



УДК 547.963.32.07

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXX. * СИНТЕЗ 5'-ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

*Женодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А.,
Хабарова М. И.*

Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пуцзино

Антоневич Е. Г.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

На примере синтезов рСрС, рАрС, рІрАрС, рСрАрС, рСрСрUrU и др. показано, что, применяя в различном сочетании рибонуклеазы и полинуклеотидфосфорилазу, можно синтезировать 5'-фосфорилированные олигорибонуклеотиды различной длины и состава.

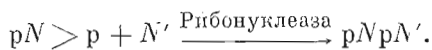
Комплексное использование ферментов нуклеинового обмена для синтеза олигорибонуклеотидов определенного строения — эффективный метод, предложенный и широко используемый в нашей лаборатории [2]. Эффективность этого метода подтверждена, в частности, получением ряда фрагментов тРНК^{Val} из дрожжей, содержащих модифицированные нуклеотидные остатки [3, 4]. Включение РНК-лигазы в тот «набор» ферментов, который уже использовался нами (рибонуклеазы с различной субстратной специфичностью, полинуклеотидфосфорилаза), значительно расширяет возможности метода, позволяя проводить направленный синтез достаточно длинных олигорибонуклеотидов [5].

В реакции, катализируемой Т4-РНК-лигазой, участвуют в общем случае два субстрата: олигонуклеотид с 5'-концевым фосфатным остатком (донор фосфата) и олигонуклеотид со свободной 3'-гидроксильной группой (акцептор фосфата). Обычно донор фосфата получают, вводя меченый фосфатный остаток с помощью полинуклеотидкиназы [6]. Выделение полинуклеотидкиназы, не содержащей примесей, способных расщеплять межинуклеотидные связи, представляет известные трудности. Мы предполагали использовать Т4-РНК-лигазу, как и другие ферменты, в препаративных целях. В связи с этим перед нами стояла задача найти более простой путь получения 5'-фосфорилированных олигорибонуклеотидов.

Ранее было показано, что рибонуклеазы различной специфичности способны использовать в качестве субстратов 5'-фосфорилнуклеозид-2',3'-циклофосфаты, катализируя образование 5'-фосфорилированных динуклеотидов [7—9]. Учитывая эти данные, мы синтезировали ряд динуклеотидов

* Сообщение XXIX см. [1]. Сокращения: ПН-фосфорилаза — полинуклеотидфосфорилаза; Е-СМ-целлюлоза — рибонуклеаза *Penicillium brevicompactum*, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой; остальные сокращения соответствуют общепринятым.

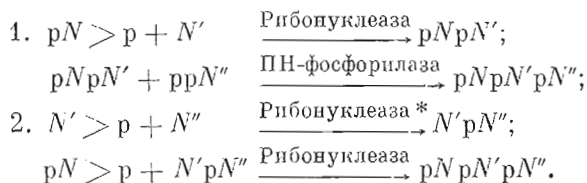
по схеме



5'-Фосфорилнуклеозид-2',3'-циклофосфаты ($pN > p$) были получены циклизацией нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфатов, приготовленных фосфорилированием незамещенного нуклеозида пирофосфорилхлоридом [10]. Циклизацию проводили в водном растворе с 5-кратным избытком водорастворимого карбодимида при pH 5-5,5 и $\sim 20^\circ\text{C}$ в течение 4 ч [11]. Заданное значение pH поддерживали добавлением 0,01 н. HCl с помощью автоматического pH-титриметра. Избыток карбодимида удаляли экстракцией смесью метанол-эфир (1:3), продукты реакции разделяли хроматографией на бумаге в системе А (табл. 1).

