



УДК 547.963.32 : 542.91

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XX. СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ D-ВЕТВИ тРНК₁^{Val} И ИХ АНАЛОГОВ

Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А.

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пуцдино

Синтезированы некоторые фрагменты D-петли тРНК₁^{Val}, содержащие дигидроуридин (hU): динуклеозидмонофосфаты GphU, hUpC и СрhU из соответствующих нуклеозид-2',3'-циклофосфатов (N > p) и нуклеозидов при участии рибонуклеаз T₁ и A с выходами 30, 16 и 15% в расчете на введенный в реакцию N > p; тринуклеозиддифосфат GphUpC (8%) был синтезирован из G > p и hUpC с участием рибонуклеазы T₁, а тринуклеозиддифосфат hUpCpG (2%) — из hUpC и ppG в присутствии полинуклеотидфосфорилазы *Micrococcus lysodeicticus*. GphU не может быть акцептором фосфата в реакции, катализируемой полинуклеотидфосфорилазой *Micrococcus lysodeicticus*.

Синтез фрагментов тРНК представляет большой интерес в связи с тем, что, несмотря на значительные успехи в расшифровке первичной и пространственной структуры тРНК (см., например, [1—3]), до сих пор остаются невыясненными многие вопросы, связанные с их функционированием. В последние годы начал синтез отдельных фрагментов тРНК^{Ala} химическим методом [4] и тРНК^{Val} — ферментативным [5,6].

В данной статье сообщается о синтезе некоторых фрагментов D-ветви тРНК₁^{Val}, а именно динуклеозидмонофосфатов и тринуклеозиддифосфатов, содержащих дигидроуридин (hU)*. Синтез олигонуклеотидов, содержащих дигидроуридин, осложняется тем, что, с одной стороны, он весьма неустойчив в щелочной среде [8], что затрудняет выбор защитных групп при химическом синтезе, а с другой — в нейтральных и кислых растворах дигидроуридин не обладает поглощением в УФ-области [1], что делает невозможным использование обычных методов контроля как при синтезе, так и при анализе олигонуклеотидов. Неудивительно поэтому, что имеется весьма ограниченное число работ, посвященных синтезу таких олигонуклеотидов. Смит синтезировал тринуклеозиддифосфаты GphUpU, GrUpH₂U, GphUpU, используя методы химического синтеза при получении динуклеозидмонофосфатов hUpU, UpH₂U, hUpH₂U и ферментативный метод (катализ рибонуклеазой T₁) при переходе к соответствующим тринуклеозиддифосфатам [9]; динуклеозидмонофосфат GphU был синтезирован ферментативно при участии гуанилспецифичной рибонуклеазы *Actinomyces aureoverticillatus* [10].

* Сокращения названий нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов соответствуют общепринятым [7].

Как известно, последовательность нуклеотидных остатков неспирализованного участка D-ветви тРНК₁^{Val} такова [1]:



Следует обратить внимание, что последовательность G¹⁵p h¹⁶U имеется в большинстве изученных тРНК, а в ряде тРНК следующим нуклеозидом так же, как в тРНК₁^{Val}, является цитидин [1]. Применяя метод комплексного использования ферментов нуклеинового обмена [11], мы осуществили синтез динуклеозидмонофосфатов G¹⁵p h¹⁶U, h¹⁵U p¹⁶C и C¹⁵p h¹⁶U и тринуклеозиддифосфатов G¹⁵p h¹⁶U p¹⁷C и h¹⁵U p¹⁶C p¹⁷G. Как отмечалось выше, синтез G¹⁵p h¹⁶U был уже описан [10], однако фермент, использовавшийся для этого, мало доступен. Поэтому мы провели синтез G¹⁵p h¹⁶U, применив для этой цели коммерческий препарат гуанилспецифичной рибонуклеазы T₁. Динуклеозидмонофосфаты h¹⁵U p¹⁶C и C¹⁵p h¹⁶U были синтезированы с помощью панкреатической рибонуклеазы впервые. Результаты синтезов представлены в табл. 1, где для сравнения приведены также данные синтезов соответствующих аналогов, содержащих вместо дигидроуридина уридин. Можно видеть, что панкреатическая рибонуклеаза более чувствительна к замене уридина дигидроуридином. Выход G¹⁵p h¹⁶U в реакции, катализируемой рибонуклеазой T₁, мало отличается от выхода G¹⁵p U и немного выше, чем был получен в работе [10].

