



УДК 547.857.7'455.522'118.057

© 1990 г.

М. А. Грачев, Е. А. Лухтанов, А. А. Мустаев

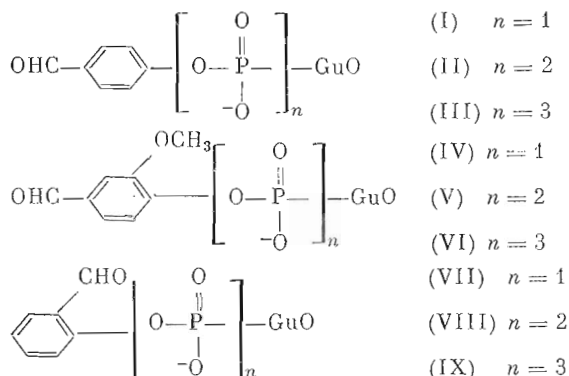
ФОРМИЛФЕНИЛОВЫЕ ЭФИРЫ ГУАНОЗИН-5'-МОНО-, ДИ- И ТРИФОСФАТОВ ПО КОНЦЕВОМУ ФОСФАТУ

Лимнологический институт СО АН СССР, Иркутск

На примере 9 новых соединений проверен новый метод синтеза α -, β - и γ -формилфениловых эфиров нуклеотидов, производных по концевому фосфату, основанный на конденсации либо метилимидазольных производных (в случае GMP и GDP), либо гуанозин-5'-триметафосфата (в случае GTP) с одним из формилфенолов (4-гидрокси-, 4-гидрокси-3-метокси- или 2-гидроксибензальдегидом). Все полученные соединения охарактеризованы методами УФ-спектроскопии, обращенно-фазовой и ионообменной хроматографией. Показана устойчивость соединений к действию фосфомоноэстеразы. Установлено, что некоторые из них являются аффинными реагентами для РНК-полимеразы *E. coli*.

В настоящее время известно много методов введения различных группировок по концевым фосфатным остаткам моно- и олигонуклеотидов [1]. Наиболее просто могут быть получены фосфамидные производные, для которых разработаны удобные методы синтеза [2, 3]. С использованием этих методов был получен ряд реакционноспособных фосфамидных производных нуклеотидов, которые с успехом применялись для аффинной модификации различных биополимеров [4]. Однако фосфамидная связь лабильна в кислой среде, вследствие чего, например, при выделении и характеристике модифицированных таким образом пептидов возникают существенные затруднения. Одними из наиболее перспективных в этом отношении аффинных реагентов являются реакционноспособные эфиры нуклеотидов, поскольку эфирная связь сравнительно устойчива как в кислой, так и щелочной среде.

В данной работе описан простой метод введения фенильных остатков по концевым фосфатным группам нуклеозид-5'-моно-, ди- и трифосфатов на примере формилфениловых эфиров GMP, GDP и GTP следующей структуры:



Соединения (I)–(III), (VII)–(IX) ранее были использованы для аффинной модификации РНК-полимеразы *E. coli* [5], однако их синтез не был описан.

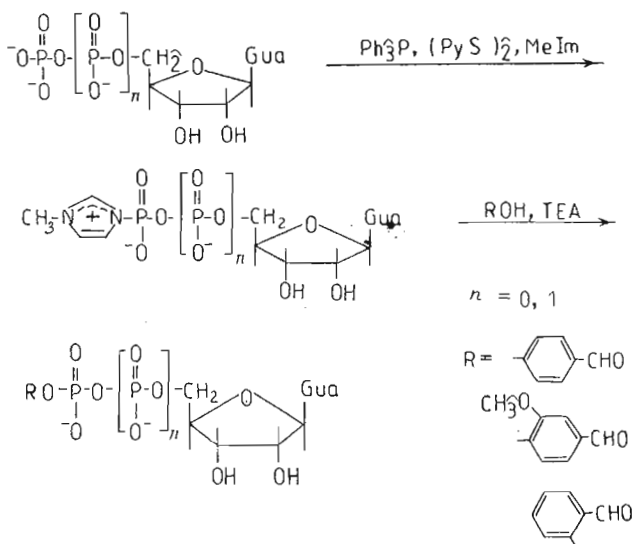
Сокращения: DMSO — диметилсульфоксид, TEA — триэтиламин, MeIm — N-метилимидазол, (PyS)₂ — 2,2'-дипиридилдисульфид, КПК — пространственные модели Поллинга — Кори.

