



УДК 547.963.32:543.422.25

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

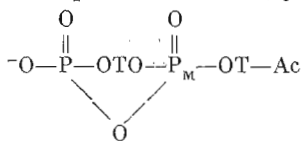
XI. РАЗДЕЛЕНИЕ ТРИЗАМЕЩЕННЫХ ПИРОФОСФАТОВ — АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИНУКЛЕОТИДОВ — МЕТОДОМ ИОНОБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Зарытова В. Ф., Лебедев А. В.

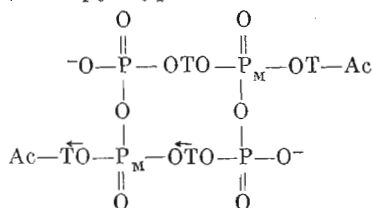
*Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Показано, что тризамещенные пирофосфаты, образующиеся при действии на $\text{d}r\text{TrT}(\text{Ac})$ умеренных избытков полистиролсульфохлорида, TPS или DCC в DMF, гидролизуются в водном DMF при 20° в течение нескольких часов. Это позволило методом ионообменной хроматографии по величине суммарного заряда провести разделение производных $\text{d}r\text{TrT}(\text{Ac})$ и записать спектры ^{31}P -ЯМР смеси изомеров мономерного 3',5'-циклопирофосфата (I) и димера динуклеотида с двумя пирофосфатными связями (II). Установлено, что соединение (I) гидролизуеться ~ в 3 раза быстрее, чем соединение (II). В водно-пиридиновых растворах гидролиз продуктов (I) и (II) ускоряется более чем на два порядка. Сигналы производных с восьмичленными внутримолекулярными циклами, аналогичные соединению (I), зарегистрированы в спектрах ^{31}P -ЯМР продуктов взаимодействия $\text{d}(\text{Tr})\text{TrT}$ с TPS. Методом ^{31}P -ЯМР исследовано также взаимодействие $\text{d}r\text{TrT}(\text{Ac})$ с TPS.

В предыдущей работе [1] было установлено, что спектр ^{31}P -ЯМР тимидин-3',5'-циклопирофосфата, содержащего восьмичленный цикл с пирофосфатной группой, представляет собой спиновую АВ-систему с аномально высоким значением константы спин-спинового взаимодействия J_{POp} 27,6 Гц, сигналы которой сдвинуты в более сильное поле на ~ 2 м. д. по сравнению с областью резонанса других пирофосфатных производных $\text{d}r\text{Tr}$ [2]. Аналогичные высокопольные спиновые АВ-системы с аномально высокими значениями J_{POp} (от 22,7 до 32,9 Гц) обнаружены в сложных спектрах ^{31}P -ЯМР продуктов взаимодействия $\text{d}r\text{TrT}(\text{Ac})$ с конденсирующими реагентами TPS и DCC [2, 3]. На основании этих спектров, а также ряда химических превращений для продуктов реакции $\text{d}r\text{TrT}(\text{Ac})$ с TPS и DCC были предложены следующие структуры [2, 3]:



(I)



(II)

($\bar{\text{T}}$ означает остаток тимидина с 3'-оксигруппой слева и 5'-оксигруппой справа).

Сокращения: TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид; DCC — N,N'-дихлоргексилкарбодимид; DMF — диметилформамид; ИХМ — ионообменная хроматография в микромасштабе.

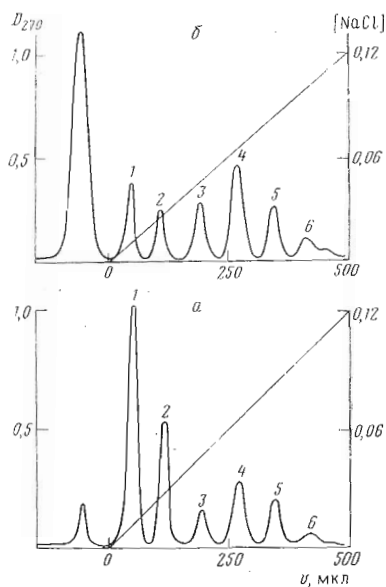


Рис. 1

Рис. 1. Ионообменные хроматографии в микромасштабе реакционных смесей (через 20 мин после добавления воды): а — dpTrT(As) (0,1 М) в DMF с DCC (0,5 М) через 50 мин; б — dpTrT(As) (0,1 М) в пиридине с полистиролсульфохлоридом (10 моль-экв.) через 10 ч

