



УДК 577.113.4

АМИНООКСИТИОТРЕИТ — НОВЫЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП В НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Хомутов А. Р., Хомутов Р. М.*

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;
* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

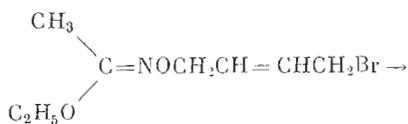
Хотя в настоящее время известно немало способов модификации нуклеиновых кислот [1], задача направленного введения заранее заданных функциональных групп имеет лишь частные решения, что связано с отсутствием набора соответствующих соединений, которые позволили бы осуществить необходимые превращения на основе одной реакции модификации нуклеиновых кислот.

Гидроксиламин и *O*-метилгидроксиламин являются сегодня признанными реагентами для модификации цитозинового основания в составе РНК и ДНК [2]. Развитость химии органических производных гидроксиламина позволяет получать разнообразные его производные по кислороду, а известный механизм реакции модификации с их использованием [3, 4] предполагает, что соединения вида $X-R-OH_2$, где $X = SH, COOH, NH_2$ и т. п., будут реагировать подобно простейшим *O*-замещенным гидроксиламинам. Независимым подтверждением этому служат данные о модификации ДНК *O*-(β -диэтиламиноэтил)гидроксиламином [5].

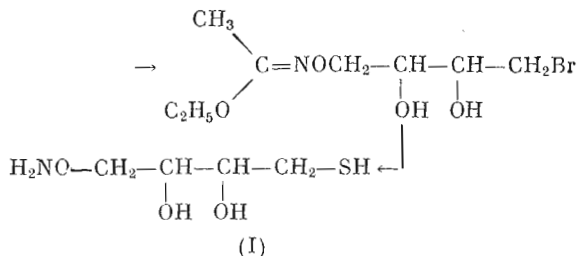
Среди функциональных групп, которые могли бы быть введены в нуклеиновые кислоты посредством реакции с производными гидроксиламина, наибольший интерес представляет сульфгидрильная группа как в силу ее легкой и специфической трансформируемости в мягких условиях, так и благодаря разработанности методов ее количественного определения [6], включая получение ртути содержащих (электроноцелтных) производных.

Так как модификация нуклеиновых кислот протекает с заметной скоростью лишь при использовании высоких концентраций гидроксиламина и *O*-метилгидроксиламина [2], содержащий SH-группы гидроксиламин должен хорошо растворяться в воде при нейтральных и слабокислых pH, оставаясь при этом незаряженным, обладать достаточной устойчивостью при многочасовых инкубациях и являться доступным соединением. Минимальной структурой, отвечающей этим критериям, является аминоксилалкилмеркаптан, содержащий гидроксильные группы.

Ряд аминоксилалкилмеркаптанов представлен лишь несколькими простыми соединениями, получение которых сопряжено с определенными трудностями [7, 8]. На примере синтеза аминоксисбутилмеркаптана были показаны преимущества этоксиэтилиденовой группы в качестве защиты аминоксигруппы [9]. Поэтому в предлагаемом синтезе искомого 1-аминокси-2,3-диокси-4-меркаптобутана («аминокситиотреит») (I) исходным производным гидроксиламина служил оксиминоуксусный эфир [10], который алкилировался *транс*-1,4-дибромбутеном-2, затем в полученное производное (II) последовательно вводились гидроксильные ($KMnO_4$) и сульфгидрильная (тиоацетат) группа и на последнем этапе удалялись все защиты:



(II)



Аминоокситиотреит (R_f 0,11 в системе $\text{CHCl}_3-\text{CH}_3\text{OH}$, 9:1 (A), Silufol (Kevalier, ЧССР), проявление в парах иода или растворами пиридоксаль-5'-фосфата (аминооксигруппа) и нитропруссидом натрия (сульфгидрильная группа) легко растворим в воде, причем растворы устойчивы при хранении в обычных условиях. Он нормально реагирует с альдегидами и кетонами, давая оксимы (ацетоноксим аминоокситиотреита имеет R_f 0,50 (A)), а реакция с пиридоксаль-5'-фосфатом была использована для количественного определения аминооксигруппы, согласно методу [11]. Сульфгидрильная группа количественно титруется реактивами Эллмана [12] и Бойера [13], а также *n*-хлормеркур-*o*-нитрофенолом [14]. Аминоокситиотреит реагирует с цитидином в стандартных условиях модификации последнего *O*-метилгидроксиламином [15].

