



УДК 547.963.32.057:542.95

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ
В РЕАКЦИЯХ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ РИБОНУКЛЕОЗИДОВ
ФОСФОРИЛХЛОРИДОМ*Микстайс У. Я., Чаксте И. Р.**ВНИИ прикладной биохимии ИПО «Биохимреактив», Олайне*

Выявлена зависимость скорости фосфорилирования рибонуклеозидов от кислот-но-основных свойств гетероциклического основания. Предполагается, что первой стадией взаимодействия фосфорилхлорида с нуклеозидами является образование промежуточного соединения между фосфорилирующим агентом и наиболее нуклеофильным азотом гетероциклического основания и далее осуществляется образование фосфоэфирной связи путем нуклеофильной атаки активированного атома фосфора кислородом стерически близко расположенной 5'-гидроксильной группы.

Направленное химическое фосфорилирование рибонуклеозидов — удобный метод получения природных и модифицированных 5'-нуклеотидов. Известны способы фосфорилирования нуклеозидов фосфорилхлоридом в различных полярных растворителях, например в среде нитрилов и пиридина [1]. Наиболее распространенной реакционной средой являются триалкилфосфаты [2]. Селективность 5'-фосфорилирования незащищенных нуклеозидов обычно объясняют большей реакционной способностью первичной 5'-гидроксильной группы по сравнению с вторичными 2'- и 3'-группами.

С целью выявления других факторов, влияющих на селективность и скорость фосфорилирования нуклеозидов, мы провели сопоставление скоростей фосфорилирования различных рибонуклеозидов в одинаковых условиях. Фосфорилирование рибонуклеозидов и их солей осуществляли фосфорилхлоридом в триметилфосфате при 0° С. Скорость фосфорилирования определяли по количеству нуклеотида, образовавшегося к данному моменту времени. Так как фосфорилхлорид использовать в трехкратном мольном избытке, процесс может с достаточной для практических целей точностью рассматриваться как реакция первого порядка по нуклеозиду. Это подтверждается тем, что графическое изображение логарифмов концентраций нуклеозидов в зависимости от времени в начальных стадиях фосфорилирования представляет собой прямую. Результаты фосфорилирования рибонуклеозидов, константы скоростей реакций и время полупревращения обобщены в таблице и рис. 1, из которых видно, что скорость фосфорилирования рибонуклеозидов уменьшается в последовательности: $Cyd > Ado > Guo > Urd$. Полученный ряд соответствует ряду убывания основности рибонуклеозидов и обнаруживает зависимость реакционной способности 5'-гидроксильной группы от природы гетероциклического основания. Встречающиеся в литературе разрозненные данные о влиянии оснований нуклеиновых кислот на реакционную способность функциональных групп сахара [3, 4] не объясняют наблюдаемых закономерностей.

Для более подробного изучения роли гетероциклических оснований мы исследовали фосфорилирование ионизированных форм нуклеозидов. Быстрее, чем нуклеозиды, фосфорилируются их натриевые соли (рис. 1). Ранее для получения нуклеозид-5'-фосфорилидихлоридов нами было предложено использовать анионы нуклеозидов [5]. Гуанозин и уридин в анионной форме депротонированы в основании при N1- и N3-атомах соответственно [3, 6]. В анионе аденозина депротонирована главным образом 2'-гидроксильная группа [3, 6], однако селективность 5'-фосфорилирования

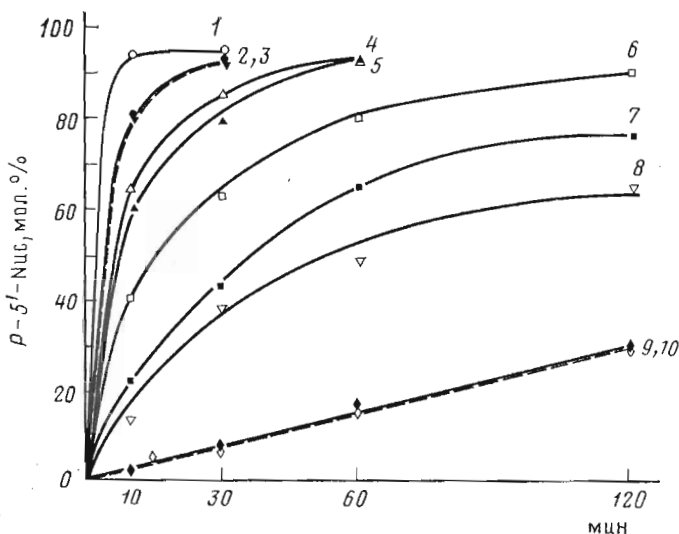


Рис. 1. Зависимость выхода нуклеозид-5'-фосфатов от времени реакции при фосфорилировании: Guo-Na (1), Urd-Na (2), Ado-Na (3), Cyd (4), Ado (5), Guo (6), Guo-HCl (7), Urd (8), Cyd-HCl (9), Ado-HCl (10) (1,8 ммоль Nuc, 5,4 ммоль POCl_3 , $\text{PO}(\text{OCH}_3)_3$ 5 мл, 0°C)

сохраняется и составляет свыше 97% (по данным периодатного окисления 2',3'-диольной группировки согласно работе [7]).

