



УДК 577.113.4

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ДИНУКЛЕОЗИДФОСФАТОВ,
СОДЕРЖАЩИХ АРАБИНО- И ДЕЗОКСИКСИЛОНУКЛЕОЗИДЫ*Соколова Н. И., Крынецкая Н. Ф., Суханова Л. Л.,
Долгиня Н. Г., Шабарова З. А.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
и химический факультет*

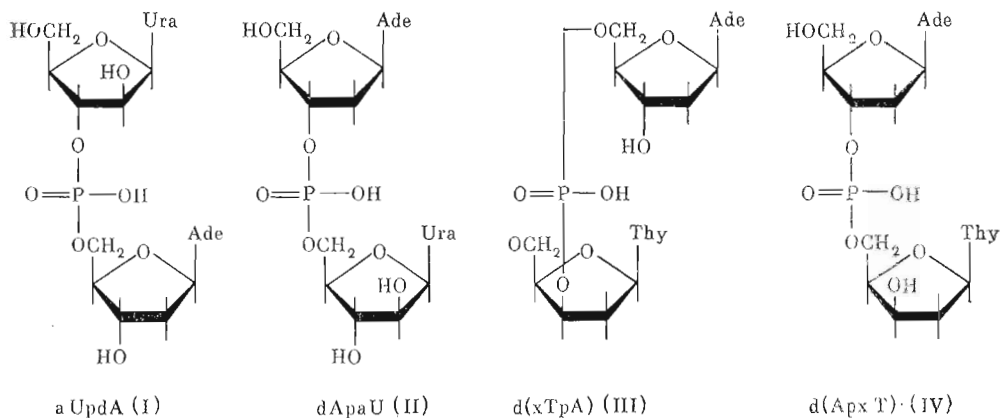
Осуществлен синтез двух пар изомерных динуклеозидфосфатов (I)–(IV), содержащих дезоксицитидинилин или арабиноуридин. Методом КД показано, что обращение конфигурации при С2'- или С3'-атомах в 5'-концевых звеньях динуклеозидфосфатов приводит к почти полной потере межплоскостных взаимодействий или к изменению знака спирали. Аналогичная модификация в 3'-концевых нуклеозидах не вызывает существенных конформационных изменений. Изучена кинетика гидролиза синтезированных динуклеозидфосфатов, катализируемого фосфодиэстеразой змеиного яда. Показано, что значения K_m для всех синтезированных соединений близки к K_m для немодифицированного d(TrA), а максимальная скорость гидролиза всех модифицированных соединений ниже, причем значения V_{max} различаются в зависимости от положения и природы модифицированного нуклеозида.

Арабино- и ксилонуклеозиды, отличающиеся от природных нуклеозидов конфигурацией у С2'- или С3'-атомов, привлекают внимание исследователей высокой биологической активностью. В настоящее время изучаются молекулярно-биологические основы механизма действия такого рода аналогов на биосинтез и биотрансформацию нуклеиновых кислот в клетке [1]. Например, показано включение нуклеозидов подобного строения в некоторые виды ДНК [2], установлена способность арабинозидов цитозина и аденина ингибировать инициацию репликации [3] и т. д. Однако до сих пор не выяснено, как влияет встраивание отдельных нуклеозидов с обращенной конфигурацией при С2' и С3' на тонкие механизмы нуклеиново-белкового узнавания и функционирование различных ферментов нуклеинового обмена. В частности, до сих пор неизвестно, сказывается ли модификация сахара в олигонуклеотидах на их расщепление гидролазами.

Удобными объектами для изучения субстратных свойств нуклеиновых кислот, содержащих нуклеозиды с обращенной конфигурацией при С2' или С3', являются модифицированные динуклеозидфосфаты. С этой целью мы синтезировали четыре динуклеозидфосфата (соединения (I)–(IV)), содержащие dхТ или аU, и детально изучили их гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда.

Пиримидиновые нуклеозиды с обращенной конфигурацией при С2' и С3' получают обычно из природных нуклеозидов через соответствующие ангидронуклеозиды, причем замыкание ангидроцикла является ключевой стадией синтеза. Основные методы получения этих соединений были разработаны в середине 60-х гг. Фоксом и сотр. [4], когда фактически еще не было хроматографических методов анализа. В настоящее время широкое использование ТСХ-контроля для наблюдения за ходом реакции и колоночной хроматографии для очистки целевых продуктов позволило по-новому оценить и оптимизировать многие предложенные ранее методики.

