С. М. (1970) Успехи химии, 39, 1479—1493.
10. Grünberger D., Holy A., Sorm F. (1968) Collect. Czech. Chem. Commun., 33, 286—295.
11. Leder Ph., Singer M. F., Brimacombe R. L. C. (1965) Biochemistry, 4, 1561—1567.
12. Седелъникова Э. А. (1974) Модифицированные субстраты в ферментативном синтезе динуклеозидмонофосфатов. Канд. диссертация, МГУ.

13. Антонович Е. Г., Пономарева В. М., Седельникова Э. А., Женодарова С. М., Прокофьев М. А. (1972) Докл. АН СССР, 207, 718—720.
14. Holy A., Bald R. (1971), Collect. Czech. Chem. Commun., 36, 2809—2823.
15. Безбородова С. И., Ильина Т. В., Крупянко В. И. (1971) Докл. АН СССР, 196, 1460—1462.

Поступила в редакцию *
19.XI.1974

**STEPWISE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES.
XIX. THE SYNTHESIS OF SOME FRAGMENTS OF «COMMON»
OLIGONUCLEOTIDE AND THEIR ANALOGS**

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SMOLYANINOVA O. A.,
HABAROVA M. I., ANTONOVICH E. G., PROKOFJEV M. A.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino; M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The combined use of nucleolytic enzymes was shown to be a convenient method for the synthesis of «common» oligonucleotide fragments containing minor nucleosides such as ribothymidine (T) and pseudouridine (ψ). The synthesis were carried out both from 5'- and C'-termini of trinucleoside diphosphate constituents (or their analogs) of common oligonucleotide. Starting dinucleoside monophosphates GpT, Gp ψ , ψ pC, Up ψ were produced by RNase T₁ or RNase A catalyzed reaction of corresponding nucleoside 2',3'-cyclic phosphates with nucleosides. The yields were 66, 47, 50, 57 and 19% respectively. Trinucleoside diphosphates GprTpU (20%), ψ pCpG (4%) and ψ pCpA (5%) were prepared as follows: $NpN' + ppN'' \xrightarrow{PNPase} NpN'pN''$. In addition to desired trinucleoside diphosphate, GprTpUpU (6%) and GprTpUpUpU (5%) were isolated from reaction mixture in the case of GprTpU synthesis. Trinucleoside diphosphate GpUp ψ (26%) was obtained by reaction of G > p with Up ψ in the presence of RNase T₁.

* Статья из портфеля редакции «Журнал общей химии»; дата поступления — 23.VII.1974 г.