Рис. 2. Хроматография реакционной смеси (dpTrT(As) (0,1 М) в DMF (6 мл) с DCC (0,5 М) через 80 мин) после добавления 64 мл воды, на колонке с DEAE-молселектом

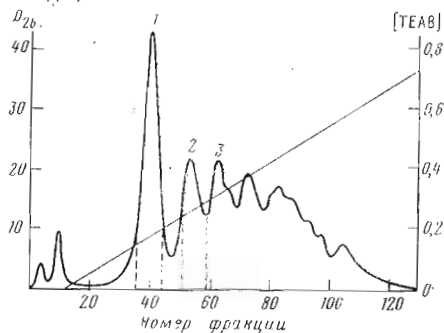


Рис. 2

Сложность спектров ^{31}P -ЯМР соединений (I) и (II) обусловлена наличием асимметрических атомов углерода (в остатках нуклеозидов) и фосфора (P_m), т. е. существованием этих соединений в виде смеси изомеров [2, 4, 5].

В настоящей работе были найдены условия, позволяющие методом ионообменной хроматографии разделить смесь соединений (I) и (II) по величинам зарядов, что дало возможность более детально охарактеризовать эти соединения. Присутствие производного с восьмичленным циклом, аналогичного соединению (I), зарегистрировано в спектрах ^{31}P -ЯМР продуктов взаимодействия d(Tr)TrTrT с TPS.

Ранее смесь соединений (I) и (II) была получена при взаимодействии dpTrT(As) с DCC или TPS как в пиридине, так и в DMF [2]. Нами установлено, что добавление эквивалентного объема воды к пиридиновым реакционным смесям приводит к очень быстрому (1—2 мин) разложению образующихся производных dpTrT(As) до исходного динуклеотида и частично симметричного 5'—5'-пирофосфата динуклеотида. Напротив, в DMF в отсутствие значительных количеств пиридина (некоторое количество пиридина вносится с пиридиновыми солями динуклеотида) процесс разложения реакционных смесей водой длится несколько часов. Этот факт позволил нам применить метод ИХМ в системе Томлинсона — Тенера [6] для анализа реакционных смесей, поскольку время такого анализа (~ 30 мин) много меньше, чем время разложения реакционной смеси.

На рис. 1а приведен профиль ИХМ после обработки водой реакционной смеси, полученной при действии DCC в DMF на пиридиновую соль dpTrT(As) . Видно, что в смеси присутствует набор соединений, различающихся по величине заряда. Преобладают соединения, которые, согласно положению на профиле элюции, имеют один и два заряда, что соответствует структурам (I) и (II). Таким образом, продукты реакции можно фракционировать по зарядам.

Для получения значительных количеств соединений (I) и (II) вышеуказанную реакционную смесь после обработки водой хроматографиро-

