

УДК 547.963.32

ХИМИЯ

Л. Г. ГАТИНСКАЯ, В. В. СМЕРНОВ, Н. И. СОКОЛОВА, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИДОВ (ОЛИГОДЕЗОКСИАДЕНИЛАТОВ)

В 1970 г. был предложен химический метод матричного синтеза межнуклеотидной связи с использованием аминокислотных амидов небольших олигомерных блоков ⁽¹⁾. Исходные амиды олигонуклеотидов могут рассматриваться как аналоги фермент-субстратных комплексов, а весь акт образования новой межнуклеотидной связи — как моделирование процесса репарации, осуществляемого ДНК-лигазой. Предложенным методом синтезированы тетра- и гексануклеотиды дезоксиаденозин-3'-фосфата из фенилаланиновых амидов ди- и тринуклеотидов с использованием в качестве матрицы полиуридиловой кислоты ⁽²⁾.

Устойчивость и строение комплементарных комплексов является одним из важнейших факторов, определяющих эффективность матричных реакций при синтезе ДНК-подобных полимеров. Поскольку амиды моно- и олигонуклеотидов имеют в растворе определенную конформацию, отличную от конформации исходных олигомеров ⁽³⁾, очевидно, что их комплексы с поли-У требуют специального исследования.

В настоящем сообщении в развитие предложенного метода исследовано комплементарное комплексобразование ряда амидов 5'-олигодезоксиаде-

Таблица 1

Характеристики амидов олигодезоксиаденилатов

№№ п.п.	Соединение	Выход, %	<i>R_f</i> отн дрА в системах			<i>U</i> отн дрА	Соотношение продуктов гидролиза ФДЭ змеиног ядра RNHдрА:дрА
			$\frac{C_6H_5OH}{CH_3COONH_4}$ (7 : 3)	$\frac{C_6H_5OH}{CH_3COONH_4}$ (6 : 4)	$\frac{1 N C_6H_5OH : NH_3 : H_2O}{(55 : 40 : 5)}$		
I	C ₆ H ₇ HN-(5'-N)-dpApA	93	1,78	—	—	0,69	1 : 1,20
II	C ₄ H ₉ HN-(5'-N)-dpApA	93	2,17	—	—	0,67	1 : 1,10
III	C ₆ H ₅ CH ₂ HN-(5'-N)-dpApA	95	1,89	—	—	0,71	1 : 1,10
IV	PheOMe-(5'-N)-dpApA	72	2,38	—	1,69	0,57	1 : 1,02
V	H ₂ N-(5'-N)-dpApApA	90	0,25	0,42	1,07	0,89	1 : 2,08
VI	CH ₃ HN-(5'-N)-dpApApA	77	—	0,57	1,13	0,85	1 : 2,12
VII	C ₃ H ₇ HN-(5'-N)-dpApApA	78	0,58	0,81	1,23	0,76	1 : 2,10
VIII	ON-(5'-N)-dpApApA	92	—	0,66	0,96	0,84	1 : 2,25
IX	C ₆ H ₁₁ HN-(5'-N)-dpApApA	89	—	1,20	—	0,72	1 : 2,00
X	C ₅ H ₉ CH ₂ HN-(5'-N)-dpApApA	89	0,58	0,81	1,23	0,78	1 : 2,14
XI	C ₆ H ₅ (CH ₂) ₂ HN-(5'-N)-dpApApA	87	—	1,03	—	0,75	1 : 2,05
XII	PheOMe-(5'-N)-dpApApA	63	0,95	1,17	1,28	0,70	1 : 2,08
XIII	Phe-(5'-N)-dpApApA	—	—	0,80	—	0,72	—
XIV	PheOMe-(5'-N)-dpApApApA	54	—	0,44	—	0,91	1 : 2,97

ниловых кислот, отличающихся структурой амидного фрагмента и длиной олигонуклеотидной цепи.

Синтез амидов олигодезоксиаденилатов (соед. I—XI, см. табл. 1) осуществлен активацией концевой фосфатной группы олигонуклеотида через смешанный ангидрид с мезитиленкарбоновой кислотой и последующей реакцией с амином (⁴). Выходы и характеристики полученных соединений приведены в табл. 1. Фенилаланиновые амиды ди-, три- и тетрадезоксидениловых кислот (соед. IV, XII—XIV) получены описанным ранее методом с использованием ДЦК (⁵).