Сокращения: ФДЭ — фосфодиэстераза, аU — 1-β-D-арабинофуранозилурация, dхТ — 1-β-2'-дезоксид-Д-ксилофуранозилтимин, MeIm — 1-метилимидазол, Im₂CS — тиокарбонилдимидазол, TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, DMAP — диметиламинопиридин, ClPh — *n*-хлорфенил, Lev — левулинил.



Так, при синтезе aU реакцией уридина с Im_2CS было обнаружено с помощью ТСХ, что время получения промежуточного продукта, 2', 3'-тиокарбоната уридина, может быть сокращено до 1 сут вместо 5, как указывали авторы [5]. Кроме того, препаративное выделение этого промежуточного соединения позволило значительно повысить выход целевого продукта и получить его в более чистом виде. dxT получали из тимидина через $\text{O}^2,3'$ -ангидротимидин по методике [6].

Структуру $\text{O}^2,3'$ -ангидротимидина и $\text{O}^2,2'$ -ангидроуридина подтверждали методами ТСХ, УФ- и КД-спектроскопии. dxT и aU, полученные размыканием соответствующих ангидропроизводных, характеризовали теми же методами (таблица). Ранее было показано, что при переходе от пиримидиновых рибофуранозидов к арабинозидам амплитуда КД положительной полосы сильно возрастает [7], а для $\text{O}^2,2'$ -ангидроуридина наблюдаются характерные изменения спектра с длинноволновым отрицательным Коттон-эффектом [8]. В соответствии с этими данными характер изменения амплитуды Коттон-эффекта в полосе B_{20} для dxT и aU (рис. 1) согласуется с предполагаемыми структурами.

Динуклеозидфосфаты (I)–(IV) синтезировали фосфотриэфирным методом, причем нуклеозиды с обращенной конфигурацией при $\text{C}2'$ и $\text{C}3'$ во всех случаях служили гидроксильным компонентом. В качестве конденсирующего реагента использовали смесь TPS и MeIm. При синтезе динуклеозидфосфата (I) впервые в качестве нуклеозидного компонента был использован $\text{O}^2,2'$ -ангидронуклеозид — $\text{O}^2,2'$ -ангидроуридин. Полученный после его конденсации с $(\text{ClPh})\text{pbzdA}(\text{Lev})$ динуклеозидфосфат, содержащий ангидроцикл, обрабатывали аммиаком в пиридине. При этом наряду с удалением щелочелabile групп прошло размыкание $\text{O}^2,2'$ -ангидроцикла, о чем свидетельствует характерное изменение УФ-спектра. Таким об-

Выходы и свойства синтезированных соединений

Соединение	Выход *, %	R_f (система Б)		λ_{max} , нм	Кинетические параметры	
		БХ	ТСХ		K_m , мМ	$V_{\text{max}} \cdot 10^2$, мМ/мин
$\text{O}^2,2'$ -Ангидроуридин	70	0,65	0,70	223, 249 270 пл.	—	—
2'-Дезокси- $\text{O}^2, 3'$ -ангидротимидин	85	0,84	0,90	240–246 270 пл.	—	—
aU	67	0,60	0,54	262	—	—
dxT	80	0,78	0,70	267	—	—
aUpdA (I)	65	0,48	0,50	259	$0,35 \pm 0,02$	$2,7 \pm 0,15$
dAraU (II)	60	0,37	0,40	261	$1,0 \pm 0,05$	$2,5 \pm 0,15$
d(xTpA) (III)	68	0,54	0,58	262	$0,30 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,02$
d(ApxT) (IV)	75	0,35	0,33	260	$0,94 \pm 0,05$	$2,0 \pm 0,1$
d(TpA)	80	0,46	0,56	260	$0,31 \pm 0,02$	$3,7 \pm 0,2$

* Выходы приведены на полностью защищенные динуклеозидфосфаты и производные нуклеозидов.