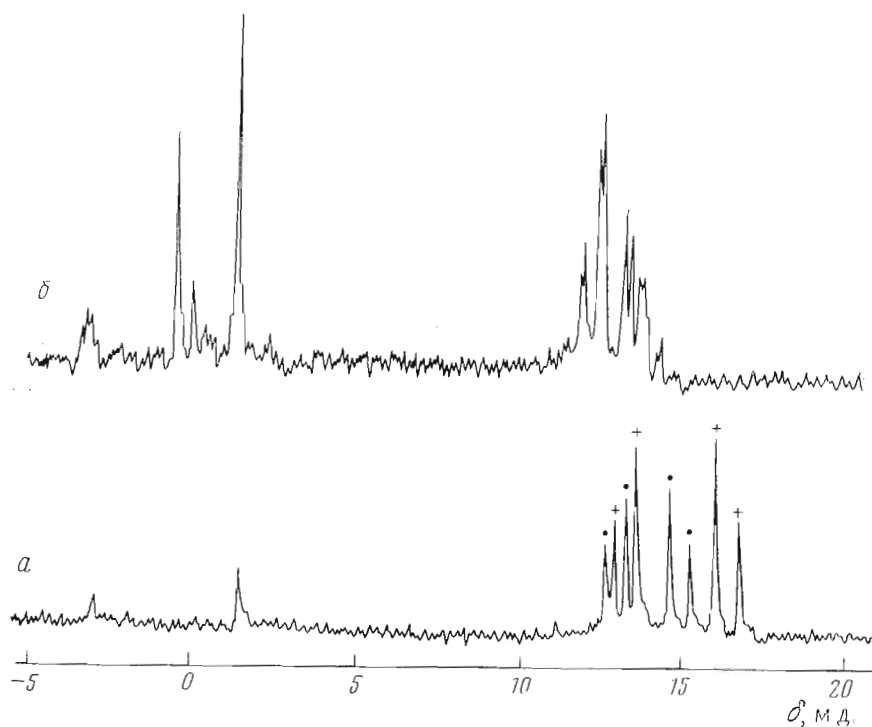
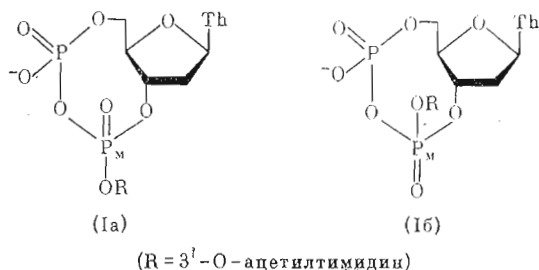


Рис. 3. Спектры ^{31}P -ЯМР: *a* — соединений пика 1 (см. рис. 2), (•) и (+) — сигналы, относящиеся к спиновым АВ-системам; *b* — соединений пика 2 (см. рис. 2)

вали на колонке с DEAE-молселектом. Профиль элюции приведен на рис. 2. Сравнение рис. 1*a* и 2 показывает, что в обоих случаях присутствует один и тот же набор пиков, соответствующих соединениям с 1,2,3 и т. д. зарядами. Худшее разрешение пиков в препаративном варианте обусловлено длительным временем деления реакционной смеси и, как следствие этого, частичной деградацией продуктов реакции в процессе хроматографии.

В силу наличия асимметрического межнуклеотидного атома фосфора (P_m) в соединении (I) оно должно существовать в виде двух изомеров (I*a*) и (I*b*) [4,5]:



Спектр ^{31}P -ЯМР хроматографической фракции 1 (рис. 3*a*) представляет собой две спиновые системы типа АВ ($J_{\text{POF}} \sim 23$ и 26 Гц) в области 13—17 м.д. Следовательно, именно двум высокопольным АВ-системам соответствует однозарядное вещество, что согласуется с предложенной структурой (I) [2,3].

Спектр ^{31}P -ЯМР хроматографической фракции 2 (рис. 3*b*) при 12—14 м.д. (область резонанса тринуклеозиддифосфатов [5]) представляет собой мультиплет, состоящий из нескольких налегающих спиновых

АВ-систем с константами $J_{\text{РОР}} \sim 17$ Гц. Такой спектр можно ожидать для соединения (II), содержащего обычные тризамещенные пирофосфатные группировки (ср. со спектром тринуклеозидпирофосфата [5]). Наличие нескольких АВ-систем можно объяснить явлением изомерии, обусловленным двумя асимметрическими атомами фосфора. Сигналы в области от

