



УДК 547.963+32'854

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ РНК ПО 5'-КОНЦЕВЫМ
ТРИФОСФАТНЫМ ГРУППАМ

Грачев М. А., Кнорре В. Л., Кнорре Д. Г.,
Петесов С. В.*

*Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР;*

**Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск*

Разработан метод селективной химической модификации РНК по 5'-концевым трифосфатным группам, основанный на активации последних водорастворимым карбодимидом в водном растворе в слабнокислой среде и на дальнейшем присоединении аминов к активному производному в слабощелочной среде.

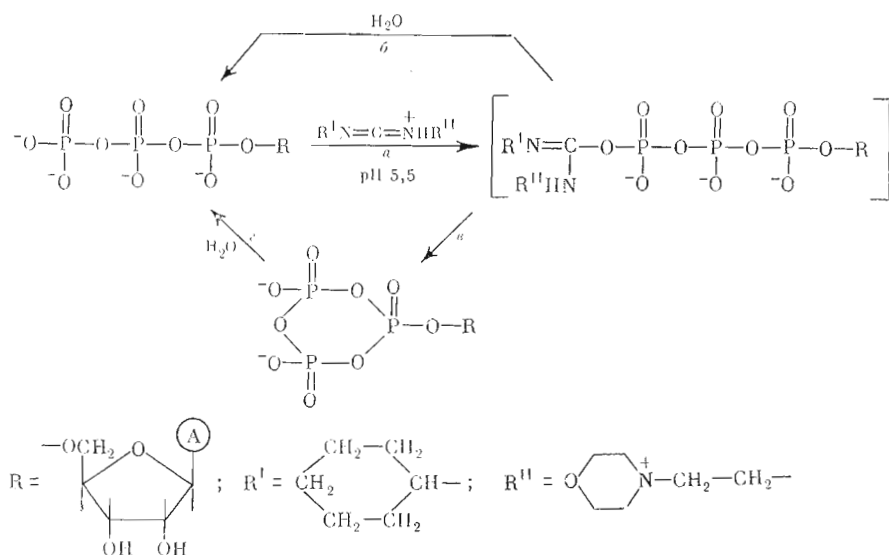
Селективная химическая модификация по определенным точкам широко используется для структурно-функционального исследования нуклеиновых кислот. Можно упомянуть о периодатном окислении 3'-концевых остатков тРНК [1], с. 531—535), сыгравшем большую роль при изучении их функции, о методах выделения индивидуальных тРНК, основанных на особых свойствах их 3'-концевых и аминоацильных остатков [2—4], об «адресованной» химической модификации — введении реакционноспособных группировок в концевые остатки олигонуклеотидов [5], об использовании присоединенного к аминоацильному остатку тРНК алкилирующего реагента для химической модификации рибосом [6] и аминоацил-тРНК-спинтетаз [7], а также для изучения конформации тРНК в растворе [8]. Предложен также ряд методов селективной химической модификации 5'-монофосфатной группы полинуклеотидов (см. [1], с. 598, 599).

Как известно, на 5'-конце вновь синтезированных молекул РНК присутствует трифосфатная группировка. Структура и функция таких вновь синтезированных РНК, в частности пре-м¹РНК, сейчас является предметом интенсивного исследования. В настоящей работе описан метод селективной химической модификации РНК по 5'-трифосфатной группе, который может быть полезен для решения ряда задач нуклеотидной химии.

Синтез γ -амидов нуклеозид-5'-трифосфатов впервые описали Моффатт и др. [9] и Шабарова с сотр. [10]. Этим авторам, однако, не удалось получить высокого выхода продуктов. Бабкина и Кнорре [11] исследовали реакцию АТР с *N*-циклогексил-*N'*- β -(4-метилморфолиний) этилкарбодимидом (ЦМЭ-карбодимид) в водном растворе и обнаружили, что она приводит к сравнительно устойчивому активному фосфорилирующему производному, которое можно аминолизом превратить в γ -амиды АТР. В дальнейшем было показано, что это активное производное представляет собой постулированный ранее Кораной и сотр. [12] циклический аденозин-5'-триметафосфат [13]. В неводной среде циклический замещенный триметафосфат может быть

получен и превращен в γ -амиды с количественным выходом [14, 15]. Однако проведение реакции в неводной среде не исключает определенных затруднений при работе с микроколичествами высокомолекулярных РНК. Поэтому мы попытались провести селективную химическую модификацию РНК по 5'-трифосфатной группе через замещенный циклический триметафосфат в водной среде.

