

Н. И. ГРИНЕВА, В. Ф. ЗАРЫТОВА, Г. Н. КАБАШЕВА,
член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ, А. Я. КОЗОВОИЦКИЙ

О КОНФОРМАЦИИ 2',3'-О-БЕНЗИЛИДЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Ранее нами было показано, что в бензилиденовых производных нуклеозидов и мононуклеотидов имеется диполь-дипольное взаимодействие между гетероциклическим основанием и ароматическим остатком⁽¹⁾. Такого рода взаимодействия могут существенно изменить конформацию производных олигонуклеотидов, разрушая стэкинг между основаниями, и способность олигонуклеотидов к комплементации с полинуклеотидами. В настоящей работе мы исследовали спектры кругового дихроизма (к.д.) 2',3'-О-4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензилиденовых производных АрА (АрARCl) и АрАрА (АрАрRCl) для оценки конформации этих соединений, поскольку такие производные предполагается применять для модификации нуклеиновых кислот в условиях комплементации.

Необходимые для работы АрА и АрАрА получены щелочным гидролизом полиА («Реанал», Венгрия) с последующим дефосфорилированием щелочной фосфатазой *E. Coli* и разделением на ТЭАЭ-целлюлозе в градиенте триэтиламоний бикарбоната. Степень возможной в этих условиях изомеризации (3' → 5')-олигонуклеотидов в (2' → 5')-изомеры не определяли. Согласно⁽²⁾, превращение олигонуклеотидов в бензилиденовые производные по⁽³⁾ не вызывает заметной изомеризации межинуклеотидной связи. Поэтому сравнение свойств исходных олигонуклеотидов и их производных без учета изомеризации правомерно. рARCl, полученный по⁽⁴⁾, любезно предоставлен А. Г. Веняминовой. 2',3'-О-Этоксиметилиденаденилил-(3' → 5') аденозин, NH₄-соль (АрА > CHOEt) получили из 4μ мол. АрА, триэтиламониевой соли, в 0,2 мл диметилформамида (ДМФ), обрабатывая 0,1 мл ортомуравьиного эфира и 0,04 мл трифторуксусной кислоты при -70° и затем 3 часа при комнатной температуре. АрА > CHOEt выделяли после нейтрализации смеси 0,3 мл триэтиламина (при -70°) хроматографией на бумаге в изопропанол, содержащем 0,5% аммиака (в парах, система А: изопропанол — конц. NH₃ — вода, 7 : 1 : 2); R_f 0,27, элюция водой с pH 8—9. Выход АрА > CHOEt 1,6 μмол. (40%). R_f в системе А 0,61. Гидролиз в 0,01 N HCl при комнатной температуре в течение 30 мин. количественно превращает АрА > CHOEt в АрА (R_f 0,37 в системе А). АрARCl (в системе А R_f 0,68, E₂₆₀^{pH 7} 47,7 · 10³) и АрАрARCl (R_f — 0,51, E₂₆₀^{pH 7} 56,7 · 10³) получали при обработке растворов триэтиламониевых солей олигонуклеотидов в диметилформамиде 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензальдегидом в присутствии 2,2-диметоксипропана и CF₃COOH аналогично⁽⁵⁾. Полученные препараты содержали примесь исходных олигонуклеотидов, количество которых составляло 0,28 и 0,25 молей на моль АрARCl и АрАрARCl соответственно.

Спектры к.д. растворов в 0,1 N фосфатном буфере, pH 7,0, с оптической плотностью при 260 мμ 0,8—0,9 снимали при 30° в односантиметровой кювете на дихрографе модели СД-185 фирмы «Roussel Jouan» (Франция). В полученные спектры вносили поправку на примесь исходных олигонуклеотидов.

Олигонуклеотиды АрА и АрАрА в нейтральной среде находятся в стэкинг-конформации и вследствие этого проявляют сильный двойной эф-

фект Коттона в области длин волн 230—300 м μ (⁶, ⁷). Спектры к.д. бензилиденовых производных резко отличаются от спектров олигонуклеотидов. Для АрARCl и АрАрARCl вместо кривых, соответствующих двойному эффекту Коттона, появляются сложные кривые с отрицательным вращением.

Так как бензилиденовый остаток сам по себе не является оптически активным в ультрафиолетовой области, изменения, происходящие в спектрах, указывают на изменения во взаимодействиях, имеющих место в молекуле. Следует отметить, что образование диоксолапового цикла при рибозе само по себе меняет спектр к.д. АрА (см. спектр АрА > CHOEt на рис. 1А). Наблюдаемое здесь уменьшение силы вращения полос при сохранении положения их максимумов можно объяснить изменением симметрии оптически активного перехода в нуклеотиде в результате изменения торзионного угла или частичным разрушением стэкинга. Причиной этих эффектов, в свою очередь, может являться или изменение конформации рибозы (⁸), или влияние гидрофобного заместителя, или и то и другое вместе. При переходе к бензилиденовому АрА происходит более глубокое изменение спектра. Причиной этого может быть диполь-дипольное взаимодействие бензольного кольца с гетероциклическим основанием, аналогично тому, как это имело