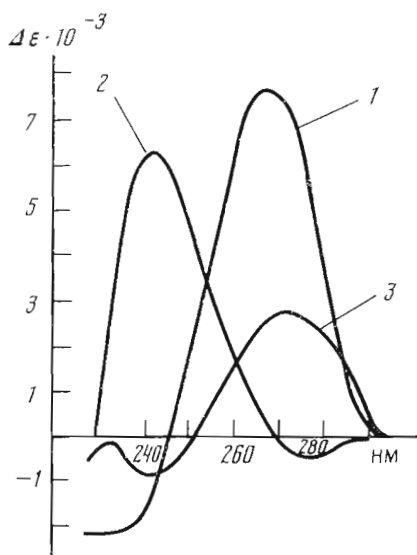


Рис. 1

Рис. 1. Спектры КД аU (1), O²,2'-ангидроуридина (2), dхТ (3) (здесь и далее в 0,03 М фосфатном буфере, рН 7, 20° С)

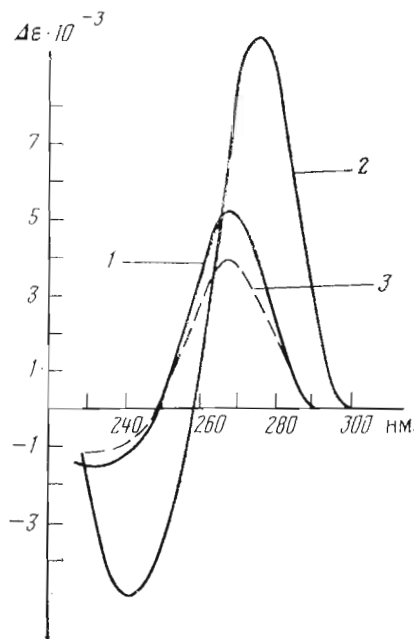


Рис. 2

Рис. 2. Спектры КД аUrdA (1), dAraU (2) и расчетный спектр суммы их компонентов $\frac{1}{2}$ (аU + рdA) (3)

разом, очевидно, что O²,2'-ангидроцикл в пиримидиновых нуклеозидах сохраняется в условиях конденсации и может использоваться для избирательной защиты 2'-гидроксильной группы при синтезе олигонуклеотидов, содержащих аU.

После проведения конденсации полностью защищенные динуклеозидфосфаты выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Деблокированные динуклеозидфосфаты выделяли последовательно препаративной хроматографией на бумаге и электрофорезом. Выходы и хроматографические характеристики полученных соединений приведены в таблице.

Для характеристики внутримолекулярного стэкинг-взаимодействия оснований в соединениях (I)–(IV) был использован метод КД. Как видно из рис. 2, спектры изомерных динуклеозидфосфатов (I) и (II) существенно различаются. Спектр соединения аUrdA (I) близок к суммарному спектру составляющих его мономеров, что свидетельствует о почти полном отсутствии межплоскостных взаимодействий гетероциклических оснований. Напротив, dAraU (II), в котором обращена конфигурация 2'-ОН-группы в 3'-концевом нуклеозиде, имеет характерный экситонный тип спектра, отличный от расчетного спектра невзаимодействующих компонентов, что свидетельствует о наличии стэкинг-взаимодействий. Наши данные полностью согласуются с результатами, полученными при изучении КД двух пар изомерных динуклеозидфосфатов AraC и аCrA, а также Урас и аCrU [9], и дают возможность сделать вывод, что в случае пиримидин-пуринового динуклеозидфосфата (I) замена рибозы на 5'-конце на арабинозу закрепляет конформацию, невыгодную для межплоскостных взаимодействий. Следует отметить, что в случае комбинации пурин-пурин — аAraA — стэкинг-взаимодействия явно выражены [10]. Совокупность этих данных свидетельствует о влиянии специфической нуклеотидной последовательности на способность модифицированных фрагментов динуклеозидфосфатов образовывать закрытые конформации.