Исследование кинетики активации трифосфатной группы АТР в водной среде [16] позволило установить основные реакции (см. схему).



Реакция «а» протекает с участием протонированного ЦМЭ-карбодимида и полностью ионизованного трифосфата. Она дает чрезвычайно нестабильное соединение — по-видимому, изображенную на схеме О-фосфорилизо-мочевину [12]. Скорость реакции «з» не зависит от рН в области 4—10; $\tau_{1/2}$ этого превращения при 15° составляет 6,5 мин. Поэтому при большом избытке ЦМЭ-карбодимида в системе устанавливается стационарная концентрация циклического триметафосфата, определяющаяся соотношением констант скоростей реакций «а — з» и концентрацией ЦМЭ-карбодимида, которая ограничена его растворимостью в воде (~ 0,2 М при 15°). Предельно высокий выход циклического аденозин-5'-триметафосфата в этой системе не превышает 75% [16].

При добавлении в реакционную смесь амина при рН 8,5 скорость реакции «а» сильно уменьшается из-за уменьшения концентрации протонированной формы ЦМЭ-карбодимида, а замещенный циклический триметафосфат с количественным выходом превращается в γ -амид [16]. В случае же 5'-и 3'-концевых и межнуклеотидных фосфатных групп активное промежуточное соединение, способное реагировать с аминами, не накапливается, и, следовательно, можно ожидать, что модификация этих групп по сравнению с 5'-трифосфатными будет ничтожной.

С помощью мРНК с меченой 5'-трифосфатной группой [γ - ^{32}P]GTP показано (рис. 1), что модификация приводит к появлению в щелочном гидролизате [^{32}P]меченого соединения (пик 3, рис. 1б) с подвижностью, промежуточной между подвижностями АТР (пик 2) и гуанозин-2'(3')-фосфат-5'-трифосфата, образующегося при гидролизе исходной мРНК. Для доказательства структуры вещества пика 3 как γ -морфолида гуанозин-2'(3')-фосфат-5'-трифосфата его обработали фосфатазой и затем хроматографировали вместе с немеченым γ -морфолидом АТР. Из рис. 1 видно, что обработка фосфатазой не приводит к появлению неорганического фос-