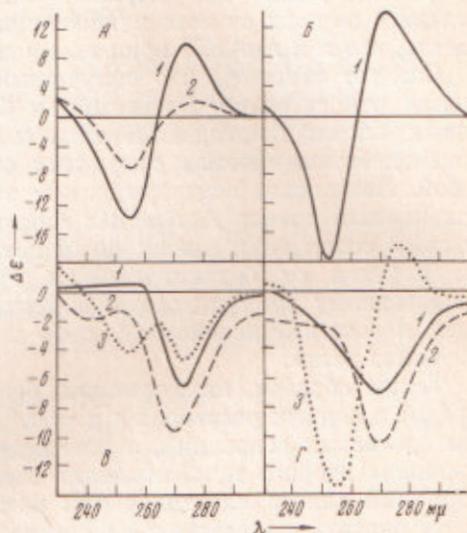


Рис. 1. Спектры кругового дихроизма адениловых олигонуклеотидов и их 2',3'-О-бензилиденовых производных в 0,1 M фосфатном буфере, pH 7, при 30° С. А: 1 — АрА, 2 — АрА > CHOEt. Б: 1 — АрАрА. В: 1 — pARCl, 2 — АрARCl, 3 — АрА > CHOEt + pARCl - A > CH₂CH₃. Г: 1 — АрАрARCl, 2 — Ар + АрARCl, 3 — АрА + pARCl

место в бензилиденовых производных мононуклеотидов (I). Для выяснения вопроса, каким образом это взаимодействие сказывается на стэкинге в олигонуклеотидной части молекулы, можно воспользоваться приближением «парных взаимодействий» (⁹, ¹⁰) и рассчитать спектр молекулы АрARCl как алгебраическую сумму спектров АрА > CHOEt + pARCl — — pA > CHOEt (нами для расчета использовался спектр изопропилиден-аденозина, однако это не вносит существенных изменений). Из сравнения расчетного спектра с истинным спектром АрARCl (рис. 1Б) видно, что последний определяется в основном спектром pARCl и не имеет отрицательного максимума в области 250 м μ , характерного для олигонуклеотидного стэкинга. Из этого можно сделать вывод, что в АрARCl стэкинг между двумя аденинами практически полностью отсутствует.

При рассмотрении спектра к.д. АрАрARCl (рис. 1Г) обращает на себя внимание тот факт, что здесь разрушен стэкинг даже между двумя удаленными от бензилиденового заместителя основаниями. Действительно, если бы этот стэкинг был сохранен, то дихроичный спектр АрАрARCl должен был хотя бы качественно совпадать с алгебраической суммой спектров АрА + pARCl. Однако, как видно из рис. 1Г, такого совпадения нет. Кажется маловероятным, чтобы взаимодействие фенила с соседним от него основанием приводило к разрушению стэкинга между двумя крайними нуклеотидными звеньями, поэтому можно сделать вывод о наличии в молекуле АрАрARCl взаимодействия ароматического кольца со средним нуклеотидным звеном.

Анализ моделей подтверждает, что возможна такая конформация бензилиденовых производных олигонуклеотидов, при которой арил и основание второго нуклеотида расположены параллельно на расстоянии 3—4 Å. На этом расстоянии должно быть довольно сильное диполь-дипольное взаимодействие между фенилом и гетероциклом, а также перекрывание π -электронных орбит их ароматических систем. Более того, такая конформация не является напряженной, в отличие от конформации, необходимой для осуществления взаимодействия ароматического кольца с первым от него нуклеотидным звеном I. Это позволяет предполагать, что и в ArArCl арил взаимодействует со вторым основанием.

Следует отметить, что полученные данные и высказанные предположения относительно конформации бензилиденовых производных адениновых олигонуклеотидов не исключают возможности диполь-дипольных взаимодействий фенила с другими основаниями или оснований между собой. Некоторым подтверждением этому является тот факт, что хотя дихроичный спектр ArArCl близок к сумме спектров $\text{Ar} + \text{ArArCl}$, полного совпадения между ними нет, а его можно было ожидать, если бы переход от бензилиденового производного динуклеозидфосфата к производному тринуклеозиддифосфата не сопровождался либо появлением новых взаимодействий, либо изменением взаимодействий, существовавших ранее.

Таким образом, конформация бензилиденовых производных ArA и ArArA в водных растворах с $\mu = 0,1$ определяется в основном не стэкинг-ом азотистых оснований, а взаимодействием фенильного остатка с основанием второго нуклеотидного звена. Столь сильные изменения конформации олигонуклеотидов при введении бензилиденового заместителя, могут оказать существенное влияние на способность их к комплементарным взаимодействиям и тем самым на алкилирование нуклеиновых кислот этими реагентами в условиях комплементации.

Авторы выражают благодарность В. М. Чернаенко за методическую помощь при получении олигонуклеотидов.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
4 I 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. М. Беликова, Н. И. Гринева и др., ДАН, 195, № 6 (1970). ² Н. И. Гринева, В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре, Изв. СО АН СССР, сер. хим., 1970, 211. ³ В. В. Власов, Н. И. Гринева и др., Мол. биол., 4, 201 (1970). ⁴ А. Г. Веньяминова, Н. И. Гринева, Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук, в. 1 (1971). ⁵ Н. И. Гринева, В. Ф. Зарытова, Д. Г. Кнорре, ЖОХ, 40, 215 (1970). ⁶ M. M. Warshaw, J. Tinoco jr., J. Mol. Biol., 13, 54 (1965). ⁷ Г. Б. Завильгельский, Л. Ли, Мол. биол., 1, 323 (1967). ⁸ D. W. Miles, W. H. Inskeep et al., J. Am. Chem. Soc., 92, 3872 (1970). ⁹ Ch. R. Cantor, J. Tinoco jr., J. Mol. Biol., 13, 65 (1965). ¹⁰ Г. Б. Завильгельский, Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, ДАН, 166, 978 (1966).