



УДК 547.963.32.07

СИНТЕЗ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ СО СПИНОВОЙ МЕТКОЙ *

Женодарова С. М., Клягина В. И.

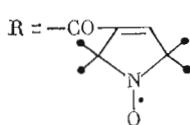
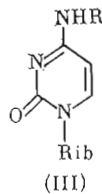
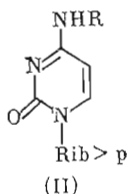
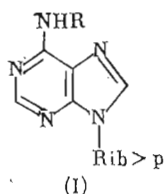
*Институт биологической физики
Академии наук СССР, Пущино*

Поротикова В. А., Жданов Р. И.

*Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям
химических соединений, Кунава Московской обл.*

Показана возможность применения ферментативных методов для получения олигорибонуклеотидов со спиновой меткой в различных положениях. Синтезированы динуклеозидмонофосфаты R^4CpC и CpR^4C . Последний использован для синтеза тринуклеозиддифосфата CpR^4CpU . В качестве спиновой метки применен 2,2,5,5-тетраметил-N-оксил-3-карбопирролин.

Спин-меченые олигонуклеотиды наряду с олигонуклеотидами, несущими флуоресцентную метку [1], необходимы при изучении механизма действия ферментов, катализирующих различные превращения нуклеиновых кислот и их компонентов, а также при изучении структуры и функции нуклеиновых кислот. Синтез олигорибонуклеотидов, содержащих спиновую метку, до сих пор не описан. Мы изучили возможность применения ферментативных методов для получения олигорибонуклеотидов со спиновой меткой в различных положениях. Как субстраты в реакциях, катализируемых рибонуклеазами, предполагалось использовать спин-меченые по экзоциклической аминогруппе 2', 3'-циклофосфаты аденозина (I) и цитидина (II), а также спин-меченый цитидин (III). Для введения спиновой метки в эти соединения был использован хлорангидрид 2,2,5,5-тетраметил-N-оксилпирролин-3-карбоновой кислоты [2].



Rib > p - рибозил-2', 3'-циклофосфат

Rib - рибозил

* Для обозначения спиновой метки - 2,2,5,5-тетраметил-N-оксил-3-карбопирролина использован символ R.

Таблица 1

Состав реакционной смеси при гидролизе $R^6A > p$ (I)
неспецифичными рибонуклеазами, %

Компоненты	РНКаза T_2		РНКаза <i>P. brevicompactum</i>	
	3 ч	24 ч	3 ч	24 ч
R^6Ap	42,0	76,0	—	18,0
$R^6A > p$ (I)	58,0	24,0	100	82,0

Таблица 2

Состав реакционной смеси при гидролизе $R^4C > p$ (II)
панкреатической рибонуклеазой, %

Компоненты	Время гидролиза, ч				
	1	3	5	7	24
R^4Cp	55,0	77,0	85,0	89,0	98,0
$R^4C > p$ (II)	45,0	23,0	15,0	11,0	2,0

При изучении взаимодействия спин-меченого производного аденозин-2', 3'-циклофосфата (I) с неспецифичными рибонуклеазами *P. brevicompactum* и T_2 (см. табл. 1) мы установили, что оба фермента расщепляют модифицированный циклофосфат, однако скорость гидролиза значительно меньше, чем скорость гидролиза немодифицированного $A > p$, расщепляющегося в этих условиях за 24 ч на 90% [3].

Гидролиз циклофосфата (II) панкреатической рибонуклеазой проходит значительно быстрее (см. табл. 2), хотя и в этом случае скорость гидролиза меньше, чем скорость гидролиза немодифицированного $C > p$ [4].

Таким образом, введение спиновой метки в экзоциклическую аминогруппу нуклеозид-2', 3'-циклофосфатов снижает их субстратную активность, но не снимает ее полностью.

Инкубирование циклофосфата (II) и цитидина с панкреатической рибонуклеазой в условиях, оптимальных для синтеза динуклеозидмонофосфатов из немодифицированных субстратов [4], приводит к образованию динуклеозидмонофосфата R^4CpC , но скорость синтеза очень мала: максимальный выход (25 или 64% на израсходованный донор фосфата) был получен через две недели с лишним.