Плавление комплексов и определение их стехиометрии проводили в односантиметровой термостатируемой кювете на спектрофотометре СФ-4А, снабженном логарифмической приставкой к монохроматору. Концентрацию олиго- и полинуклеотидов определяли спектрофотометрически в пересчете на концентрацию оснований. Изучение всех смесей проводили при соотношении А : У = 1 : 2 и суммарной нуклеотидной концентрации $6 \cdot 10^{-5}$ мол/л; использовали 0,004 М фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 0,2 М NaCl и 0,075 М MgCl₂.

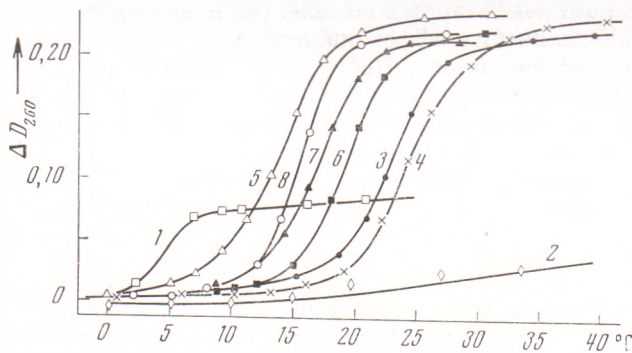


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость ΔD_{260} от температуры для поли-У (1) dpA_3 (2), комплексов $(dpA)_3$: 2поли-У (3), V: 2поли-У (4), IX: 2поли-У (5), X: 2поли-У (6), XI: 2поли-У (7), XII: 2поли-У (8). Концентрация нуклеотидов $6 \cdot 10^{-5}$ М, 0,004 М фосфатный буфер, 0,2 М NaCl, 0,075 М MgCl₂

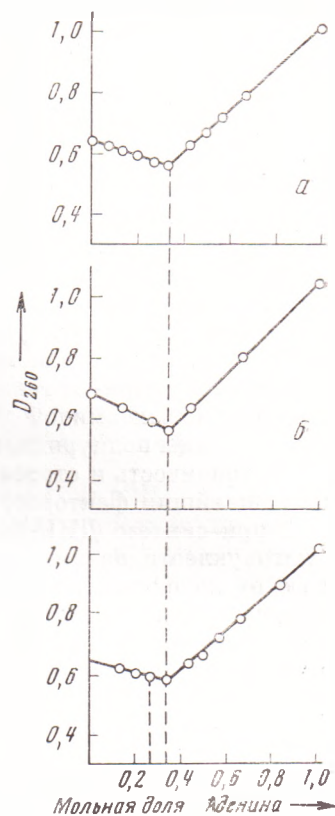


Рис. 2

Рис. 2. Кривые смещения систем: а — $d(pA)_3$ + поли-У, б — VII + поли-У, в — XII + поли-У; условия те же, что в подписи к рис. 1

Так как свойства комплексов в значительной степени зависят от выбранных экспериментальных условий, параллельно с фосфоамидами исследовались комплексы $dpArA$, $dpArArA$ и $dpArArArA$ с поли-У, а также температурная зависимость D_{260} для отдельных компонент.

При плавлении смесей амидов динуклеотидов (соед. I—IV) с поли-У гиперхромные эффекты этих систем аддитивны относительно эффектов компонент, т. е. практически совпадают с эффектом поли-У. Из литературы известно, что при низких температурах поли-У имеет упорядоченную структуру, образуя двойную мономолекулярную спираль с $T_{пл} \approx 5^\circ$ (⁶), которая препятствует комплексообразованию поли-У с короткими олигомерами. Очевидно, амиды динуклеотидов образуют с поли-У в исследуемых условиях чрезвычайно неустойчивые комплексы, а наблюдаемая кооперативность обусловлена плавлением самой поли-У.