Нуклеозиды с протонированными гетероциклическими основаниями — гидрохлориды аденозина и цитидина — фосфорилируются значительно медленнее нейтральных форм нуклеозидов (таблица и рис. 1). В этой группе выделяется гуанозин, гидрохлорид которого по скорости фосфорилирования лишь незначительно уступает неионизированной форме. Как известно, гуанозин в отличие от остальных нуклеозидов протонируется не в пиримидиновом, а в имидазольном цикле [3].

На основании исследований фосфорилирования ионизированных форм нуклеозидов можно было предположить, что скорость фосфорилирования зависит от нуклеофильности пиримидинового цикла нуклеозидов. В связи с этим возник интерес к изучению зависимости реакционной способности нуклеозидов в реакциях фосфорилирования от величин pK_a нуклеозидов. До сих пор в литературе отсутствуют данные о значениях pK_a рибонуклеозидов в триметилфосфате. Однако известно, что pK_a соединений одного класса в органических растворителях линейно связаны с pK_a для тех же

Скорость фосфорилирования рибонуклеозидов

Нуклеозид	Время фосфорилирования, мин	Содержание, мол. %			$k \cdot 10^3, \text{c}^{-1}$	$t_{1/2}$, мин	ρ'
		Nuc	P-5'-Nuc	Nuc-2',5'+P_3 , Nuc-3',5'+P_2 , Nuc-2',3',5'+P_3			
Cyd	10	31,1	64,4	4,5	1,95	5,95	0,12
	30	9,6	84,5	5,9			
	60	1,8	93,7	4,5			
Ado	10	39,3	60,7	—	1,55	7,45	0,12
	30	18,7	79,3	2			
	60	3,7	93,2	3,1			
Guo	10	59,7	40,3	—	0,86	13,43	0,12
	30	37,4	62,6	—			
	60	19,9	81,3	1,8			
Urd	10	86,9	13,1	—	0,23	49,36	
	30	63,5	36,5	—			
	60	50,5	48,0	1,5			

соединений в воде [8—10]. Поэтому мы пользовались значениями pK_a , определенными для рибонуклеозидов в воде [3]. При графическом изображении проявляется линейная корреляция между логарифмом константы скорости фосфорилирования рибонуклеозидов и их pK_a (рис. 2). Уравнение прямой имеет вид

$$\lg k = 0,12 pK_a - 3,23. \quad (1)$$

Коэффициенты уравнения рассчитаны по методу наименьших квадратов, коэффициент корреляции $P=0,999$, что указывает на тесную связь между параметрами.

Можно было предположить, что применение принципа линейности подобно уравнению Гаммета позволит оценить степень влияния различных гетероциклов на скорость реакции. И действительно, нуклеофильности гетероциклических оснований линейно коррелируют с константами скорости реакции фосфорилирования 5'-гидроксильной группы:

$$\lg \frac{k_i}{k_0} = \rho' \sigma', \quad (2)$$

где k_i — константа скорости фосфорилирования рибонуклеозида; k_0 — константа скорости фосфорилирования уридина, выбранного в качестве стандарта; ρ' — коэффициент пропорциональности; σ' — константа, характеризующая нуклеофильность основания; $\sigma' = pK_a^{Nuc} - pK_a^{Urd}$. Рассчитанные значения ρ' приведены в таблице. На основании полученных закономерностей можно предположить, что первой скоростью лимитирующей стадией взаимодействия фосфорилхлорида с нуклеозидами является образование реакционноспособного комплекса между фосфорилирующим агентом и наиболее нуклеофильным азотом гетероциклического основания. Таким образом, наибольшая вероятность взаимодействия фосфорилхлорида с N1-атомом аденозина, N1- или, возможно, N7-атомом гуанозина и N3-атомом пиримидиновых нуклеозидов. Образовавшееся промежуточное соединение, аналогично описанному в литературе [8, 11] фосфорилимидазолам, обладает повышенной реакционной способностью атома фосфора. Этим обеспечивается повышенная скорость фосфорилирования в первую очередь близко расположенной 5'-гидроксильной группы. Стерически выгодное для нуклеофильного взаимодействия расположение 5'-гидроксильной группы и фосфорилхлорида, связанного с основанием, наглядно рассматривается на моделях Стюарта-Бриглеба.