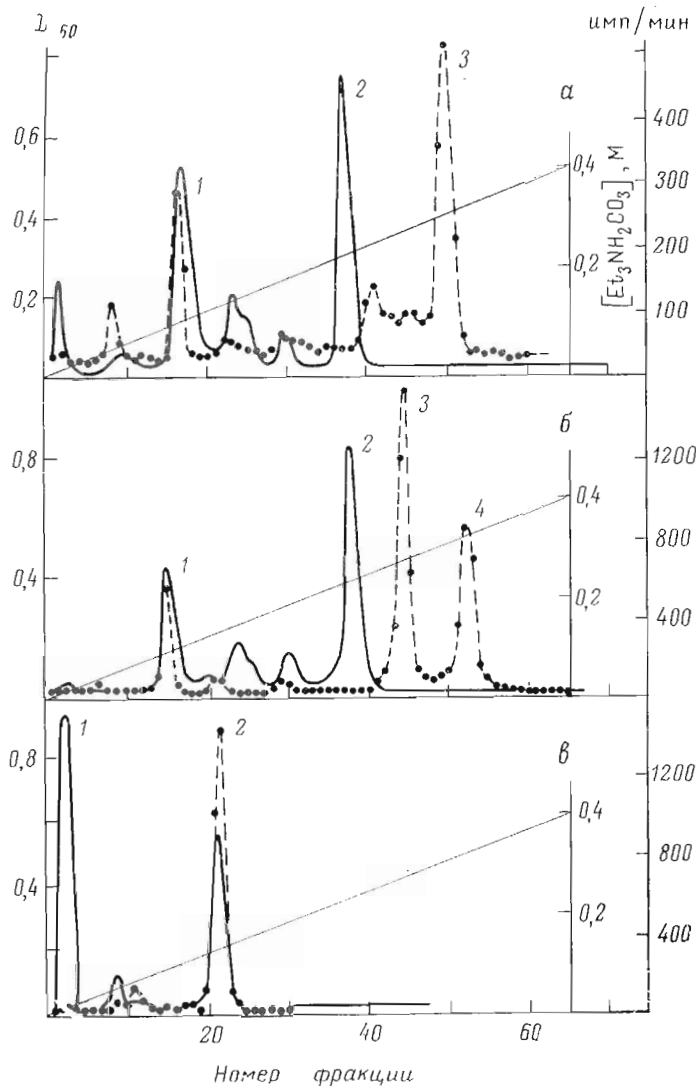


Рис. 1. *а* — профиль хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе щелочного гидролизата РНК, синтезированной из γ -[^{32}P]GTP на матрице деватурированной ДНК из тимуса теленка. В качестве носителя добавлен АТР (пик 2). Пик 1 — смесь нуклеозид-2'(3')-фосфатов, получающихся при щелочном гидролизе тРНК, добавленной в качестве носителя; пик 3 — γ -[^{32}P]гуанозин-5'-трифосфат-2'(3')-фосфат, получающийся при щелочном гидролизе мРНК, имевшей трифосфат на 5'-конце. Сплошная линия — оптическая плотность при 260 нм; пунктир — радиоактивность. *б* — то же, что и в «а», но щелочному гидролизу подвергнута РНК после химической модификации морфолином. Пик 1 — смесь нуклеозид-2'(3')-фосфатов; пик 2 — АТР; пик 3 — продукт модификации РНК морфолином и последующего щелочного гидролиза (γ -морфолид гуаозин-5'-трифосфат-2'(3')-фосфата); пик 4 — то же, что и пик 3 на рис. 1*а*. *в* — профиль хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе материала пика 3 (рис. 1*б*) после его гидролиза фосфатазой. В качестве носителя добавлен γ -морфолид АТР (0,3 мг). Условия хроматографии и обозначения те же, что и на рис. 1*а*. Пик 1 — аденозин (продукт гидролиза АТР-фосфатазой); пик 2 — радиоактивный γ -морфолид GTP и нерадиоактивный γ -морфолид АТР в качестве свидетеля

фата. Это подтверждает (ср. [14]) наличие в анализируемом соединении заместителя при γ -фосфатном остатке.

Как известно, γ -амиды нуклеозид-5'-трифосфатов при мягком кислотном гидролизе превращаются в исходные трифосфаты [14]. В результате такого гидролиза меченое вещество пика 2 (рис. 1*в*) превращается в

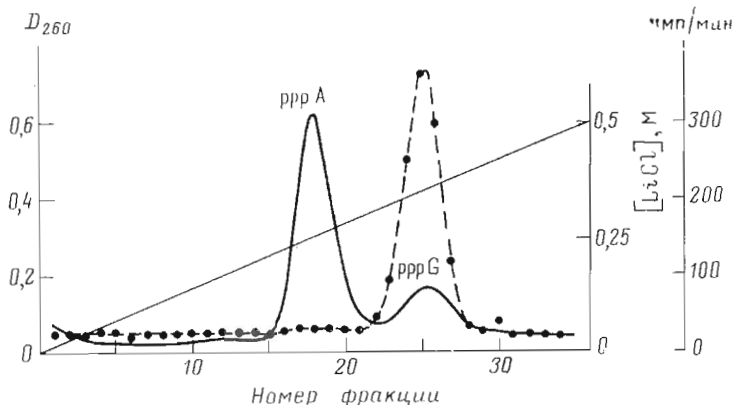


Рис. 2. Профиль хроматографии на дауэксе 1×2 (H^+) продукта кислотного гидролиза материала пика 2 (рис. 1б) с добавкой смеси $50E_{260}$ АТР и $10E_{260}$ ГТР. Элюция градиентом LiCl в 0,003 М HCl, фракции по 1,1 мл;

$[^{32}P]$ ГТР, идентифицированный хроматографией на анионите в кислой среде (рис. 2).