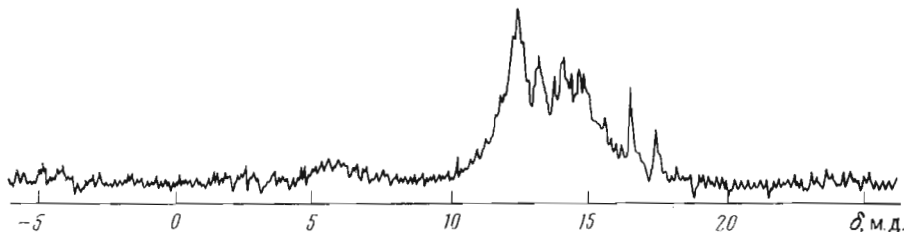
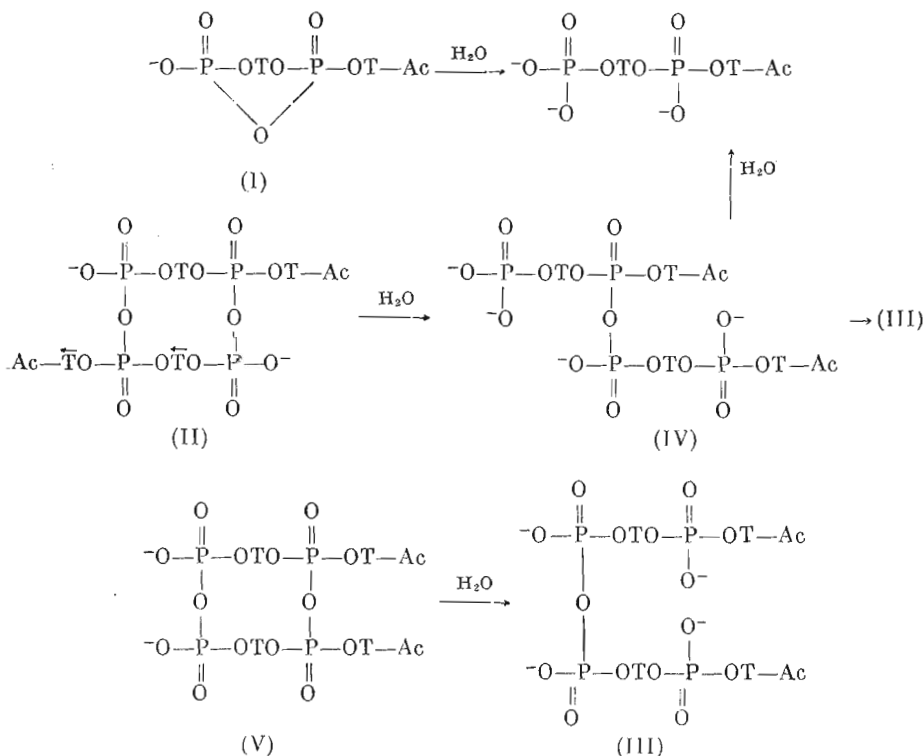


Рис. 4. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси $\text{dpTrT}(\text{Ac})$ (0,1 М) в DMF (6 мл) с DCC (0,5 М) через 80 мин

—30 до +2 м.д. хроматографической фракции 2 (рис. 3б) относятся к сигналам продуктов гидролиза (например, $\text{dpTrT}(\text{Ac})$ из-за перекрывания пиков 2 и 3 (рис. 2)), поскольку в исходной реакционной смеси до обработки водой (рис. 4) практически все сигналы спектра находятся при 11—17 м.д., т. е. в области резонанса замещенных пирофосфатов.

Некоторые выводы можно сделать и о структурах соединений, содержащихся в хроматографических фракциях 3 и 4 (рис. 1а). Согласно данным спектроскопии ^{31}P -ЯМР, в результате исчерпывающего гидролиза продуктов взаимодействия $\text{dpTrT}(\text{Ac})$ с DCC образуются динуклеотид и его симметричный пирофосфат (III), имеющие в условиях хроматографии соответственно 3 и 4 заряда, причем их соотношение зависит от количества добавленной воды (чем меньше воды, тем больше образуется пирофосфата). Некоторые возможные пути образования $\text{dpTrT}(\text{Ac})$ и пирофосфата (III) из продуктов реакции показаны на схеме:



Соединение (I) может реагировать с водой единственным способом с образованием динуклеотида. Соединение (II) реагирует с одной молекулой воды с образованием соединения (IV) (4 заряда в условиях хроматографии), которое далее может взаимодействовать с другой молекулой воды, давая $dpTrT(Ac)$, или изомеризоваться в более стабильный пирофосфат (III). К последнему должен привести и гидролиз соединения (V), поскольку тетразамещенная пирофосфатная группировка типа (VI) неустойчива в водной среде [7]:

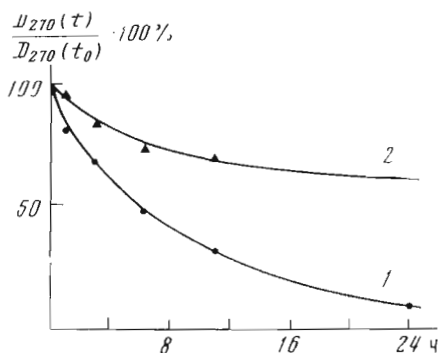
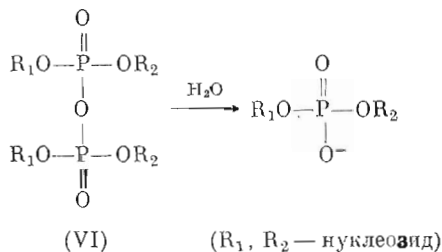
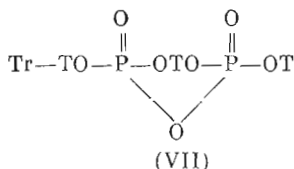


Рис. 5. Кинетические кривые гидролиза соединений (I) (1) и (II) (2) после добавления воды к реакционной смеси $dpTrT(Ac)$ (0,1 M) с DCC (0,5 M) в DMF (0,1 мл) (вода — DMF, 20 : 1)

По-видимому, все вышеперечисленные соединения (I—V, $dpTrT(Ac)$) могут (по крайней мере временно) присутствовать среди продуктов гидролиза «активированного» $dpTrT(Ac)$. Не исключено, однако, и присутствие некоторых других производных динуклеотида. Гидролитическую устойчивость соединений (I) и (II) исследовали методом ИХМ (см. «Экспериментальную часть»). Установлено, что пирофосфат (I) гидролизуетсся значительно быстрее (~ в 3 раза), чем соединение (II) (рис. 5). Исходя из этого факта, можно полагать, что соединение (I) более активное фосфорилирующее производное.

Образование соединений (I) и (II) доказано и для случая реакции $dpTrT(Ac)$ с полистиролсульфохлоридом [8] в пиридине. После отделения полимера, удаления пиридина и добавления воды анализ ИХМ показал тот же набор пиков, что и при реакции $dpTrT(Ac)$ с DCC (рис. 16).

Способность образовывать внутримолекулярные циклопирофосфатные группировки показана также для тринуклеозиддифосфатов. На рис. 6 приведен спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси, полученной при взаимодействии $d(Tr)TrTrT$ с TPS в пиридине. Основная часть сигналов спектра находится при 15—19 м.д., причем это сигналы спиновых систем АВ с высокими значениями констант спин-спинового взаимодействия J_{POF} от 20,5 до 27 Гц. Ни по химическому сдвигу, ни по структуре эти сигналы нельзя отнести к тетразамещенным пирофосфатным фрагментам типа (VI). С учетом ранее полученных данных сигналы при 15—19 м.д. можно отнести к четырем изомерным формам соединения (VII), поскольку в нем содержатся два асимметрических атома фосфора (в соединении (I) — один):



В литературе ранее высказывалось предположение о возможности образования соединений (VII) [9]. Причем авторы считали, что такие производные могли бы обладать достаточной реакционной способностью, чтобы образовывать триэфиры олигонуклеотидов. Последние могут далее при об-