Вторая стадия — образование фосфоэфирной связи — осуществляется нуклеофильной атакой активированного атома фосфора кислородом 5'-гидроксильной группы. После этого взаимодействие 5'-фосфорилдихлоридной группы с гетероциклическим основанием сохраняется подобно описанному взаимодействию 5'-фосфатной группы с основанием в нуклеотидах [3].

Взаимодействие фосфорилхлорида и гетероциклического основания подтверждается спектрами ПМР. После контакта фосфорилхлорида с нуклеозидами наблюдаются смещения химических сдвигов протонов нуклеозидов при NH_2 - и NH -группах на 3—4 м.д. в сторону слабого поля, соответствующие сдвигам сигналов протонов NH_2 - и NH -групп при комплексообразовании аминов с фосфатами [12].

Таким образом, внутримолекулярным катализом можно объяснить различную скорость фосфорилирования первичных 5'-гидроксильных групп, обладающих практически одинаковой у всех нуклеозидов и их солей нуклеофильностью.

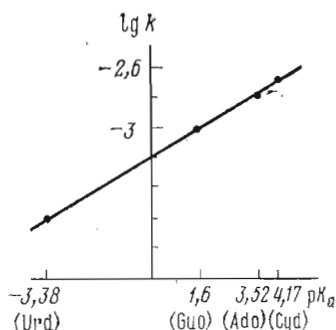


Рис. 2. Зависимость константы скорости фосфорилирования рибонуклеозидов от их pK_a . Условия — см. подпись к рис. 1

Экспериментальная часть

Спектры ПМР снимали в дейтерированном триметилфосфате с использованием циклогексана в качестве внутреннего стандарта на приборе Bruker WH-90 с рабочей частотой 90 МГц, УФ-спектры — на приборе СФ-16. Периодатное окисление продуктов фосфорилирования нуклеозидов и их солей проводили по методу [7]. Содержание основного вещества в солях нуклеозидов определяли как описано в работах [13, 14].

Дейтерированный триметилфосфат сушили над молекулярными ситами 4А. Триметилфосфат марки ч. применяли без дополнительной очистки. Нуклеозиды (производство НПО «Биохимреактив») сушили 20 ч в сушильном шкафу при 60° С. Фосфорилхлорид перегоняли.

Скорость реакции фосфорилирования определяли по нуклеотидному составу реакционной смеси. Через определенный интервал времени отобранную пробу (0,05 мл) гидролизовали ледяной водой, нейтрализовали 5 н. раствором NH_4OH (общий объем образца 1 мл). Анализировали 0,1 мл полученного раствора на колонке (0,7×5,5 см) Spheron DEAE 1000 (ЧССР), используя градиентное элюирование от воды к 2 М раствору формата аммония в 1 М муравьиной кислоте со скоростью 1,8 мл/мин. Оптическое поглощение элюата измеряли проточным УФ-денсиметром Uvicord (ЛКВ, Швеция) при 254 нм. Процентный состав компонентов рассчитали по площади регистрируемых пиков.

Натриевая соль уридина. Растворяли 1,2 г (30 ммоль) измельченного гидроксида натрия в 32 мл метилового спирта и при 50° С прибавляли 5 г (20,5 ммоль) уридина, раствор охлаждали до 20° С и после осаждения 15 мл диэтилового эфира фильтровали гигроскопическую соль, осадок на фильтре промывали эфиром (3×10 мл), сушили 15 ч в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 , затем 10 ч в сушильном шкафу при 60° С. Получали 5,5 г (выход 97,2%, считая на уридин) натриевой соли уридина, содержащей 96,4% основного вещества.

Натриевая соль гуанозина. Растворяли 1 г (25 ммоль) гидроксида натрия в 10 мл воды, к раствору прибавляли 5 г (17,7 ммоль) гуанозина, натриевую соль гуанозина осаждали 50 мл этилового спирта, суспензию охлаждали до 5° С, в течение 1 ч выдерживали в холодильнике. Получали 5,2 г (выход 96,5%, считая на гуанозин) соли, содержащей 99% основного вещества.

Натриевая соль аденозина. Растворяли 1,1 г (27,5 ммоль) гидроксида натрия в 170 мл этилового спирта и при 70° С прибавляли 5 г (18,7 ммоль) аденозина. После охлаждения смесь оставляли на ночь в холодильнике. Натриевую соль аденозина отделяли фильтрованием, осадок на фильтре промывали этиловым спиртом (3×10 мл), затем 10 ч сушили при 60° С. Получали 5,4 г (выход 96,1%, считая на аденозин) соли, содержащей 96,3% основного вещества.