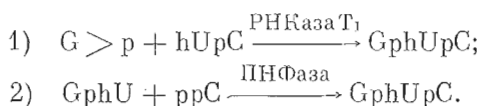
Таблица 1

Синтез динуклеозидмонофосфатов, содержащих дигидроуридин при участии рибонуклеаз [N > p] = 0,2—0,25 M; [N'] = 0,6—0,75 M; [РНКаза T₁] = = 200 ед/мл [РНКаза панкреатическая] = 0,5 мг/мл

Динуклеозидмонофосфат NpN'	РНКаза	Время синтеза, ч	Выход NpN', % на N > p	
			взятый	израсходованный
G ¹⁵ p h ¹⁶ U	T ₁	24	30,2	55,6
G ¹⁵ p U	T ₁	24	35,8	68,0
h ¹⁵ U p ¹⁶ C	Панкреатическая	18	16,1	—
U p ¹⁶ C	»	3	27,5	51,9
C ¹⁵ p h ¹⁶ U	»	48	15,0	21,9
C ¹⁵ p U	»	48	24,5	33,5

Динуклеозидмонофосфаты выделяли из реакционной смеси методом препаративного электрофореза на бумаге с последующим хроматографированием. Структура полученных соединений подтверждалась ферментативным гидролизом с последующим анализом гидролизата БХ и УФ-спектрофотометрией. Прежде, чем проводить количественное УФ-спектрофотометрирование компонентов гидролизата, локализацию дигидроуридина на хроматограммах определяли, обрабатывая последние по методу работы [12]. Оказалось, что подвижности уридина и дигидроуридина, а также уридиновой и дигидроуридиновой кислот в системе А совпадают. Поэтому в дальнейшем при количественном анализе нуклеотидного состава олигонуклеотида для определения положения h¹⁵U и h¹⁶U на хроматограмме применяли в качестве свидетеля U и U p, а измерения проводили в 0,1 н. КОН (см. «Экспериментальная часть»).

Синтез тринуклеозиддифосфата G¹⁵p h¹⁶U p¹⁷C может быть осуществлен двумя путями:



Ранее на примере синтеза GpUpU было показано [5], что в принципе оба способа дают близкие результаты и стратегия синтеза должна определяться доступностью тех или иных субстратов. Так как выход GphU вдвое выше, чем выход hUpC (см. табл. 1), казалось целесообразным использовать для синтеза 2-й способ. Однако, как показало исследование, GphU не взаимодействует с ррС в реакции, катализируемой полинуклеотидфосфо-рилазой, что согласуется с данными работы [13], где 5'-дифосфат диги-

Таблица 2

Синтез тринуклеозиддифосфатов GpNpC, катализируемый рибонуклеазой T₁
 [G>p]=0,02 M; [NpC]=0,1M; [РНКаза T₁]=50 ед/мл; 0,01 M фосфатный
 буфер (рН 7)

GpNpC	Время синтеза, ч	Выход GpNpC, % на G > p		Гидролиз G > p, %
		взятый	израсходованный	
GphUpC	1	5	8	67
GpUpC	1	13	23	53

Таблица 3

Характеристики олигонуклеотидов

Олигонуклеотид	U _{отн}	R _f (A)	Ферментативный гидролиз		
			РНКаза	продукты	отношение оснований
GphU	0,55 *	—	<i>P. brev.</i>	Gp, hU	1:0,98
hUpC	0,50 *	0,41	Панкреатическая	hUp, C	1,03:1
CphU	0,59 *	—	»	Cp, hU	1:1,09
GphUpC	0,78 **	0,96 **	<i>P. brev.</i>	Gp, hUp, C	1:1:1
GpUpC	0,80 **	1,09 **	»	Gp, Up, C	1,5:1,1:1
hUpCpG	0,70 **	0,95 **	»	hUp + Cp, G	1,1:1

* Определены относительно 5'-нуклеотида.

** Определены относительно 3'-нуклеотида.

Таблица 4

УФ-спектры олигонуклеотидов

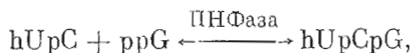
Олигонуклеотид	λ _{макс}	λ _{мин}	E ₂₃₀ / E ₂₆₀						
			E ₂₃₀ / E ₂₆₀	E ₂₄₀ / E ₂₆₀	E ₂₅₀ / E ₂₆₀	E ₂₇₀ / E ₂₆₀	E ₂₈₀ / E ₂₆₀	E ₂₉₀ / E ₂₆₀	
GphU	254 *	230	1,13	1,14	1,04	0,76	0,66	0,23	
GpU	240 **	232			1,10	0,94	0,66		
hUpC	258 *	231	2,04	1,84	0,90	0,85	0,60	0,28	
	232 **	225			1,26	1,12	1,00		0,61
CphU	273	260	1,92	1,70	0,95	1,17	1,05	0,62	
	273 *	253			0,95	1,15	0,92		0,26
	271 *	251			1,20	1,10	0,85		0,25
GphUpC	232 **	225	1,92	1,70	1,20	1,10	0,85	0,25	
	271	259			0,96	0,89	0,73		0,44
GpUpC	257 *	232	1,02	0,94	0,96	0,89	0,73	0,44	
GpUpC	256 *	234			1,02	0,94	0,85		0,58

* В H₂O.

** В 0,1 н. КОН.

дурридина не является субстратом для полинуклеотидфосфорилазы. Поэтому синтез GphUpC был проведен с использованием 1-го способа. Результаты синтеза приведены в табл. 2 (для сравнения был проведен также синтез GrUpC). Выход GphUpC значительно меньше, чем GrUpC, хотя на уровне динуклеозидмонофосфатов замена акцептора фосфата U на hU не вызывала столь резких различий в выходах (см. табл. 1).