Ранее изучалось взаимодействие $\text{O}-[^{14}\text{C}]$ метилгидроксиламина с тРНК^{Val} из дрожжей [16, 17], и было показано, что происходит модификация цитидиновых остатков только в одноцепочечных участках тРНК. В нашем случае инкубация суммарной тРНК (тРНК ^{Σ}) *E. coli* в 1 М

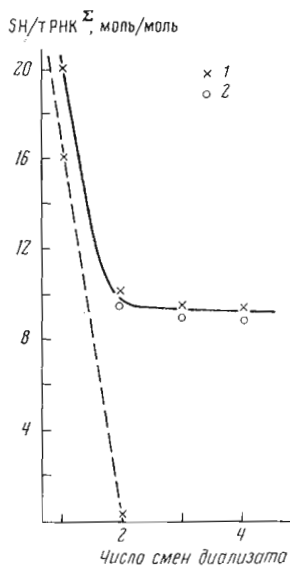


Рис. 1

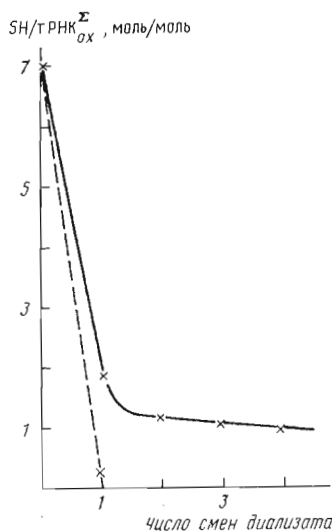


Рис. 2

Рис. 1. Введение сульфгидрильных групп в тРНК ^{Σ} с помощью аминоокситиотреита: $2,5 \cdot 10^{-4}$ М тРНК ^{Σ} *E. coli* (165 ОЕ/мл), 0,82 М аминоокситиотреит инкубировали 16 ч при рН 5,0 и 37° С и затем диализовали против 1 мМ ЕДТА и 50 мМ NaCl при 4° С, меняя диализат каждые 12 ч. Сульфгидрильные группы определяли реактивом Эллмана (1) и *n*-хлормеркур-*o*-нитрофенолом (2). В контроле (обозначены штриховой линией) реакционную смесь диализовали непосредственно после приготовления

Рис. 2. Введение сульфгидрильных групп по окисленному 3'-концевому остатку рибозы тРНК ^{Σ_{ox}} с помощью 1-аминоокси-4-меркаптобутана. $5,0 \cdot 10^{-4}$ М тРНК ^{Σ_{ox}} *E. coli* (330 ОЕ/мл) и $3,5 \cdot 10^{-3}$ М хлоргидрат 1-аминоокси-4-меркаптобутана в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (рН 5,0) инкубировали 2 ч при 20° С и затем диализовали. В контроле вместо тРНК ^{Σ_{ox}} использована тРНК ^{Σ} . Условия диализа и обозначения см. в подписи к рис. 1

O-[¹⁴C]метилгидроксиламин при 37° С в течение 16 ч приводила к включению в тРНК^Σ 10,1 остатка O-[¹⁴C]метилгидроксиламина. Аминоокситриотрит реагировала аналогично O-метилгидроксиламину, и после удаления избытка реагента диализом с тРНК оказывались связанными девять сульфгидрильных групп (рис. 1), вероятнее всего за счет модификации остатков цитидина.