Гидрохлорид гуанозина. Смешивали 5 г (17,7 ммоль) гуанозина с 5 мл (50 ммоль) 10 н. HCl , получали кристаллическую массу, которую суспендировали в этиловом спирте, фильтровали, осадок на фильтре промывали спиртом (3×25 мл) и 25 мл ацетона. Полученную соль сушили в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 . Получали 5,4 г (выход 90,6%, считая на гуанозин) $\text{Guo}\cdot\text{HCl}$, содержащего 94% основного вещества.

Гидрохлорид аденозина. Растворяли 5 г (18,7 ммоль) аденозина в 25 мл (25 ммоль) 1 н. HCl . Осаждали $\text{Ado}\cdot\text{HCl}$ 70 мл этилового спирта, смесь оставляли на ночь в холодильнике, фильтровали и после сушки получали 5,3 г (выход 94%, считая на аденозин) $\text{Ado}\cdot\text{HCl}$, содержащего 100% основного вещества.

Гидрохлорид цитидина. $\text{Cyd}\cdot\text{HCl}$ получали аналогично $\text{Ado}\cdot\text{HCl}$. Препарат содержит 100% $\text{Cyd}\cdot\text{HCl}$.

Фосфорилирование нуклеозидов и их солей. Общая методика. Охлаждали 5 мл триметилфосфата до 0° С, добавляли 0,5 мл (5,4 ммоль) свежеперегнанного фосфорилхлорида. При перемешивании, поддерживая температуру среды 0° С, добавляли нуклеозид или его соль (1,8 ммоль). По описанной выше методике определяли процентный состав компонентов через 10 мин, 0,5 ч, 1 ч и т. д.

Аналогично проводили фосфорилирование в дейтерированном триметилфосфате.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sowa T., Ouchi S. Bull. Chem. Soc. Japan, 1975, v. 48, № 7, p. 2084–2090.
2. Joshikawa M., Kato T., Takenishi T. Tetrahedron Lett., 1967, № 50, p. 5065–5068.
3. Кочетков Н. К., Будовский Э. М., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шibaев В. Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970.
4. Joshikawa M., Kato T. Bull. Chem. Soc. Japan, 1967, v. 40, p. 2849–2853.
5. А. с. 487887 (СССР) Способ получения хлорангидридов нуклеозид-5'-монофосфорных кислот/Микстайс У. Я., Чаkste И. Р. Оpubл. в Б. И., 1975, № 38.
6. Секацис И. П., Купче Э. Л., Чаkste И. Р., Микстайс У. Я. Матер. конф. «Методы получения и анализа биохимических препаратов», НИИТЭХИМ, 1977, с. 47.
7. Бусев А. И., Захаранс В. Я., Микстайс У. Я. Хим.-фармацевт. ж., 1977, т. 11, № 3, с. 128–132.
8. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1978.
9. Пальм В. А. Основы количественной теории органических реакций. Л.: Химия, 1977.
10. Измайлов Н. А. Электрохимия растворов. М.: Химия, 1976, с. 277.
11. Каюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 660–666.
12. Головня Р. В., Журавлева И. Л., Зенин С. В., Поляков В. А., Сергеев Т. Б. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1973, № 11, с. 2595–2597.
13. Веверис А. Я., Спинце Б. А., Микстайс У. Я. Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1981, № 3, с. 442–447.
14. Веверис А. А., Спинце Б. А., Микстайс У. Я. Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1983, № 1, с. 89–93.

Поступила в редакцию
5.V.1983
После доработки
7.II.1984

CATALYTIC ROLE OF NUCLEIC ACID BASES IN PHOSPHORYLATION REACTIONS OF RIBONUCLEOSIDES WITH PHOSPHORYL CHLORIDE

MIKSTAIS U. Ya., CHAKSTE I. R.

All-Union Research Institute of Applied Biochemistry, Olaine

The dependence of the ribonucleoside phosphorylation rate on the acid-base properties of a heterocyclic base has been established. According to the phosphorylation rate, nucleosides can be ranked as follows: Cyt>Ado>Guo>Urd, that is also in keeping with the decrease in basicity of ribonucleosides. A linear correlation is observed between the phosphorylation rate and the nucleoside pK_a . The formation of an inter-mediated between the phosphorylating agent and the most nucleophilic nitrogen of the heterocyclic base seems to be the first stage of the interaction between phosphoryl chloride and nucleosides. The subsequent step might involve the formation of phosphodiester bond due to a nucleophilic attack on the activated phosphorus by the oxygen of sterically proximal 5'-hydroxyl group.