Получение $pNpN'$ с участием рибонуклеазы *P. brevicompactum* проводили как описано в работе [12]; для синтезов в присутствии гуанилспецифичных рибонуклеаз T_1 и *Aspergillus clavatus* использовали данные работы [13]. Реакционные смеси анализировали электрофорезом на бумаге с последующей очисткой продуктов хроматографией на бумаге (табл. 2). Анализируя эти данные, можно видеть, что малоспецифичная рибонуклеаза *P. brevicompactum*, как и ее иммобилизованная форма (Е-СМ-целлюлоза), с высокой эффективностью катализирует синтез $pGrC$. Из двух гуанилспецифичных рибонуклеаз фермент *Asp. clavatus* обеспечивает более высокий выход $pGrN'$, чем рибонуклеаза T_1 , что совпадает с результатами, полученными ранее для GrN [14]. Увеличение времени инкубирования субстратов с рибонуклеазой T_1 не повышает выход динуклеотида: через 24 ч выход $pGrU$ составлял $\sim 5\%$. Характеристики динуклеотидов приведены в табл. 3.

Тринуклеотиды и более длинные олигорибонуклеотиды, фосфорилированные с 5'-конца, могут быть получены двумя путями:



Чтобы сделать выбор между этими вариантами, мы исследовали их на примере синтеза $pGrCrU$. В соответствии с первым вариантом из 5'-фосфорилгуанозин-2',3'-циклофосфата и цитидина в присутствии рибонуклеазы *Pen. brevicompactum* мы синтезировали $pGrC$, как описано выше. Далее наращивание олигонуклеотидной цепи проводили, используя полинуклеотидфосфорилазу: из 6,8 мкмоль $pGrC$ и 3,4 мкмоль ppU в присутствии полинуклеотидфосфорилазы *Micrococcus luteus* в стандартных условиях, разработанных ранее в нашей лаборатории [15], получили 0,08 мкмоль $pGrCrU$ и 0,05 мкмоль $pGrCrUpU$. Анализ реакционной смеси и выделение продуктов реакции в этом случае значительно сложнее, чем в случае синтеза тринуклеозиддифосфатов, так как для $pGrC$ и $pGrCrU$ хроматографическая подвижность в разных системах растворителей, а также их электрофоретическая подвижность различаются несущественно.

Осуществляя второй вариант, мы синтезировали CrU из $C > p$ и U с помощью панкреатической рибонуклеазы, иммобилизованной на СМ-целлюлозе с выходом $\sim 16\%$ [16]. Далее наращивали олигонуклеотидную цепь с 5'-конца: из 35 мкмоль $pG > p$ и 35 мкмоль CrU в присутствии гуанилспецифичной рибонуклеазы *Asp. clavatus* получили 2,23 мкмоль $pGrCrU$. Таким образом, для получения 5'-фосфорилированных олигорибонуклеоти-

* Может быть использована любая другая рибонуклеаза. В нашем случае это Е-СМ-целлюлоза.

Выход и характеристики р.N>р

рN>р	Выход, %	R _f *	E**	Гидролиз 4 н. HCOOH		рN>р	Выход, %	R _f *	E**	Гидролиз 4 н. HCOOH	
				продукт	R _f *					продукт	R _f *
рU>р	85	0,85	1,1	рUp	0,50	рG>р	60	0,88	1,1	рGp	0,40
рA>р	92	0,80	1,2	рAp	0,34	рI>р	66	0,95	1,1	рIp	0,60

* Определены относительно Np в системе А.

** Определены относительно Np в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония, рН 8,0.

Таблица 2

Синтез рNpN' в присутствии различных рибонуклеаз

рNpN'	Условия реакции			Рибонуклеаза *	Выход, % на взятый рN>р
	[рN>р], М	[N'], М	время, ч		
рGpC	0,25	0,75	168	<i>P. brevicompactum</i> (1,5)	66
рGpC	0,25	0,75	190	Е-СМ-целлюлоза (20)	69
рGpU	0,02	0,50	72	<i>Asp. clavatus</i> (6)	41
рGpU	0,02	0,50	0,75	T ₁ (100)	6
рApC	0,125	0,375	170	<i>P. brevicompactum</i> (0,4)	29
рUpC	0,028	0,084	120	» (0,4)	13

* В скобках приведена концентрация фермента в ед. акт./мл (см. «Экспериментальную часть»).