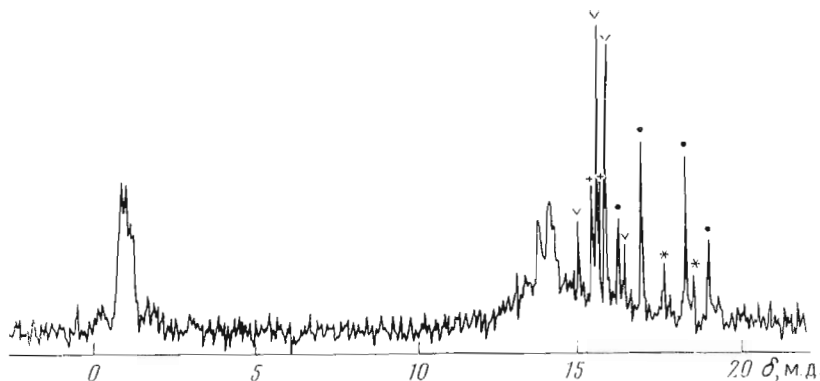


Рис. 6. Спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси $d(\text{Tr})\text{TrTrT}$ (0,03 M) с 4 экв. TPS в пиридине через 30 мин после смешения; (∇), (\cdot), ($+$) и ($*$) — сигналы спиновых АВ-систем. В двух последних случаях внешние компоненты АВ-систем, по-видимому, скрыты в шумах

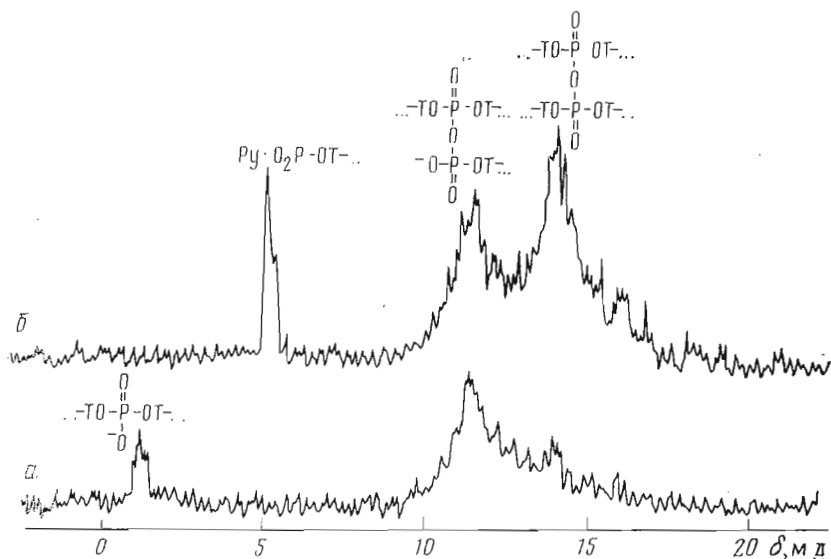


Рис. 7. Спектры ^{31}P -ЯМР реакционной смеси $d\text{rTrTrT}(\text{Ac})$ (0,05 M) в пиридине с TPS: а — через 0,5 ч после добавления 3 экв. TPS; б — через 2 ч после добавления еще 3 экв. TPS. Отнесение сигналов основано на данных предыдущих работ [2, 7, 10]. (Py — пиридин)

работках реакционных смесей разлагаться с разрывами фосфоэфирных (в том числе и межнуклеотидных) связей [9]. Согласно нашим данным по гидролизу пирофосфатов (I) и (II), соединения с восьмичленным циклом действительно несколько более реакционноспособны, однако окончательно на этот вопрос можно ответить только после более детального исследования.