Тринуклеозиддифосфат hUpCrG синтезировали по схеме



наиболее целесообразной в этом случае (см. [11]). hUpCrG, как и UpCrG [11], образуется с выходом 2—3%, при этом происходит значительное расщепление динуклеозидмонофосфата-акцептора.

Все синтезированные олигонуклеотиды очищали дополнительно БХ в различных системах растворителей и анализировали обычными способами. Содержание hUp в тринуклеозиддифосфатах определяли так же, как и в случае динуклеозидмонофосфатов. Характеристики олигонуклеотидов приведены в табл. 3 и 4.

Экспериментальная часть

В работе использовали Na⁺-соли 2',3'-циклофосфата уридина, 5'-дифосфата цитидина, уридин, цитидин и панкреатическую рибонуклеазу фирмы «Reanal» (Венгрия), K⁺-соль дигидроуридиловой кислоты, дициклогексилгуанидиниевые соли 2',3'-циклофосфатов цитидина и гуанозина, рибонуклеазу T₁ и полинуклеотидфосфорилазу фирмы «Calbiochem» (США), 5'-дифосфат гуанозина (Na⁺-соль) фирмы «Merck» (ФРГ) и дигидроуридин фирмы «Serva» (ФРГ). Дициклогексилгуанидиниевые соли 2',3'-циклофосфатов цитидина и гуанозина превращали в аммонийные обработкой дауэксом 50 W (NH₄⁺-форма). 5'-дифосфаты цитидина и гуанозина очищали перед использованием БХ в системе А, остальные реагенты применяли без дополнительной очистки.

2',3'-циклофосфат дигидроуридина был получен из K⁺-соли дигидроуридиловой кислоты по [14] с выходом 45%.

Хроматографию и электрофорез на бумаге проводили, как описано в [5,11].

УФ-спектры снимали на спектрофотометре «Record» (ГДР) с автоматической записью. Измерения элюатов, содержащих дигидроуридин или дигидроуридиловую кислоту, а также соответствующие олигонуклеотиды, проводили, добавляя к водному элюату 4 н. КОН в таком количестве, чтобы конечная концентрация щелочи составляла 1 н. Время, затрачиваемое на подщелачивание образца и снятие спектра, составляло 1 мин. Для расчетов использовали величину коэффициента молярной экстинкции, приведенную в работе [15].

Синтез и гидролиз олигонуклеотидов подробно описан ранее [5,11]. Начальные концентрации субстратов и ферментов, а также состав буферного раствора, применявшиеся в работе, приведены в табл. 1,2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Венкстерн Т. В. (1970) Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот, «Наука», М.
2. Kim S. H., Quigley G., Suddath F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Blattmann P., Rich A. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3746—3757.
3. Kim S. H., Quigley G., Suddath F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A. (1973) J. Mol. Biol., 75, 421—428.
4. Ohtsuka E., Ubasawa M., Morioka Sh., Ikehara M. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 4725—4733.

5. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г., Прокофьев М. А. (1974) Докл. АН СССР, 217, 221—223.
6. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г., Прокофьев М. А. (1975) Биоорганич. химия, 1, 604—610.
7. Commission on Biochemical Nomenclature IUPAC—IUB (1971) Biochim. et biophys. acta, 247, 1—12.
8. Janion C., Shugar D. (1960) Acta biochem. Polonica, 7, 309—329.
9. Smrt J. (1967) Coll. Czech. Chem. Commun., 32, 198—205.
10. Шершнева Л. П., Венкстерн Т. В. (1971) Молекулярн. биология, 5, 480—486.
11. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. (1975) Биоорганич. химия, 1, 598—603.
12. Fink L. M., Cline R. E., McGanghey C., Fink K. (1956) Analyt. Chem., 28, 4—7.
13. Grünberg-Manago M. (1963) Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biol., 1, 93—133.
14. Naylor R., Gilham P. T. (1966) Biochemistry, 5, 2722—2727.
15. Венкстерн Т. В., Баев А. А. (1967) Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, «Наука», М.

Поступила в редакцию *
19.XI.1974

STEPWISE SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES.
XX. THE SYNTHESIS OF SOME FRAGMENTS OF D-LOOP
OF tRNA₁^{Val} AND THEIR ANALOGS

ZHENODAROVA, S. M., KLYAGINA Y. P., SMOLYANINOVA O. A.,

*Institute of Biological Physics,³
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

Some dihydrouridine(hU)-containing fragments of the D-loop of tRNA₁^{Val} were synthesized. RNases T₁ or A were utilized in preparing dinucleoside monophosphates, GphU, hUpC and CphU from 2',3'-cyclic phosphate (N > p) and the nucleosides, yields being 30, 16 and 15% respectively (calculating on N > p). Trinucleoside diphosphate GphUpC (8%) was synthesized from G > p and hUpC by RNase T₁, while trinucleoside diphosphate hUpCpG (2%) was formed from hUpC and ppG by polynucleotide phosphorylase. *M. Lysodeicticus*. GphU was not an acceptor of phosphate in the polynucleotide phosphorylase catalyzed reaction.

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