Таблица 3

Характеристики 5'-фосфорилированных олигорибонуклеотидов

Олиго- нуклеотид	R _f * (система)	E _{Np}	Ферментативный гидролиз		
			рибонуклеаза	продукты	отношение
рGpC	0,43 (Г)	0,95	<i>P. brevicompactum</i>	рGp, C	1,1 : 1
рGpU	0,62 (Б)	0,94	—	—	—
рApC	0,17 (Г)	0,74	<i>P. brevicompactum</i>	рAp, C	1,1 : 1
рUpC	—	—	»	рUp, C	1,2 : 1
рIpApC	0,60 (А)	0,88	»	рIp, Ap, C	1 : 1,1 : 1
рGpApC	0,31 (А)	0,90	»	рGp, Ap, C	1 : 0,8 : 1
рGpCpU	0,21 (А)	0,96	»	рGp, Cp	1 : 0,9 : 1
рGpCpUpU	0,06 (А)	0,96	»	рGp, Cp+Up	1 : 1,1 : 1
рUpIpApC	0,32 (В)	0,98	Панкреатич.	рUp, IpApC	1,2 : 1

* Определены относительно 5'-концевого нуклеотида

Таблица 4

Синтез 5'-фосфорилированных три- и тетра-нуклеотидов

Донор фосфата	Акцептор фосфата	Фермент	Олиго- нуклеотид	Время, ч	Выход, % в расчете на акцептор	
					взятый	израсход.
рI>р	ApC	Рибонуклеаза <i>Asp. clavatus</i>	рIpApC	5	9*	
рG>р	ApC		рGpApC	5	4*	
рG>р	CpU		рGpCpU	7	6	19
рG>р	CpUpU	Рибонуклеаза А	рGpCpUpU	10	11	58
рU>р	IpApC		рUpIpApC	6	12	18
рpU	CpU	ПН-фосфорилаза	CpUpU	1	6	
I>р	ApC	Рибонуклеаза	IpApC	5	16	60

* Выход определен в расчете на донор фосфата.

дов второй путь предпочтительнее, так как дает более высокие выходы $pNpN'pN'$ и позволяет просто и удобно их выделять.

Этим путем мы синтезировали некоторые 5'-фосфорилированные три- и тетрауклеотиды. Для более эффективного использования олигонуклеотидного акцептора фосфата синтез 5'-фосфорилированных тетрауклеотидов проводили при 2–4-кратном избытке донора фосфата. Применение 5'-фосфорилированного циклофосфата дает в этом случае большие преимущества, так как наличие заместителя в 5'-положении предотвращает образование олигомеров. Не вступившие в реакцию субстраты легко регенерируются и могут быть многократно использованы в синтезе. Благодаря этому реальный выход 5'-фосфорилированного олигорибонуклеотида увеличивается в 4–8 раз.

Олигонуклеотидные акцепторы фосфата, использовавшиеся в обсуждавшихся выше синтезах, были получены последовательным применением рибонуклеаз различной специфичности и полинуклеотидфосфорилазы: ApC синтезировали из $A \rightarrow p$ и C в присутствии E - CM -целлюлозы; $IpApC$ был синтезирован из $I \rightarrow p$ и ApC с участием гуанилспецифичной рибонуклеазы *Asp. clavatus*; $CpUpU$ приготовили из CpU , наращивая олигонуклеотидную цепь с 3'-конца с помощью полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus*. Результаты синтезов три- и тетрауклеотидов представлены в табл. 4, а характеристики полученных олигонуклеотидов — в табл. 3.

Таким образом, применяя в различном сочетании рибонуклеазы и полинуклеотидфосфорилазу, можно синтезировать 5'-фосфорилированные олигорибонуклеотиды — субстраты для РНК-лигазы — различной длины и различного нуклеотидного состава. Структура синтезированных олигонуклеотидов подтверждалась ферментативным гидролизом с последующим анализом гидролизата хроматографией или электрофорезом на бумаге и УФ-спектрофотометрией.