Аналогично было доказано строение продуктов модификации мРНК с мечеными ^{32}P rppA-концами. В таблице приведены выходы мРНК, модифицированных различными аминами, определенные по соотношению радиоактивностей пиков rppNp и RpppNp в щелочных гидролизатах.

Далее необходимо было получить подтверждение селективности предлагаемой методики. Из побочных реакций возможно присоединение амина к внутренним участкам полинуклеотидной цепи и к монофосфатным концевым группам. Для исследования вероятности модификации внутренних участков мы воспользовались спин-меченым амином — 2,2,6,6-тетраметил-4-аминопиперидин-1-оксидом (R). Оказалось, что РНК, модифицированная этим амином, содержит 0,5 моль спиновой метки на моль концевых трифосфатных групп (рис. 3). С другой стороны, определение выхода модификации по отношению радиоактивностей пиков RppppAp и rppAp (таблица) также дало значение 50%. Следовательно, весь присоединившийся амин в пределах ошибки метода ($\pm 20\%$) связан с трифосфатными группами и модификации внутренних участков не происходит.

Обработка по предлагаемой методике в отличие от обычной конденсации в присутствии амина ([1], с. 598, 599) не приводит к присоединению амина по 5'-монофосфатному остатку. Экспериментально это было доказано в опыте с олигонуклеотидом рТрТрТ. Оказалось, что после обработки, применяемой для модификации трифосфатной группы, этот олигонуклеотид остается неизменным по крайней мере на 95%, по данным хроматографии на DEAE-целлюлозе в 7 М мочевице при pH 8.

Выходы РНК, селективно модифицированной по 5'-трифосфатным концевым остаткам

Амин	РНК, синтезированная на матрице	Меченая концевая группа	Выход, %
Морфолин	тимусной ДНК	* rppG	65
»	ДНК фага Т7	* rppA-	70
Анилин	То же	* rppA-	40
<chem>O=N1CCN(C)CC1</chem>	тимусной ДНК	* rppG-	40
»	ДНК фага Т7	* rppA-	50

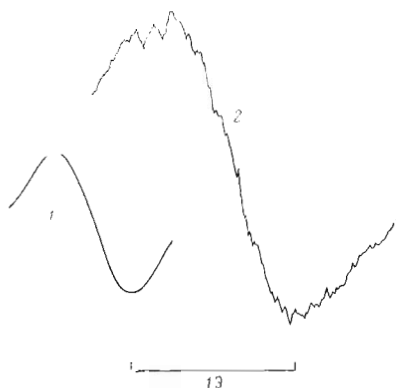


Рис. 3. ЭПР-Спектры щелочного гидролизата РНК, модифицированной спин-меченым амином (2,2,6,6-тетраметил-4-аминопиперидин-1-оксидом (1) и такого же амина с известной концентрацией (2). Приведен центральный компонент сверхтонкой структуры

Согласно работе Зарытовой и др. [17], действие конденсирующих агентов на РНК в неводной среде приводит к образованию фосфотриэфирных групп путем атаки 2'-гидроксила рибозы по активированному межнуклеотидному фосфату. При последующем гидролизе фосфотриэфирных групп происходит как изомеризация, так и разрывы межнуклеотидных связей. Нельзя исключить, что в какой-то степени аналогичные процессы могут иметь место и в использованных нами условиях. По предварительным данным, селективная модификация РНК по 5'-трифосфатным группам действительно сопровождается ее фрагментацией. Однако степень такой фрагментации не слишком велика — по крайней мере РНК, полученная транскрипцией ДНК фага Т7, элюируется при гельфильтрации на сефадексе G-200 в свободном объеме как до,

так и после модификации. Дальнейшее изучение этой побочной реакции будет предметом специального исследования.