Для d(хТрА) (III), содержащего на 5'-конце ксилотимидин, наблю-

Рис. 3. Спектры КД $d(xTpA)$ (1), $d(ApхГ)$ (2) и расчетный спектр суммы их компонентов $\frac{1}{2}(dxГ + pdA)$ (3)

Рис. 4. Хроматография на Lichrosorb-RP18 (50 мМ трис-ацетат, pH 7,0, градиент этанола 0–25%) продуктов ФДЭ-гидролиза $d(TpA)$ (а) и $d(xTpA)$ (III) (б) (условия см. в «Экспер. части»). 1 – pdA , 2 – dT , 3 – $d(TpA)$, 4 – $dxГ$, 5 – $d(xTpA)$ (III)

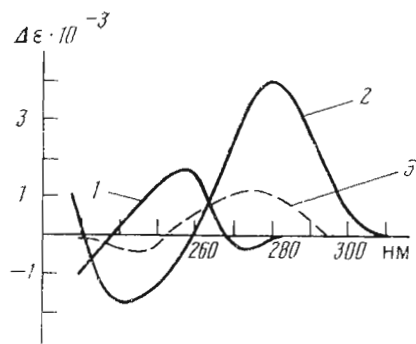


Рис. 3

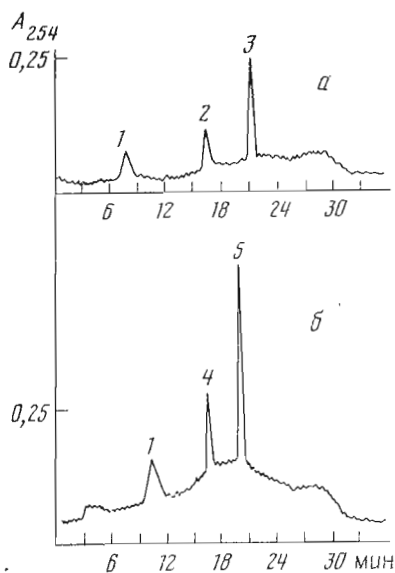


Рис. 4

дается обращенный спектр КД с отрицательным Коттон-эффектом при 270 нм, не совпадающий с суммарным спектром составляющих его компонентов (рис. 3). Это указывает на преобладание в закрытом состоянии этого аналога левых форм спирали. Такая необычная конформация, очевидно, связана со значительными перестройками всей геометрии молекулы. Спектр КД $d(ApхГ)$ (IV), содержащего 3'-концевой ксилотимидин (рис. 3), характерен для правых форм спиралей нуклеиновых кислот. Межплоскостные взаимодействия между основаниями сохраняются, о чем свидетельствуют резкие различия в амплитуде положительной полосы КД соединения (IV) и суммарного спектра составляющих мономеров.

Таким образом, обращение конфигурации при C2'- и C3'-атомах в 3'-концевых нуклеозидах не приводит к существенному нарушению геометрии соответствующих динуклеозидфосфатов и стэкинг-взаимодействия их оснований. В то же время подобная модификация в 5'-концевых нуклеозидах (соединения (I) и (III)) резко меняет конформационное состояние динуклеозидфосфатов, вызывая почти полную потерю межплоскостных взаимодействий (соединение (I)) или кардинальное изменение пространственной структуры молекулы — изменение знака спирали (соединение (III)). Полученные данные не только косвенно подтверждают строение синтезированных аналогов динуклеозидфосфатов, но и помогают оценить конформационные изменения, вызванные заменой одного из нуклеозидов на мономер с обращенной конфигурацией при C2' и C3'-атомах фуранозы.

Далее был изучен гидролиз соединений (I)–(IV), катализируемый фосфодиэстеразой змеиного яда. Известно, что этот фермент, являясь процессивной экзонуклеазой, атакует молекулу нуклеиновой кислоты с 3'-конца, образуя нуклеозид-5'-фосфаты. В контрольных опытах исследовали гидролиз природного динуклеозидфосфата $d(TpA)$. Продукты гидролиза (нуклеозид и нуклеозид-5'-монофосфат) разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 4).

Для оценки субстратной специфичности соединений (I)–(IV) в реакции гидролиза были найдены K_m и V_{max} (см. таблицу). Поскольку во всех экспериментах $[S]_0 \gg E$, применяли уравнение Михаэлиса — Ментен [11]. Полученные экспериментальные данные представляли в координатах Лайнуивера — Берка (рис. 5). Графические построения делали, используя ме-