На рис. 7а приведен спектр ^{31}P -ЯМР реакционной смеси $d\text{rTrTrT}(\text{Ac})$ с 3 эквивалентами TPS в пиридине. Незначительное количество сигналов в области 15 м.д. и выше (ср. рис. 4 и 7) показывает, что при активации более длинных олигонуклеотидов внутримолекулярные пирофосфатные фрагменты (I) присутствуют в меньшей степени. Возможно, что соединения с восьмичленными внутримолекулярными циклами типа (I) образуются в ходе реакции, но из-за наличия в $d\text{rTrTrT}(\text{Ac})$ соседней межнуклеотидной фосфатной группировки быстро превращаются в более стабильное

напряженное макроциклическое производное, сигналы которого можно ожидать в области 11—13 м.д. Добавление большого избытка TPS к $d\text{pTrT}(\text{Ac})$, как и в случае $d\text{pTrT}(\text{Ac})$, приводит к появлению в спектре сигнала с δ 5,4 м.д. (рис. 7б), что свидетельствует о превращении концевой 5'-фосфатной группы в $\text{Pu}\cdot\text{O}_2\text{P}-\text{OT}\dots$ [2,3,10,11].

Экспериментальная часть

В работе использовали 3'-О-ацетилдитимидилат [12], 3'-О-ацетилтри- тимидилат [13], 5'-О-тримитимидил- (3' → 5')-тимидил- (3' → 5')-тими- дин [14], 5'-О-тримитимидил- (3' → 5')-3'-О-ацетилтимидин [14]. Абсо- лютные пиридин и диметилформаид хранили над молекулярными ситами типа 4А. В качестве конденсирующих реагентов применяли 2,4,6-триизо- пропилбензолсульфохлорид [15], N,N'-дициклогексилкарбодимид [16] и полистиролсульфохлорид [8].

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на спектрометре НХ-90 с фурье-преоб- разованием на ЭВМ В-NC 12 (Bruker-Physik AG, ФРГ) на частоте 36, 43 МГц. Химические сдвиги приведены в м.д. относительно 85% H_3PO_4 . Детали и условия записи спектров описаны ранее (см., например, [4,5,7, 10]). Количественную оценку результатов проводили, используя инте- гральные кривые и данные ЭВМ.

Анализ реакционных смесей методом ИХМ в системе Томлинсона — Тенера осуществляли согласно работе [6].

Получение и разделение активных форм динуклеотида методом ИХМ. 1) 8,5 мг $d\text{pTrT}(\text{Ac})$ и 10 мг ДСС растворяли в 0,1 мл DMF и выдерживали 50 мин при 20°. Затем смесь выливали в 2 мл воды и быстро отфильтровыва- ли осадок дициклогексилмочевины и ДСС (реакционная смесь А); в неко- торых случаях ДСС экстрагировали 2 мл эфира. Смесь анализировали методом ИХМ на колонке с DEAE-целлюлозой (объем 50 мкл, высота 50 мм). Линейный градиент NaCl 0—0,12 М в буфере 7 М мочевины — 0,02 М Трис-НСl, рН 7,5. Скорость элюции 600 мкл/ч.

2) К 0,4 мл пиридинового раствора $d\text{pTrT}(\text{Ac})$ (32 мг) добавляли 80 мг выдержанного в пиридине 25 ч полистиролсульфохлорида и смесь пере- мешивали 10 ч при 20°, затем раствор сливали с полимера, упаривали до- суха при 25°, добавляли 2 мл воды и немедленно анализировали методом ИХМ. При нанесении на колонку сначала вымывается пиридин (или пири- динийхлорид). Профиль элюции приведен на рис. 1б.

Препаративное разделение активных форм динуклеотида методом ионообменной хроматографии. К раствору 0,6 г ДСС в 3 мл DMF при 30° при перемешивании в течение 40 мин добавляли по каплям раствор 0,5 г $d\text{pTrT}(\text{Ac})$ в 3 мл DMF. Смесь перемешивали еще 40 мин, записывали спектр ^{31}P -ЯМР (рис. 4) и выливали в 64 мл воды (t 1°). Смесь сразу на- чали наносить при 4° на колонку (25 × 170 мм) с DEAE-молселектом в HCO_3^- -форме со скоростью 70 мл/ч, используя пористый стеклянный фильтр № 1 для отделения осадка дициклогексилмочевины и ДСС. Элю- цию проводили при 4° линейным градиентом триэтиламмонийбикарбоната (ТЕАВ) (0,01—0,8 М). Объем элюента 1000 мл, скорость элюции 120 мл/ч. Профиль элюции приведен на рис. 2. Фракции (как показано на рис. 2) собирали, упаривали при 25° до объема 2 мл и записывали спектры ^{31}P - ЯМР при 1° (рис. 3а, б).