Что касается вопроса о возможности побочной реакции оснований РНК с ЦМЭ-карбодимидом [18], то кинетика модификации оснований, тщательно исследованная как на тРНК [19], так и на рибосомальной РНК [20], позволяет утверждать, что в условиях предлагаемой селективной активации и реакции с аминами сколько-нибудь существенной модификации оснований РНК ЦМЭ-карбодимидом не происходит.

Значение предлагаемой методики селективной химической модификации РНК по 5'-трифосфатным группам заключается в том, что она позволяет присоединить к РНК аналог «кэпа» — положительно заряженного остатка, присутствующего на 5'-трифосфатном конце некоторых природных мРНК; создает перспективы разработки метода разделения синтезированных *in vivo* пре-мРНК и зрелых РНК, а также дает возможность начать разработку удобного подхода к адресованной химической модификации промоторных участков ДНК.

Экспериментальная часть

Определение радиоактивности осуществляли по Черенкову с помощью сцинтилляционного счетчика Марк-II (Nuclear Chicago, США). 2,2,6,6-Тетраметил-4-аминопиперидин-1-оксид, полученный методом [21], любезно предоставлен Ж. М. Беккером (Институт химической кинетики и горения СО АН СССР). В работе использованы 2-морфолиноэтансульфокислота (МЭСК) (Calbiochem, США), щелочная фосфатаза *E. coli* марки WAPF (Worthington, США), ДНК-зависимая РНК-полимераза *E. coli* и тРНК (СКТБ биологически активных веществ, Новосибирск). ДНК из тимуса теленка (Союзреактив) денатурирована щелочью. ДНК фага Т7 выделена фенольной экстракцией из фага Т7, полученного на опытной установке института. γ -Морфолид АГР синтезирован методом [14], *n*-Толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*- β -(4-метилморфолиний) этилкарбодимид (ЦМЭ-карбодимид), полученный методом [22], перекристаллизовывали из смеси метанола с эфиром; в ИК-спектре очищенного вещества (KBr) отсутствовала полоса 1625 см^{-1} (карбонильная группа ЦМЭ-мочевины).

Синтез РНК с 5'- γ '-[^{32}P] трифосфатом осуществляли с помощью РНК-полимеразы на матрице либо денатурированной тимусной ДНК, либо ДНК

фага Т7. Для синтеза брали препараты γ -[32 P]АТР либо γ -[32 P] GTP удельной радиоактивности 1—5 Ки/ммоль (Amersham, Англия), при необходимости разбавленные немечеными трифосфатами. Состав реакционной смеси: 0,05 М трис-НСl (рН 8,0), 0,02 М MgCl₂, 0,01 М 2-меркаптоэтанол, 0,08 М KCl, по $4 \cdot 10^{-4}$ М каждого нуклеозид-5'-трифосфата, 0,1 мг/мл ДНК, 0,1 мг/мл РНК-полимераза. Объем смеси 0,5 мл. Через 1,5 ч инкубации при 37° добавляли 10 мкг ДНКазы (DPFF, Worthington) и инкубировали еще 1 ч. РНК из смеси выделяли трехкратной фенольной экстракцией с 0,1% додецилсульфатом натрия и последующим спиртовым осаждением. Далее РНК подвергали гель-фильтрации в 0,2 М NaCl — 1 мМ EDTA — 0,05 М KH₂PO₄ (рН 6,0) для удаления ионов магния. Затем полимерный пик осаждали спиртом, переосаждали из 0,002 М EDTA, и дважды переосаждали спиртом из 0,01 М МЭСК — NaOH, рН 5,5. Осадок сушили в вакууме и растворяли в 0,01 М МЭСК — NaOH для немедленного использования. Матричная РНК, синтезируемая в этих условиях на матрице ДНК фага 17, имеет на 5'-конце остатки pppA (75%) и pppG (25%) [23]. По данным гель-фильтрации, молекулярный вес составлял не менее 100 000.