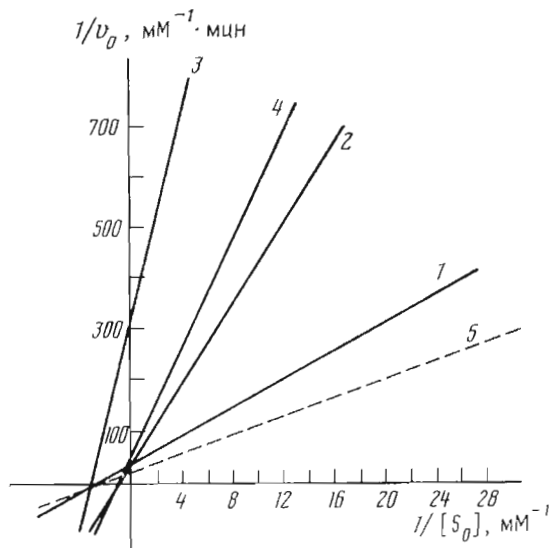


Рис. 5. Определение V_{\max} и K_m для ФДЭ-гидролиза динуклеозидфосфатов (I–IV) (соответственно прямые 1–4) и $d(\text{TrA})$ (5)

тод наименьших квадратов, программу для построения графиков «Replay» и систему обработки данных SP 4200 (Spectra Physics).

Из приведенных в таблице данных видно, что кинетические параметры для модифицированных субстратов не совпадают с параметрами гидролиза $d(\text{TrA})$. Так, при модификации 5'-концевого нуклеозида (соединения (I) и (III)) значения K_m близки к значениям K_m $d(\text{TrA})$, однако скорость гидролиза (V_{\max}) для соединения (I) уменьшается в 2 раза, а для соединения (III) — в 10 раз. По-видимому, инверсия 2'-ОН или 3'-ОН в 5'-концевом нуклеозиде динуклеозидфосфатов (I) и (III) практически не сказывается на их связывании с ферментом. Однако стерическое несоответствие конформации фосфодиэфирного фрагмента этих соединений активному центру ФДЭ препятствует образованию продуктивного комплекса.

При модификации 3'-концевого нуклеозида (инверсия 2'-ОН, $d\text{AraU}$ (II), или 3'-ОН, $d(\text{ArxT})$ (IV)) несколько возрастает величина K_m и в 1,5–2 раза падает скорость расщепления межнуклеотидных связей. Очевидно, модификация 3'-концевого нуклеозида влияет на связывание субстрата с ферментом.

В целом прослеживается корреляция между активностью ФДЭ змеиного яда к динуклеозидфосфатам (I)–(IV) и конформационными особенностями этих соединений в свободном состоянии. Чем больше различия в конформациях немодифицированных и модифицированных динуклеозидфосфатов, тем ниже скорость гидролиза фосфодиэфирной связи в последних. По-видимому, связывание модифицированных субстратов в активном центре фермента в конформации, оптимальной для протекания реакции, стерически затруднено. Различия в скорости гидролиза изученных соединений (I)–(IV) и контрольного $d(\text{TrA})$ настолько велики, что могут быть использованы при доказательстве структуры олигонуклеотидов, содержащих нуклеозиды с обращенной конфигурацией при $\text{C}2'$ или $\text{C}3'$.

Экспериментальная часть

В работе использованы нуклеозиды отечественного производства, фосфодиэстера змеиного яда (КФ 3.1.4; НИКТИ БАВ, Бердск), имидазол, Im_2CS , TPS. DMAP (Merck, ФРГ).

УФ-спектры записывали на спектрофотометре Specord UV-VIS (ГДР), КД — на дихрографе Jouan-III (Франция) в 0,03 М фосфатном буфере (рН 7,0). Использовали

кварцевые кюветы фирмы Hellma (ФРГ) с длиной оптического пути 1 см. Коэффициенты молярного поглощения для пуклеозидов с обращенной конфигурацией в углеводном фрагменте принимали равными коэффициентам поглощения их природных аналогов.

ТСХ проводили на пластинках с силикагелем (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, ФРГ) и с целлюлозой (Eastman Kodak, США). Хроматографию на бумаге FN-1 (ГДР) проводили восходящим методом. Системы растворителей (об./об.): хлороформ — метанол, 95 : 5 (А), 96% этанол — 1 М ацетат аммония, pH 7,5; 7 : 3 (Б). Для колоночной хроматографии использовали силикагель 1.40/100 (Сhemapol, ЧССР). За ходом элюции следили с помощью микроспектрофотометрической приставки UA-5 (Isco, США) и ТСХ.