Мы осуществили также синтез динуклеозидмонофосфата, содержащего спиновую метку в 3'-нуклеотиде, используя для этого цитидиновый спин-меченый акцептор фосфата (II) в синтезе с участием гуанилспецифичных рибонуклеаз (табл. 3). Скорость синтеза GpR^4C меньше, чем для GpC , а максимальный выход составил ~33%.

Спин-меченые динуклеозидмонофосфаты выделяли методами препаративной хроматографии и электрофореза на бумаге. Сравнение УФ-спектров этих соединений с УФ-спектрами немодифицированных динуклеозидмонофосфатов указывает на наличие заместителя в гетероциклическом основании. Структура синтезированных динуклеозидмонофосфатов подтверждалась превращением их обработкой 7 M NH₄OH в соответствующие немодифицированные динуклеозидмонофосфаты, а также ферментативным и щелочным гидролизом. Характеристики динуклеозидмонофосфатов, содержащих спиновую метку, приведены в табл. 4.

Полученный GpR^4C был использован далее как праймер для синтеза рибонуклеозиддифосфата с участием полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus*:

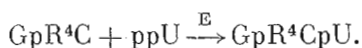


Таблица 3

Состав реакционной смеси при синтезе GpRC, катализируемом гуанидирибонуклеазами, %

Компо- ненты	РНКаза	Время реакции, ч				
		1	2	3	5	24
GpR ⁴ C	T ₁	9,5	11,0	11,9	13,0	12,0
	<i>P. chrysogenum</i>	8,2	11,0	12,0	11,5	13,5
G > p	T ₁	77,0	71,8	68,2	62,2	44,5
	<i>P. chrysogenum</i>	77,8	68,0	70,8	72,2	60,0
Gp	T ₁	13,5	17,0	19,0	25,0	43,5
	<i>P. chrysogenum</i>	14,5	21,2	17,4	16,6	26,5

Таблица 4

Характеристики олигонуклеотидов, содержащих спиновую метку

Олиго- нуклеотид	R _f (система)	УФ-спектр H ₂ O		Ферментативный гидролиз	
		λ _{макс}	λ _{мин}	РНКаза	Соотношение про- дуктов
R ⁴ CpC	0,70(Б)	262 303	241 298	Панкреат.	R ⁴ Cp : C, 1,1 : 1
GpR ⁴ C	0,70(Б)	259 303	238 298	T ₁	Gp : R ⁴ C, 1 : 1
GpR ⁴ CpU	1,55(В) *	259 307	235 298	T ₁	Gp : R ⁴ CpU **, 1,4 : 1

* Определен относительно Ur.

** При гидролизе КОН получено соотношение Cp : U, 1 : 1.

Синтез и разделение реакционной смеси проводили, как описано для немодифицированных субстратов [5]. Реакционная смесь кроме GpRCpU (~15%) содержала небольшое количество GpR⁴CpUrU. Как и в случае синтеза этенового производного GpRCpU [6], модификация 3'-нуклеотида акцептора фосфата уменьшает выход тринуклеозиддифосфата (выход GpRCpU ~52%). Структура полученных олигорибонуклеотидов подтверждалась следующим способом: гидролиз тринуклеозиддифосфата рибонуклеазой T₁ дает смесь, содержащую Gp и R⁴CpU, а расщепление последнего 0,1 н. КОН при 37° С в течение 24 ч приводит к смеси Cp и уридина в отношении 1:1. Аналогично был проанализирован тетра-нуклеозидтрифосфат.

Таким образом, на приведенных выше примерах была показана принципиальная возможность введения спин-меченых нуклеотидных остатков в олигорибонуклеотиды при комплексном использовании нуклеолитических ферментов.