Зависимость выхода соединения (I) от количества N-метилимидазола

Избыток N-метилимидазола, моль/моль нуклеотида	Выход соединения (I), %
0	0
1,5	70
3	88
6,7	95

Синтез производных GDP и GMP проводили следующим образом: вначале раствор нуклеозид-5'-моно- или дифосфата и N-метилимидазола в безводном диметилсульфоксиде обрабатывали трифенилфосфином и дипиридилдисульфидом. Известно, что в этих условиях образуется высокорекреационноспособное метилимидазольное производное [6].

Последующее добавление смеси формилфенола с триэтиламинном (1 : 1, моль/моль) приводило к образованию целевого продукта с высоким выходом. Предполагаемый механизм реакций может быть представлен в следующем виде:



Глубина протекания второй стадии синтеза, по-видимому, зависит от того, насколько полно прошло образование метилимидазольного производного. В таблице показана зависимость выхода соединения (I) от количества N-метилимидазола. Видно, что если в его отсутствие реакция вообще не идет, то при 6-кратном молярном избытке удается получить требуемый продукт с выходом не менее 90%. Эти факты говорят в пользу предложенной схемы. Согласно данным обращенно-фазовой хроматографии компонентов реакционной среды, при длительной инкубации на первой стадии (в случае GMP) образуются побочные продукты, которые, хотя и не препятствуют проведению второй стадии синтеза, снижают выход целевого продукта. По этой причине время проведения первой стадии синтеза не должно превышать 10—15 мин при 20° С. На рис. 1 показана зависимость выхода соединения (I) от времени, свидетельствующая о том, что время полупревращения на второй стадии синтеза не превышает 30 с (в данных условиях), а через 15 мин реакция практически завершается. С помощью этой методики нами были получены формилфениловые эфиры GMP и GDP (I), (II), (IV), (V), (VII), (VIII) с выходом 90—95%.

Трифосфатные производные (III), (VI), (IX) получали обработкой соответствующего формилфенола гуанозин-5'-триметафосфатом, который может быть получен в безводной среде с применением в качестве конден-

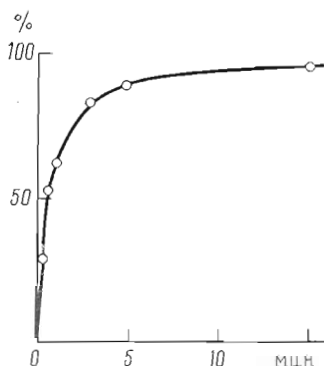


Рис. 1. Выход соединения (I) в зависимости от времени. Измерения проводили как описано в «Экспер. части»