Химическая модификация РНК по 5'-трифосфатным группам. К 0,1 мл раствора РНК, полученной как описано выше ($2-10 \cdot 10^3$ имп/мин, ~ 25 мкг) при 15° добавляли 5 мкл раствора тРНК (10 мг/мл), затем 0,4 мл свежеприготовленного 0,2 М раствора ЦМЭ-карбодимида в 0,01 М МЭСК — NaOH. Через 40 мин перемешивания при 15° к смеси добавляли 0,5 мл 1 М раствора амина, оттитрованного HCl до рН 8,5, и перемешивали еще 3 мин при 15°. К смеси добавляли 50 мкл 4 М NaCl и 2,5 мл охлажденного спирта. Раствор оставили на 2 ч при -20°. Полученный продукт дважды переосаждали спиртом из 0,15 М NaCl.

Щелочной гидролиз РНК проводили в 10%-ном пиперидине при 50° в течение 16 ч. Пиперидин удаляли экстракцией эфиром, освобожденным от перекисей.

Ионообменную хроматографию на DEAE-целлюлозе DE-52 (Ватман) осуществляли на колонке 0,9×12 см. Элюцию вели при 4° линейным градиентом бикарбоната триэтиламмония от 0 до 0,4 М; объем градиента 300 мл, скорость элюции 15 мл/ч; объем фракции 5 мл.

Обработку фосфатазой производили после упаривания фракций. Остаток после упаривания растворяли в 0,5 мл воды, добавляли 0,5 мкмоль АТР для контроля полноты гидролиза, 25 мкл 1 М трис-НСl (рН 8), 5 мкл 0,1 М MgCl₂ и 20 мкг фосфатазы в 10 мкл воды. Через 2 ч, при 37° смесь разбавляли водой до 5 мл.

Идентификация продукта пика 2 (рис. 1 в). Пик собирали, упаривали, остаток растворяли в 0,5 мл 0,01 М HCl и инкубировали 1 ч при 40°. Затем смесь нейтрализовали 0,1 М NaOH, добавляли 5 ОЕ₂₆₀ АТР и 1 ОЕ₂₆₀ GTP и наносили на колонку 0,4×15 см с дауэксом 1×2 100—200 меш в H⁺-форме; элюция производилась 40 мл линейного градиента LiCl в 0,003 М HCl от 0 до 0,5 М (3 мл/ч; фракции по 1,1 мл).

Исследование селективности модификации РНК по 5'-трифосфатным группам. ЭПР-Спектры снимались Ж. М. Беккером на спектрометре Varian E-3 (США) в постоянно закрепленном капилляре при 30°. На матрице ДНК фага Т7 была синтезирована меченая РНК из γ -[32 P]АТР ($5,6 \cdot 10^3$ имп/мин·моль) и трех немеченых нуклеозидтрифосфатов. Эта РНК подвергнута модификации, амин удаляли спиртовым осаждением, гель-фильтрацией на сефадексе G-50 и двумя спиртовыми осаждениями. Осадок растворяли в 100 мкл воды и подвергали щелочному гидролизу. Счет по Черенкову показал, что концентрация R*pppAp + p*ppAp в смеси равна $6,7 \cdot 10^{-7}$ М (3750 имп/мин). Концентрация радикалов $c = 3 \cdot 10^{-7}$ М определена по формуле

$$c = c_0 (\Delta H / \Delta H_0)^2 \cdot I / I_0,$$

где c_a , ΔH_a и I_a — концентрация радикалов, ширина полосы и интенсивность для эталона (спектр 1), а ΔH и I — ширина и интенсивность в опыте (спектр 2, см. рис. 3).

Оценка степени модификации 5'-монофосфатных остатков. Олигонуклеотид рТрТрТ, синтезированный В. В. Самуковым [15], обрабатывали, как указано выше, при концентрации рТрТрТ 20 ОЕ₂₆₀/мл; сразу же после добавления морфолина реакционную смесь разбавляли в 50 раз и часть ее подвергали микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе в 7 М мочеvine при рН 8, как описано в работе [16]. Степень модификации оценивали по соотношению площадей пиков основного вещества и продукта его модификации, имеющего на один отрицательный заряд меньше.