Экспериментальная часть

В работе использовали цитидин и панкреатическую рибонуклеазу фирмы Reanal (Венгрия), гуанозин-2', 3'-циклофосфат (дидициклогексилгуанидиниевую соль), рибонуклеазы T₁ и T₂, а также полинуклеотидфосфориллазу *M. luteus* (Calbiochem, США). Синтез N-(2,2,5,5-тетраметил-N-оксил-3-карбопирролин) производных аденозин-2',3'-циклофосфата, цитидин-2', 3'-циклофосфата и цитидина описан подробно в работе [2].

Неспецифичная рибонуклеаза *P. brevicompactum* и гуанилспецифичная рибонуклеаза *P. chrysogenum* были выделены С. И. Безбородовой и сотр. (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР) [7, 8]. За единицу активности РНКазы *P. brevicompactum* принимали количество фермента, способное расщепить 1 мкмоль $C > p$ за 1 мин при pH 5,2 и 37° С; за единицу активности РНКазы *P. chrysogenum* принимали количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль $G > p$ за 30 мин при pH 7,8 и 37° С. Единицы активности рибонуклеаз T_1 и T_2 определялись по методу Эгамы и др. [9]. Количество вещества выражено в ОЕ, измеренных при максимальном поглощении.

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге Ленинградской фабрики марки «М», предварительно промытой 2 н. HCl, 0,5% раствором динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и водой, а также на бумаге FN-3 фирмы Filtrak (ГДР). При хроматографии использовали следующие системы растворителей: изопропанол — конц. аммиак — вода, 7:1:2 (А); этанол — конц. аммиак — вода, 65:10:25 (Б); этанол — 1 М ацетат аммония, pH 7,5 (7:3) (В).

Электрофорез на бумаге проводили в приборе для вертикального электрофореза фирмы Labor (Венгрия) в течение 2 ч с градиентом напряжения 20 В/см в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония, pH 7,5.

УФ-спектры снимали на регистрирующем спектрофотометре Spesord (ГДР), измерения оптической плотности элюатов проводили на спектрофотометре СФ-26. Для расчетов использовали коэффициенты экстинкций, приведенные в работе [10] для природных нуклеотидов и в работе [2] для N-спин-меченых производных нуклеозидов и нуклеотидов.

Гидролиз $R^4C > p(II)$ и $R^6A > p(I)$. а) Раствор 15 ОЕ $R^4C > p(II)$ инкубировали при 37° С в 0,15 мл 0,035 М трис-HCl-буфера, pH 7,6, содержащего панкреатическую рибонуклеазу в концентрации 1 мг/мл. б) Раствор 12 ОЕ $RA > p$ инкубировали при 37° С в 0,1 мл 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,2, содержащего РНКазу *P. brevicompactum* (1 ед. акт./мл), или в 0,1 мл 0,5 М ацетатного буфера, pH 4,5, содержащего РНКазу T_2 (2,5 ед. акт./мл). Пробы из гидролизатов анализировали с помощью электрофореза на бумаге и УФ-спектрофотометрии. Результаты приведены в табл. 1 и 2.

N^4 -(2,2,5,5-тетраметил-N-оксил-3-карбопирролин)цитидилил-(3' — 5')-цитидин(R^4CpC). Раствор 136 ОЕ (8 мкмоль) $R^4C > p$ и 19,5 мг (80 мкмоль) цитидина в 0,16 мл 0,05 М трис-HCl-буфера, pH 7,6, содержащего панкреатическую рибонуклеазу в концентрации 0,16 мг/мл, инкубировали при ~0° С в течение 20 сут, анализируя пробы реакционной смеси через каждые сутки электрофорезом на бумаге и УФ-спектрофотометрией. Инкубированием такой же смеси в течение 17 сут и последующим разделением электрофорезом на бумаге и дополнительной очисткой хроматографией в системе Б получили ~2,5 мкмоль динуклеозидмонофосфата $RCpC$, характеристики которого приведены в табл. 4.