Экспериментальная часть

В работе использовали аденозин, гуанозин, инозин, уридин, цитидин, Na -соли 2',3'-циклофосфатов аденозина, цитидина и 5'-дифосфата уридина, панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), полинуклеотидфосфорилазу *M. luteus*, рибонуклеазу T_1 (Calbiochem, США), панкреатическую рибонуклеазу, связанную с CM -целлюлозой, и n -толуолсульфонат циклогексил- β -[N-(N'-метилморфолиний)]этилкарбодимида (ЦКМК) (Serva, ФРГ). Инозин-2',3'-циклофосфат был приготовлен как описано в работе [9].

Нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфаты получали, фосфорилируя нуклеозиды пиродифосфорилхлоридом [10]. Как правило, исходили из 0,5–1 г нуклеозида; реакцию проводили в течение 5 ч при $-15^\circ C$, реакционную смесь хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой (HSO_3^-), используя для элюции линейный градиент (0,05–0,4 М) бикарбоната триэтиламония (рН 8,0). Выходы pNp сравнимы с литературными данными (85–95%). pNp превращали в соответствующие 5'-фосфорилнуклеозид-2',3'-циклофосфаты циклизацией с участием ЦКМК [11] (см. табл. 2).

Неспецифичная рибонуклеаза *P. brevicompactum* и гуанилспецифичная рибонуклеаза *Asp. clavatus* были выделены С. И. Безбородовой и сотр. (ИБФМ АН СССР). E - CM -целлюлоза была приготовлена нами как описано в работе [17]. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль $C \rightarrow p$ за 1 мин при рН 5,2 и $37^\circ C$ (рибонуклеаза *P. brevicompactum*), 1 мкмоль $G \rightarrow p$ за 30 мин при рН 7,8 и $37^\circ C$ (рибонуклеаза *Asp. clavatus*), или 1 мкмоль $A \rightarrow p$ за 1 мин при рН 7,0 и $37^\circ C$ (E - CM -целлюлоза).

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге FN-3 (Filtrak, ГДР). Для нисходящей хроматографии использовали следующие системы растворителей: А — этанол — пропанол-2 — конц. аммиак — вода (60 : 5 : 40 : 25); Б — этанол — конц. аммиак — вода (65 : 40 : 25); В — пропанол-1 —

конц. аммиак — вода (55 : 10 : 35); Г — этанол — 1 М ацетат аммония (5 : 2). Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 ч при напряжении 20 В/см в 0,05 М бикарбонате триэтиламония, рН 8,0.

Синтез АрС, СрU, СрUpU и IrArC проводили по методикам, опубликованным ранее в работах [17], [16], [15] и [18] соответственно.

Синтез динуклеотидов типа рNрN'. Раствор рN>р и N' в 0,2 М ацетатном буфере, рН 4,6 (рGrC), 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,6 или 7,0 (рибонуклеаза *Asp. clavatus* или T₁) соответственно, или в 0,2 М фосфатном буфере, рН 7,0 (рGrC с Е-СМ-целлюлозой, рArC, рUpC), инкубировали с ферментом при 0° С. Начальные концентрации субстратов и фермента, а также продолжительность инкубирования приведены в табл. 2. По истечении указанного времени (соответствует максимальному выходу и установлено по результатам изучения зависимости выхода динуклеотида от времени) реакционную смесь наносили на бумагу и разделяли, комбинируя электрофорез и хроматографию на бумаге в системе Б.

Синтез рIrArC, рGrArC, рGrCpU, рGrCpUpU. Раствор рN>р и олигонуклеотида-акцептора в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,6, инкубировали с гуанилрибонуклеазой *Asp. clavatus* при ~0° С. Ниже перечислены начальные концентрации субстратов, фермента и продолжительность инкубирования; 1) рI>р 0,02 М, АрС 0,04 М, 6 ед. акт./мл, 5 ч; 2) рG>р 0,028 М, АрС 0,028 М, 6 ед. акт./мл, 5 ч; 3) рG>р 0,02 М, СрU 0,02 М, 4 ед. акт./мл, 7 ч; 4) рG>р 0,04 М, СрUpU 0,02 М, 4 ед. акт./мл, 10 ч. Объем реакционной смеси составлял от 0,1 до 0,9 мл. По окончании реакции смесь разделяли препаративной хроматографией на бумаге в системе А или Б (рGrArC, рIrArC) с поледующей очисткой 5'-фосфорилированного олигонуклеотида электрофорезом на бумаге и повторной хроматографией в системе А или Б.