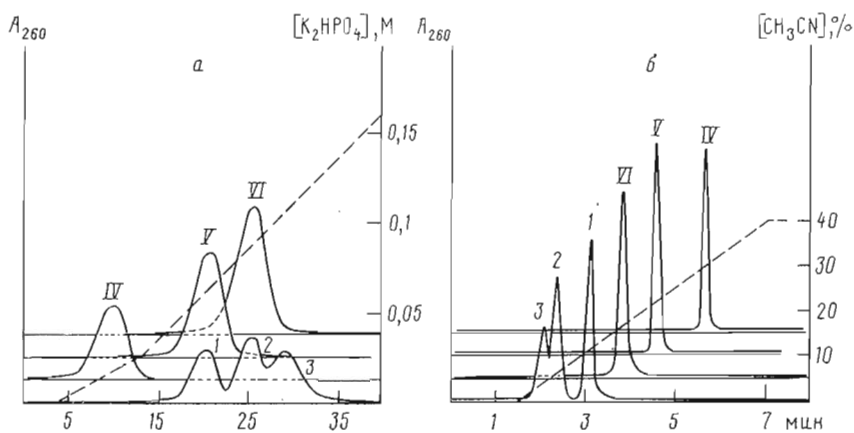


Рис. 2

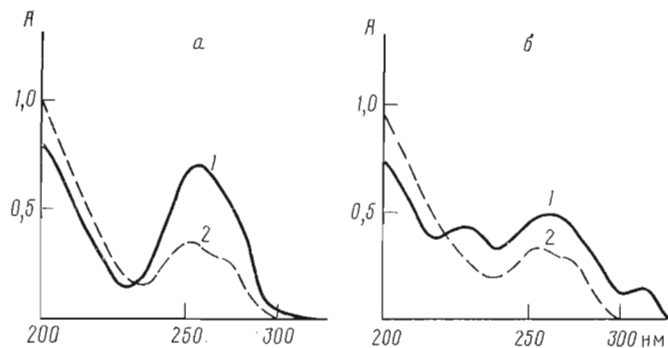


Рис. 2. Сравнение хроматографических подвижностей соединений (IV)—(VI) при ионообменной микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе (а) и обращенно-фазовой микроколоночной хроматографии на Silasorb C18 (б). 1 — GMP; 2 — GDP; 3 — GTP

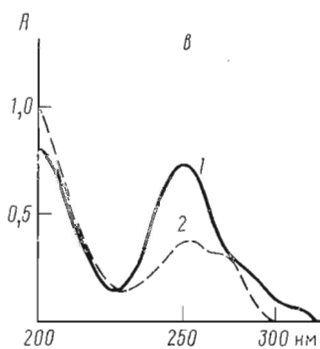


Рис. 3. УФ-спектры соединений (I)—(III) (а), (IV)—(VI) (б), (VII)—(IX) (в). Запись спектров производили в водном растворе при pH 7 до (1) и после (2) восстановления NaBH_4 . Концентрация соединений (I)—(IX) ~ 30 мкМ.

Рис. 3

соответствующий *para*-изомер совершенно неактивен. При переходе к дифосфатным производным интенсивность мечения с *орто*-изомером падает, а с *para*-изомерами возрастает. В случае же трифосфатных производных интенсивность мечения с помощью *орто*- и *para*-изомеров становится соизмеримой. При рассмотрении объемных КПК-моделей этих реагентов видно, что подобная закономерность хорошо объясняется, если предположить, что во всех случаях атаке подвергается один и тот же остаток лизина, расположенный в непосредственной близости к α -фосфату иницирующего субстрата. Действительно, как установлено в работе [5], по крайней мере в случае реагентов (VII) и (III) именно является остаток лизина, находящийся в области между Pe^{1036} и Met^{1066} .

Таким образом, синтезированные соединения достаточно активны и могут служить хорошими зондами для обнаружения остатков лизина в активном центре РНК-полимеразы *E. coli*. Вероятно, они могут найти широкое применение в исследовании других нуклеотидзависимых ферментов.

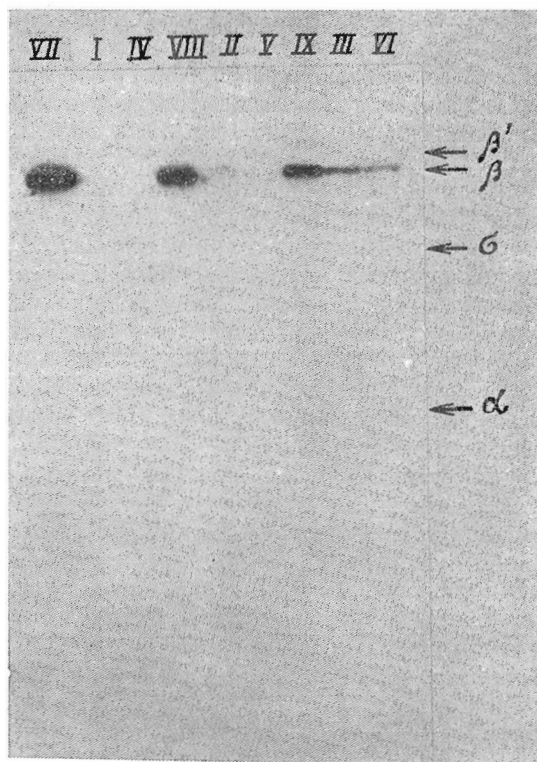


Рис. 4. Электрофоретический анализ [8, 9] аффинного мечення РНК-полимеразы *E. coli* соединениями (I)—(IX) в комбинации с $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. Стрелками указаны положения субъединиц

Авторы выражают благодарность И. В. Кутявину (НИБХ) за интерес к работе и полезные критические замечания при написании статьи.