Исследование гидротической устойчивости соединений (I) и (II). Из реакционной смеси А (см. выше) через определенные промежутки вре- мени отбирали по 5 мкл раствора и анализировали методом ИХМ. Коли- чество соединения (I) (площадь пика I), зарегистрированное при первом анализе (через ~20 мин после добавления воды), принято за 100%. По- следующее содержание соединения (I) в смеси определяли в процентах от первого анализа. Аналогичный расчет проводили и для соединения (II). Результаты представлены на рис. 5.

Авторы выражают глубокую благодарность чл.-кор. АН СССР Д. Г. Кнорре за постоянный интерес к работе и участие в обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зарытова В. Ф., Лебедев А. В., Ратманова К. И., Смирнов В. Д., Шабарова З. А., Халинская Л. М. (1976) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 6, № 14, 100—106.
2. Knorre D. G., Lebedev A. V., Zarytova V. F. (1976) *Nucleic Acids Res.*, 3, 1401—1418.
3. Бадашкеева А. Г., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Шубина Т. Н. (1975) Докл. АН СССР, 222, 97—100.
4. Лебедев А. В., Резвухин А. И. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 2, № 4, 149—154.
5. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 2, № 4, 139—149.
6. Грачев М. А. (1973) в сб. Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот, с. 104—122, «Наука», М.
7. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Лебедев А. В., Левина А. С., Резвухин А. И. (1974) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., вып. 3, № 7, 126—131.
8. Туркин С. И., Потапов В. К., Шабарова З. А., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. (1975) Биоорган. химия, 1, 1430—1433.
9. Weimann G., Khorana H. G. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 419—430.
10. Knorre D. G., Lebedev A. V., Levina A. S., Rezvukhin A. I., Zarytova V. F. (1974) *Tetrahedron*, 30, 3073—3079.
11. Knorre D. G., Zarytova V. F. (1976) *Nucleic Acids Res.*, 3, 2709—2729.
12. Kössel H., Moon M. W., Khorana H. G. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.*, 89, 2148—2154.
13. Khorana H. G., Vizsolyi J. P. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 675—682.
14. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 6212—6222.
15. Lohrmann R., Khorana H. G. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, 88, 829—833.
16. Schmidt E., Hitzler F., Lander E. (1938) *Chem. Ber.*, 71, 1933—1938.

Поступила в редакцию
4.1.1977

INVESTIGATION ON MECHANISM OF CHEMICAL SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES. XI. SEPARATION OF TRISUBSTITUTED PYROPHOSPHATES—ACTIVE DINUCLEOTIDE DERIVATIVES— BY ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

ZARYTOVA V. F., LEBEDEV A. V.

*Institute of Organic Chemistry, Siberian Division of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Trisubstituted pyrophosphates — dpTpT(Ac) derivatives — formed on dpTpT(Ac) treatment with slight excess of polystyrenesulphonyl chloride, 2,4,6-triisopropylbenzenesulphonyl chloride (TPS) or N,N'-dicyclohexylcarbodiimide in dimethylformamide (DMF) are stable to hydrolysis in aqueous DMF at room temperature for several hours. This allowed to separate dpTpT(Ac) derivatives by ion-exchange chromatography and to take the ³¹P-NMR spectra for the isomeric mixture of monomeric 3',5'-cyclic pyrophosphate derivative (I) and dimeric dinucleotide (II) having two pyrophosphate bonds. It is found that (I) is hydrolyzed about three times faster than (II). The hydrolysis of (I) and (II) is accelerated by two orders of magnitude in aqueous pyridine solutions. The signals of eight-membered intramolecular cyclic derivatives, analogous to (I), have been observed in ³¹P-NMR spectra for the products of d(Tr)TpTpT interaction with TPS. The reaction of dpTpTpT(Ac) with TPS has been also studied by ³¹P-NMR spectroscopy.