Синтез рUpIrArC. Раствор 4 мкмоль рU>р и 1 мкмоль IrArC или 8 мкмоль рU>р и 4 мкмоль IrArC в 0,1 мл 0,1 М трис-НСI-буфера, рН 8,0, содержащего панкреатическую рибонуклеазу в концентрации 1—50 мкг/мл, инкубировали ~6 ч. Реакционную смесь наносили на бумагу и хроматографировали в системе Б от 24 до 34 ч. Элюированные с бумаги отдельные компоненты смеси подвергали электрофорезу, а затем рехроматографировали в системах А или Б.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. (1980) Биоорган. химия, 6, 1505—1515.
2. Женодарова С. М. (1978) Докт. дис. «Ферментативный синтез олигорибонуклеотидов», М.
3. Zhenodarova S. M. (1976) in: Synthesis, Structure and Chemistry of Transfer Ribonucleic Acids and their Components, pp. 186—201, Poznan.
4. Zhenodarova S. M., Klyagina V. P., Smolyaninova O. A., Khabarova M. I., Antonovich E. G., Prokof'ev M. A. (1977) Nucl. Acids Res., 4, 2099—2107.
5. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Манькин А. С., Прокофьев М. А., Загребельный С. Н., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезнин М. И., Смолянинов В. В. (1980) Биоорган. химия, 6, 1037—1046.
6. Silber R., Malathi V. G., Hurvitz J. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3009—3013.
7. Bernfield M. R., Rottman F. M. (1967) J. Biol. Chem., 242, 4134—4144.
8. Holy A. (1969) Collect. Czech. Chem. Commun., 34, 1251—1277.
9. Седелникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 27—36.
10. Barrio J. R., Barrio M. C. G., Leonard N. J., England T. E., Uhlenbeck O. C. (1978) Biochemistry, 17, 2077—2081.
11. Кавуненко А. П., Морозова Э. Н., Тихомирова-Сидорова Н. С. (1971) Ж. общ. химии, 41, 226—232.
12. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1972) Молекулярн. биология, 6, 682—688.
13. Mohr S. C., Thach R. E. (1969) J. Biol. Chem., 244, 6566—6576.
14. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. (1976) Биоорган. химия, 2, 1111—1116.
15. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. (1975) Биоорган. химия, 1, 598—603.

16. Хабарова М. И., Смолянинова О. А., Багдонас А. С., Коваленко М. И., Женодарова С. М. (1978) *Биоорг. химия*, 4, 740-744.
17. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. (1980) *Биоорг. химия*, 6, 736-742.
18. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. (1977) *Биоорг. химия*, 3, 1475-1478.

Поступила в редакцию
2.I.1980

STEPWISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXX. THE SYNTHESIS OF 5'-PHOSPHORYLATED OLIGORIBONUCLEOTIDES

ZHENODAROVA S. M., SEDELNIKOVA E. A., SMOLYANINOVA O. A.,
KHABAROVA M. I., ANTONOVICH E. G.

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

Non-specific ribonuclease *Penicillium brevicompactum* (CM-cellulose-bound and water soluble preparations), guanylylspecific ribonucleases T₁ and *Aspergillus clavatus*, pancreatic ribonuclease and polynucleotide phosphorylase from *Micrococcus luteus* were used in different combinations for the synthesis of 5'-phosphorylated oligoribonucleotides. pGpC, pApC, pUpC, pGpU, pGpApC, pIpApC, pGpCpU, pGpCpUpU and pUpIpApC were prepared and utilized as substrates in reactions with T₄ RNA-ligase.