ВЭЖХ проводили на хроматографе SP 8100 (Spectra Physics, США) на колонке (250×4,6 мм) с Lichrosorb RP 18 (10 мкм, Merck, ФРГ). Скорость элюции 1 мл/мин при 40° С, 0—25% этанол в 50 мМ трис-НСI, pH 7,0; время разделения 30 мин, детекция при 254 нм.

Концентрацию анализируемых соединений в смеси определяли по площади соответствующих пиков, используя систему обработки данных хроматографа SP 8100.

Вертикальный электрофорез проводили на приборе Labor (Венгрия) в течение 2 ч при 1000 В в 0,05 М триэтиламоний-бикарбонатном буфере (pH 7,5).

(MeOTr)dxT синтезировали в три стадии из (MeOTr)dT через 3'-О-метилат по методике [6]; ход реакций контролировали ТСХ в системе А. Для обнаружения MeOTr-содержащих соединений пластинки проявляли парами трифторуксусной кислоты (ярко-желтое окрашивание).

(MeOTr)aU. К раствору 1,5 г (3 ммоль) (MeOTr)U в 15 мл абс. тетрагидрофурана добавляли 0,61 г (3,4 ммоль) Im₂CS, смесь выдерживали 1 сут при 20° С, упаривали, растворяли в 50 мл хлороформа, промывали водой (3×10 мл), сушили Na₂SO₄ и упаривали до минимального объема. Хроматографировали на колонке (20×5 см) с силикагелем в линейном градиенте концентрации этанола в хлороформе (0—4%, 1 л). Фракции, содержащие 5'-О-метокситритил-2',3'-О-дитиокарбонилуридин (V) (R_f 0,65; ТСХ, система А), упаривали. Выход 95%.

К раствору 150 мг (0,3 ммоль) соединения (V) в 4 мл абс. толуола добавляли 25 мг (0,37 ммоль) имидазола и смесь кипятили 30 мин. Выпавший после охлаждения осадок отфильтровывали, растворяли в минимальном количестве спирта и осаждали прибавлением к 100 мл эфира. Выход 5'-О-метокситритил-О², 2'-ангидроуридина (VI) 70%, R_f 0,13 (ТСХ, система А).

К раствору 3 г (7,6 ммоль) соединения (VI) в 150 мл 50% водного спирта добавляли 11,2 мл 1 н. NaOH и перемешивали при 20° С. За размыканием ангидроцикла следили с помощью ТСХ. Через 2 ч раствор нейтрализовали 2 н. уксусной кислотой и упаривали до 1/3 объема. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход (MeOTr)aU (VII) 80%, R_f 0,21 (ТСХ, система А).

xdT и aU для физико-химических измерений получали обработкой (MeOTr)xdT и (MeOTr)aU 80% уксусной кислотой (2 ч, 20° С). Уксусную кислоту удаляли многократной отгонкой с водным этанолом, MeOTr-ОН экстрагировали эфиром. Для дополнительной очистки оба нуклеозида хроматографировали на бумаге.

aUpdA (I), d(xTpA) (III) и d(TpA) получали конденсацией соответственно соединения (V), (MeOTr)dxT или (MeOTr)dT с (ClPh)pbzdA·(Lev). Соотношение нуклеозидного и нуклеотидного компонентов 1 : 1,2. Синтез проводили в абс. пиридине с 3 экв. TPS и 6 экв. MeIm [12]. После окончания реакции (контроль ТСХ) смесь хроматографировали на колонке с силикагелем. Полностью защищенные динуклеозидфосфаты элюировали в линейном градиенте этанола в хлороформе (0—5%). Фракции упаривали, защитные группы удаляли последовательной обработкой раствором NH₃ в пиридине (20 ч, 50° С) и 80% уксусной кислотой.

dApaU (II) и d(ApxT) (IV). а) Подготовка нуклеозидных компонентов. Соединение (VII) и (MeOTr)dxT бензонлировали избытком бензойного ангидрида и DMAP по методике [13]. (MeOTr)aU(Bz)₂ и (MeOTr)dxT(Bz) детритилировали 80% уксусной кислотой (2 ч, 20° С).

б) Конденсацию aU(Bz)₂ или dxT(Bz) с (MeOTr)bzdAp(ClPh) проводили по методике [13]. Реакционную смесь обрабатывали как при синтезе соединений (I) и (III).