Аминооксиалкилмеркаптаны оказались удобными реагентами и для введения сульфгидрильной группы избирательно по 3'-концу тРНК. Поскольку окисленная суммарная тРНК (тРНК^Σ_{ox}) быстро образует устойчивый аддукт и с разбавленными растворами O-метилгидроксиламина [18], в этом случае оказалось возможным использовать не только аминоокситриотрит, но и менее растворимый аминооксибутилмеркаптан (рис. 2).

Сульфгидрильные группы в составе тРНК алкилируются в стандартных условиях иод[¹⁴C]ацетамидом, а возможность их титрования *n*-хлормеркуро-*o*-нитрофенолом прямо указывает способ направленного введения электроплотных меток, что недавно было осуществлено нами по 3'-концу тРНК альтернативным методом [18] с использованием неизвестных ранее меркурированных O-замещенных гидроксиламинов [19].

ЛИТЕРАТУРА

- 1) Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова П. А., Турчинский М. Ф., Шibaев В. П. Органическая химия пукленновых кислот. М.: Химия, 1970.
- 2) Budowsky E. I. In: Prog. in nucl. acid res. and mol. biol./Ed. Cohn W. E. N. Y.—L.: Acad. Press, 1976, v. 16, p. 125—188.
- 3) Schalke P. M., Hall C. D. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1975, № 23, p. 2417—2422.
- 4) Schalke P. M., Hall C. D. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1976, № 11, p. 391—392.
- 5) Уланов Б. П., Серебряный А. М., Костяиовский Р. Г. Докл. АН СССР, 1967, т. 176, № 2, с. 474—475.
- 6) Турчинский Ю. М. Сера в белках. М.: Наука, 1977.
- 7) Bauer L., Suresh K. S. J. Org. Chem., 1963, v. 28, № 6, p. 1604—1608.
- 8) Bauer L., Suresh K. S., Ghosh B. K. J. Org. Chem., 1965, v. 30, № 3, p. 949—951.
- 9) Недоспасов А. А., Хомутов Р. М. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1976, № 9, с. 2113—2115.
- 10) Хомутов Р. М. Журн. общ. химии, 1961, т. 31, с. 1992—1995.
- 11) Korpele T. K., Mäkelä M. J. Anal. Biochem., 1981, v. 110, № 2, p. 251—258.
- 12) Ellman G. H. Arch. of Biochem. and Biophys., 1959, v. 82, № 1, p. 70—77.
- 13) Boyer P. D. J. Amer. Chem. Soc., 1954, v. 76, № 17, p. 4331—4337.
- 14) McMurray C. H., Trentham D. R. Biochem. J., 1969, v. 115, № 5, p. 913—921.
- 15) Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Shibaeva R. P., Monastyrskaya G. S., Kochetkov N. K. Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 246, № 2, p. 300—319.
- 16) Жилиева Т. И., Татарская Р. И., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1971, т. 5, № 1, с. 139—147.
- 17) Жилиева Т. И., Киселев Л. Л. Молекулярн. биология, 1972, т. 6, № 2, с. 254—263.
- 18) Khomutov A. R., Artamonova E. Yu., Zavalova L. L., Kritsky A. M., Denisova G. F., Goryuchenkova E. V., Khomutov R. M. In: Abstr. of third international conference on chemistry and biotechnology of biologically active natural products, Sofia, 1985, v. 4, p. 214—218.
- 19) Хомутов Р. М., Хомутов А. Р. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1985, № 11, с. 2649—2650.

Поступила в редакцию
30.XII.1985

AMINOXYTHIOTHREITOL — NEW AGENT FOR INTRODUCING REACTIVE THIOL GROUPS INTO NUCLEIC ACIDS

KHOMUTOV A. R., KHOMUTOV R. M.*

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry and *Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

SH-containing O-substituted hydroxylamines, namely highly soluble *threo*-1-amino-oxy-2,3-dihydroxy-4-thiobutane (aminoxythiothreitol) and 1-aminooxy-4-thiobutane are proposed as a means for introducing reactive thiol groups into cytidine residues, as well as at 3'-termini of nucleic acids.