Экспериментальная часть

В работе использовали GMP, GDP и GTP (Reanal, ВНР), 2,2'-дипиридилдисульфид (Merck, ФРГ), DCC и NaBH_4 (Serva, ФРГ), $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (3000 Ки/ммоль) производства «Изотоп». Щелочную фосфатазу *E. coli* любезно предоставил В. Ф. Подгорный (НИКТИ БАВ, Бердск). Рестрикционный фрагмент *Vsp1* — 1462 ДНК фага T7, содержащий промоторы A0, A1, A2 и A3, любезно предоставлен Т. Г. Максимовой (ЛИН СО АН СССР, Иркутск). РНК-полимераза *E. coli* — препарат производства «Олайн» (Рига). Остальные реактивы имели квалификацию х. ч. или ос. ч.

GDP и GTP дополнительно чистили хроматографией на DEAE-целлюлозе DE-52 (Whatman, Англия) в градиенте концентрации LiCl от 0 до 0,3 М.

Реагенты выделяли обращенно-фазовой хроматографией на колонке (20 мл) с сорбентом Lichroprep RP-18 в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (от 0 до 50%) в 0,05 М LiClO_4 (200 мл). Скорость подачи элюента 5 мл/мин.

Чистоту выделенных продуктов и величину их заряда определяли методом микроколоночной хроматографии на хроматографе «Милихром» на колонках с DEAE-целлюлозой DE-52 (50 мкл) в градиенте фосфата калия (0—0,2 М, pH 7,5) в 7 М мочевины или с Silasorb C18 (180 мкл) в градиенте концентрации ацетонитрила (0—40%), в 0,02 М ацетате аммония, pH 5. УФ-спектры записывали на приборе Specord UV-VIS (Karl Zeiss, ГДР).

Формилфениловые эфиры GMP и GDP (I), (II), (IV), (V), (VII), (VIII). К раствору 50 мг (90 мкмоль) триэтиламмониевой соли GMP или GDP в 500 мкл DMSO последовательно добавляли 50 мкл (0,6 ммоль) MeIm , 200 мг (0,76 ммоль) Ph_3P , 200 мг (0,9 ммоль) $(\text{PyS})_2$ и выдерживали 15 мин при 20° С. Затем к этой смеси добавляли 200 мг (1,6 ммоль) одного из

формилфенолов (4-гидрокси-, 4-гидрокси-3-метокси- или 2-гидроксибензальдегида) и после полного растворения 160 мкл (1,6 ммоль) триэтиламина. Через определенные промежутки времени (см. рис. 1) из смеси отбирали аликвоты по 5 мкл. Для остановки реакции и выделения продуктов к ним добавляли по 1 мл 2% NaI в ацетоне (в случае производных GDP) или по 1 мл диэтилового эфира (в случае производных GMP). Образовавшийся осадок дважды промывали ацетоном или эфиром соответственно, растворяли в воде и анализировали методом микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии. Выход продукта определяли, исходя из площадей пиков исходного нуклеотида и продукта и известных коэффициентов экстинкций. После 20 мин инкубации к оставшейся части реакционной смеси добавляли 10 мл 1% NaI в ацетоне или 10 мл эфира в зависимости от соединения как указано выше. Осадок растворяли в 1 мл 0,05 M LiClO₄ и подвергали обращенно-фазовой хроматографии на колонке (20 мл) с сорбентом Lichrospher RP18 как описано выше. Выход указанных соединений 90–95%.

Для определения зависимости выхода соединения (I) от избытка N-метилмидазола использовали те же соотношения реагентов, за исключением количества метилмидазола. Его избыток указан в таблице. Время инкубации на первой стадии 5 мин, на второй — 15 мин.