Соединения (I)–(IV) выделяли последовательно хроматографией на бумаге и электрофорезом.

Ферментативный гидролиз динуклеозидфосфатов (I)–(IV). К раствору 1 ОЕ₂₄₀ (0,04 мкмоль) вещества в 0,04 М аммоний-бикарбонатном буфере, рН 8,5, содержащем 0,02 М MgCl₂, добавляли ФДЭ змеиного яда. Минимальная концентрация фермента была подобрана с учетом полного гидролиза d(TrA) при 37°С за 60 мин и составляла 0,15 ед. акт./100 мкл (за единицу активности принимали количество фермента, которое гидролизует 1 мкмоль *p*-нитрофенилового эфира рdТ за 1 мин при рН 8,5 и 25°С). Концентрацию динуклеозидфосфатов варьировали от 0,8 до 0,05 мМ. Смесь выдерживали при 37°С, отбирали пробы через 10 мин. Реакцию ингибировали добавлением бентонита, гидролизат разбавляли в 10 раз и анализировали ВЭЖХ. Величину *v*₀ для каждой начальной концентрации динуклеозидфосфата находили графически (тангенс угла наклона к кривой в координатах: концентрация продуктов гидролиза – время).

ЛИТЕРАТУРА

1. Преображенская М. Н., Мельник С. Я. Итоги науки и техники. Биоорганич. химия. М.: ВИНТИ, 1984. т. 1, с. 4–244.
2. Graham D., Whilmore G. Cancer Res., 1970, v. 30, № 11, p. 2636–2641.
3. Bell D., Fridland A. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 606, № 1, p. 57–66.
4. Codington J. F., Doerr I. L., Fox J. J. J. Org. Chem., 1964, v. 29, № 3, p. 558–564.
5. Fox J. J., Miller N. C., Wempen I. J. Med. Chem, 1966, v. 9, № 1, p. 101–105.
6. Fox J. J., Miller N. C. J. Org. Chem., 1963, v. 28, № 4, p. 936–941.
7. Флорентьев В. Л. Итоги науки и техники. Молекулярная биология. М.: ВИНТИ, 1976, т. 8, ч. 1, с. 162–228.
8. Miles D. W., Robins M. G., Robins R. K., Winkley M. W., Eyring H. J. Amer. Chem. Soc., 1969, v. 91, № 4, p. 824–838.
9. Brahm J., Maurizot J. C., Pilet J. Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 186, № 1, p. 110–123.
10. Doornbos J., Barascut J.-L., Lazrek H., Imbach J.-L., van Westrenen J. Nucl. Acids Res., 1983, v. 11, № 13, p. 4583–4600.
11. Диксон М., Уэбб Э. В кн.: Ферменты. Т. 1. М.: Мир, 1982, с. 98–109.
12. Вейко В. П., Орецкая Т. С., Волков Е. М., Метелев В. Г., Романова Е. А., Потанов В. К. Химия природ. соединений, 1984, вып. 5, с. 637–641.
13. Slawinski J., Pozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353–371.

Поступила в редакцию
18.IV.1986
После доработки
4.VII.1986

SYNTHESIS AND STUDY OF THE DINUCLEOSIDE PHOSPHATES CONTAINING ARABINO- AND DEOXYXYLONUCLEOSIDES

SOKOLOVA N. I., KRYNETSKAYA N. F., SUCHANOVA L. L.,
DOLINNAYA N. G., SHABAROVA Z. A.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic
Chemistry and Chemical Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Two isomeric pairs of dinucleoside phosphates containing deoxyxylosylthymine and arabinosyluracil were synthesized. Conversion of the configuration at C2' or C3' in 5'-terminal sugar moieties of the dinucleoside phosphates resulted either in complete distortion of stacking or in opposite handedness of the helix as shown by CD technique. The similar modification in 3'-terminal sugar moieties did not affect significantly the chain geometry. Kinetics of hydrolysis of the modified dinucleoside phosphates catalyzed by venom phosphodiesterase was studied using HPLC. The *K_m* values were shown to be similar for all compounds as well as for d(TrA). The maximal hydrolysis rate is decreased for the modified compounds, depending on the position and the nature of the nucleoside modified.