Гуанилил-(3'—5')- N^4 -(2,2,5,5-тетраметил-N-оксил-3-карбопирролин)цитидин(GpR^4C). а) Раствор 2,75 мг (5 мкмоль) гуанозин-2',3'-дифосфата (дидиклогексилгуанидиниевая соль) и 6 мг (15 мкмоль) спин-меченого соединения (III) в 0,5 мл 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего рибонуклеазу T_1 в концентрации 50 ед. акт./мл, или в 0,5 мл 0,01 М трис-HCl-буфера, pH 7,8, содержащего рибонуклеазу *P. chrysogenum* в концентрации 100 ед. акт./мл, инкубировали 24 ч при ~0° С, анализируя пробы, взятые из реакционной смеси через определенные промежутки времени, с помощью электрофореза на бумаге и УФ-спектрофотометрии. Результаты представлены в табл. 3. б) Раствор 33 мг (60 мкмоль) $G > p$ (дидиклогексилгуанидиниевая соль) и 73 мг (180 мкмоль) R^4C в 6 мл 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,0, содержащего рибонуклеазу T_1 в концентрации 50 ед. акт./мл, инкубировали в течение 5—6 ч при ~0° С. Реакционную смесь делили методом препаративного электрофореза на бумаге; полосы, содержащие динуклеозидмонофосфат ($R, 0,67$), вырезали, пришивали к но-

вым листам бумаги и хроматографировали в системе А. Получили 153 ОЕ (5 мкмоль) GpR^4C , характеристики которого приведены в табл. 4.

Гуанилил-(3'-5')-N¹-(2,2,5,5-тетраметил-N-оксил-3-карбопирролин) цитидилил-(3'-5')-уридин (GpR^4CpU). Раствор 145 ОЕ (5 мкмоль) GpR^4C , 11,2 мг уридин-5'-дифосфата и 3 мг полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus* в 0,5 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, содержащего 0,01 М $MgCl_2$ и 0,05 мМ EDTA (рН 9,0), инкубировали при 37° С, через 2 ч всю реакционную смесь наносили на бумагу и хроматографировали в системе Б. Полосы, соответствующие различным компонентам реакционной смеси, элюировали водой и дополнительно очищали с помощью электрофореза в нейтральном буфере и хроматографии в системе В. Получено 10 ОЕ (0,25 мкмоль) GpR^4CpU и 5 ОЕ (0,13 мкмоль) GpR^4CpUpU . Регенерировано 100 ОЕ GpR^4C . Характеристики полученных олигонуклеотидов приведены в табл. 4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Шибасв В. Н., Кост А. А. (1975) Биоорган. химия, 1, 1345—1351.
2. Zhdanov R. I., Porotikova V. A., Rozantsev E. G. (1979) Synthesis, № 4, 267—269.
3. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1972) Молекулярн. биология, 6, 682—688.
4. Хабарова М. И., Смолянинова О. А., Багдонас А. С., Коваленко М. И., Женодарова С. М. (1978) Биоорган. химия, 4, 740—744.
5. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. (1975) Биоорган. химия, 1, 598—603.
6. Женодарова С. М., Клягина В. П. (1977) Биоорган. химия, 3, 1623—1625.
7. Безбородова С. И., Ильина Т. В., Захарова Н. Г., Крупяк В. И. (1971) Биохимия, 36, 474—482.
8. Безбородова С. И., Грищенко В. М., Маркелова Н. Ю. (1973) Биохимия, 38, 336—343.
9. Uchida T., Egami F. (1967) in Methods in: Enzymology (Grossman L., Moldave K., eds), vol. XII, pp. 228—239.
10. Венкстерн Т. В., Баев А. А. (1967) Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, «Наука», М.

Поступила в редакцию
17.XII.1978

SYNTHESIS OF SPIN-LABELED OLIGORIBONUCLEOTIDES

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., POROTIKOVA V. A.,
ZHDANOV R. I.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino; Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Kupavna*

Adenosine and cytosine 2',3'-cyclic phosphates containing a spin label, 1-oxy-2,2,5,5-tetramethyl-3-carboxypyrroline, may serve as substrates for various ribonucleases both in hydrolysis and synthesis conditions. The applicability of enzymatic methods is demonstrated for preparing the oligoribonucleotides bearing the spin labels in different positions. The dinucleoside monophosphates R^4CpC and GpR^4C are synthesized, the latter being used for preparing trinucleoside diphosphate GpR^4CpU .