Формилфениловые эфиры GTP (III), (VI), (IX). Синтез циклического гуанозин-5'-триметафосфата осуществляли двумя способами. К раствору 10 мг триэтиламмониевой соли GTP в 100 мл DMSO добавляли: а) 20 мг DCC и 10 мкл 1 M раствора хлористого пиридиния в DMSO и выдерживали 1 ч при 20° С; б) по 20 мг Ph₃P и (PyS)₂ и выдерживали 30 мин при 20° С. К полученному по одному из этих способов раствору триметафосфата добавляли 40 мг одного из формилфенолов, 40 мкл TEA и инкубировали 30 мин при 20° С. Продукты выделяли осаждением в 2 мл 1% NaI в ацетоне, очищали обращенно-фазовой хроматографией как описано выше. Выход соединений (III), (VI), (IX) ~90%.

Обработка соединений (I)–(IX) фосфомоноэстеразой E. coli. К 20 мкл раствора, содержащего 2 мкл раствора щелочной фосфатазы активностью 10 мкмоль/мин·мкл в буфере 10 mM трис-HCl (pH 9), 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-меркаптоэтанол, добавляли 2 мкл 10 mM раствора одного из реагентов или АТР. Смесь инкубировали 2 мин при 56° С. Продукты анализировали микроколоночной ионообменной хроматографией.

Восстановление соединений (I)–(IX) боргидридом натрия проводили в спектрофотометрической кювете при 20° С, концентрация NaBH₄ 10 mM. За ходом реакции следили по уменьшению поглощения в области 290–320 нм.

Аффинное мечение РНК-полимеразы. 2 пмоль РНК-полимеразы и 0,5 пмоль промоторного фрагмента ДНК в 9 мкл буфера, pH 8 (40 mM трис-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM 2-меркаптоэтанол), выдерживали 5 мин при 37° С, добавляли 1 мкл 10 mM раствора одного из реагентов (I)–(IX) и через 30 мин 1 мкл 0,1 M NaBH₄. Через 30 мин добавляли 1 мкл водного раствора [α -³²P]UTP (1000–3000 Ки/ммоль, 3 мКи/мкл) и затем через 10 мин 3 мкл смеси состава: 5% додецилсульфат натрия, 5% 2-меркаптоэтанол, 50% глицерин, 0,005% бромфеноловый синий. Нагревали 10 мин при 56° С. Для анализа образцов использовали электрофорез в 10% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия как описано в работе [8] в микромасштабе [9]. Радиоактивно меченные субъединицы обнаруживали с помощью радиоавторграфии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколова Н. И., Третьякова С. С. // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 9. С. 1157–1180.
2. Knorre D. G., Kurbatov V. A., Samukov V. V. // FEBS Lett. 1976. V. 70. № 1. P. 105–108.
3. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886–894.
4. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Лаврик О. И. // Успехи биол. химии. 1986. Т. 27. С. 30–73.

5. Грачев М. А., Лухтанов Е. А., Мустаев А. А., Рихтер В. А., Рабинов И. В., Скоблов Ю. С., Абдукаюмов М. Н. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 552—555.
6. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 475—481.
7. Grachev M. A., Kolocheva T. I., Lukhtanov E. A., Mustaev A. A. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 113—121.
8. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
9. Poehling H. M., Neuhoff V. // Electrophoresis. 1980. V. 1. № 1. P. 90—102.

Поступила в редакцию
13.XII.1989

M. A. GRACHEV, E. A. LUKHTANOV, A. A. MUSTAEV

**FORMYLPHENYL ESTERS OF GUANOSINE-5'-MONO-, DI- AND
TRIPHOSPHATES AT THE TERMINAL PHOSPHATE RESIDUE**

Limnological Institute, Siberian Division, Academy of Sciences of the USSR, Irkutsk

Nine nucleotide formylphenyl esters at the terminal phosphate residue have been obtained via N-methylimidazolides (for GMP and GDP) or trimetaphosphate (for GTP) by the reaction with a formylphenol (4-hydroxy-, 4-hydroxy-3-methoxy-, or 2-hydroxybenzaldehyde) and characterized by UV spectroscopy, ion-exchange chromatography, and reversed-phase HPLC. They are stable towards phosphomonoesterase. Some of them have been used for highly selective affinity labelling of the *E. coli* RNA polymerase.