Авторы выражают признательность Ж. М. Беккеру за измерение спектров ЭПР, В. В. Самукову за предоставление рТрТрТ и Г. П. Георгиеву за интерес к работе и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симукова Н. А., Турчинский М. Ф., Шибаев В. Н. (1970) Органическая химия нуклеиновых кислот, с. 531—535, «Химия», М.
2. Фролова Л. Ю., Сандахчиев Л. С., Кнорре Д. Г., Киселев Л. Л. (1964) Докл. АН СССР, 158, 235—238.
3. McCutchan T. F., Gilham P. T., Söll D. (1975) Nucl. Acids Res., 2, 853—854.
4. Gillam I., Blew D., Warrington R. C., von Tigerström M., Tener G. M. (1968) Biochemistry, 7, 3459—3468.
5. Гринева Н. И. (1977) Биохимия, 42, 370—374.
6. Boshkareva E. S., Budker V. G., Girshovich A. S., Knorre D. G., Teplova N. M. (1974) FEBS Lett., 19, 121—124.
7. Lavrik O. I., Khutoryanskaya L. Z. (1974) FEBS Lett., 39, 287—291.
8. Grachev M. A., Rivkin M. I. (1975) Nucl. Acids Res., 2, 1237—1250.
9. Werheyden D. L. M., Wehrli W. E., Moffatt J. G. (1964) J. Amer. Chem. Soc., 86, 1253—1254.
10. Шестаков В. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1964) Вестн. Моск. ун-та. Сер. «Химия», № 4, 81—84.
11. Бабкина Г. Т., Кнорре Д. Г. (1973) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 14, вып. 6, 64—80.
12. Moffatt J. G., Khorana H. G. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 649—650.
13. Бабкина Г. Т., Геачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кнорре Д. Г., Ковригина В. С., (1975) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 7, вып. 3, 128—132.
14. Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Лебедев А. В., Самуков В. В., Шишкин Г. В. (1975) Биоорганическая химия, 1, 793—798.
15. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. (1976) Биоорганическая химия, 2, 179—188.
16. Грачев М. А., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А., Нетесов С. В. (1976) Изв. Сиб. отд. АН СССР. Сер. хим. н., № 2, вып. 1, 117—123.
17. Зарытова В. Ф., Райт В. К., Черникова Т. С. (1977) Биоорганическая химия, 4, 1626—1632.
18. Augusti-Tocco G., Brown G. L. (1965) Nature 206, 683—685.
19. Гиршович А. С., Грачев М. А., Обухова Л. В. (1968) Молекулярная биология, 2, 351—363.
20. Knorre D. G., Budker V. G., Girshovich A. S., Stefanovich L. E. (1968) in: Biochemistry of Ribosomes and Messenger RNA, Internat. Symp., Castle Reinhardtsbrunn, Mai 23—26, 1967, Akad. Verlag, Berlin.
21. Розанцев Э. Г., Коханов Ю. В. (1966) Изв. АН СССР. Сер. хим. н., 1477—1479.
22. Кнорре Д. Г., Шубина Т. Н. (1960) Кинетика и катализ, 1, 519—525.
23. Dausse J.-P., Sentenac A., Fromageot P. (1976) Eur. J. Biochem., 65, 387—393.

Поступила в редакцию
6.II.1978

После переработки
10.VII.1978

**CHEMICAL MODIFICATION OF RNA AT 5'-TERMINAL
TRIPHOSPHATE GROUPS**

GRACHEV M. A., KNORRE V. L. *, KNORRE D. G., NETYOSOV S. V.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry and * Institute
of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

A method has been worked out for selective chemical modification of RNA at 5'-terminal triphosphate groups which involves activation of the latter by water-soluble carbodiimide at weakly acidic pH followed by reaction with amines at weakly alkaline pH.