При исследовании температурной зависимости D_{260} смесей поли-U с $d(pA)_3$ или амидами $d(pA)_3$ (соед. V—XIII) обнаружена неаддитивность гиперхромных эффектов смесей относительно составляющих компонентов (рис. 1), что говорит об образовании межмолекулярных комплексов. Для определения стехиометрии комплексов были построены кривые смешения для комплексов с незамещенным $d(pA)_3$ (рис. 2а) и некоторыми амидами — VII и XII (рис. 2б, в). Как видно из рис. 2, максимальная гипохромия наблюдается во всех трех комплексах при мольной доле аденина 0,33. Оба амида, как и $d(pA)_3$, очевидно, образуют с поли-U трехспиральные комплексы состава A : 2U. Следовательно, введение амидного радикала не изменяет стехиометрии комплекса и стехиометрия не зависит от структуры амида.

Особый интерес представляет кривая смешения комплекса поли-U и соединения XII. Ранее методом дисперсии оптического вращения изучалась вторичная структура близкого по строению с соединением XII амида IV, в котором было обнаружено межплоскостное взаимодействие ароматического и гетероциклического колец ⁽³⁾. Такое взаимодействие в амиде XII, очевидно, должно способствовать включению амидного радикала в спираль комплекса. Однако положение минимума кривой на рис. 2в показывает, что только адениновые циклы образуют спираль. Если бы фенилаланиновый радикал включался в спираль комплекса с заполнением мест связывания аденина, минимум кривой сдвинулся бы на величину 0,06 влево (находился бы на левой вертикальной пунктирной линии). Такой сдвиг

Таблица 2

Характеристики комплексов поли-U с $d(pA)_3$ и амидами олигодезоксиаденилатов

Олигомерная компонента комплекса	h % (±5%)	T _{пл.} °C (±1°)	Олигомерная компонента комплекса	h % (±5%)	T _{пл.} °C (±1°)	Олигомерная компонента комплекса	h % (±5%)	T _{пл.} °C (±1°)
dpApApA	36	23	VIII	34	21	XII	34	15
V	38	24	IX	—	13	XIII	—	16
VI	—	22	X	34	19	XIV	33	29
VII	36	19	XI	—	16			

больше ошибки опыта в определении мольной доли аденина и был бы замечен при неоднократном проведении эксперимента.

Включение фенилаланинового радикала без заполнения мест связывания путем внедрения фенильного ядра между адениновыми гетероциклами типа интерполяции кажется также маловероятным. Наиболее вероятно, что фенилаланиновый радикал выводится из спирали комплекса в раствор. В пользу этого предположения говорит и близость величины процентной гипохромии (h %) комплексов поли-U с $d(pA)_3$ и с соединением XII. Из табл. 2, на которой приведены $T_{пл}$ и величины h % комплексов различных амидов с поли-U, видно, что различия в h % невелики и лежат в пределах ошибки опыта (± 5 %). Более того, h % комплексов поли-U с амидами V—XIV фактически совпадают с h % системы $d(pA)_3$: 2 поли-U. Следовательно, введение различных по структуре амидных радикалов в олигодезоксиаденилаты при комплексовании их с поли-U слабо нарушает стэкинг — взаимодействие между концевыми основаниями соседних олигомеров. Малые различия в величинах h % для комплексов различных амидов с поли-U дают возможность предположить для всех одинаковую структуру, предложенную для комплекса соединения XII с поли-U, с выведением амидного радикала в раствор.

В отличие от гипохромии $T_{пл}$ комплексов с амидами, как видно из табл. 2, зависят от структуры амида и лежат ниже $T_{пл}$ комплекса $d(pA)_3$: 2 поли-U. Исключением является комплекс соединения V с поли-U, кото-

рый имеет практически ту же $T_{пл}$, что и комплекс, содержащий $d(pA)_3$. Очевидно, введение незамещенной амидной группы практически не влияет на устойчивость комплекса.

При рассмотрении закономерностей дестабилизирующего влияния амидных радикалов на $T_{пл}$ комплексов наиболее общей является следующая:

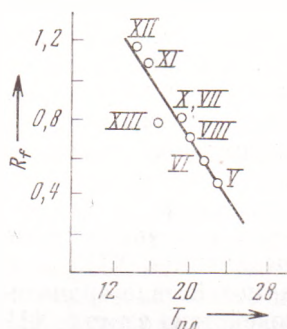


Рис. 3. Зависимость R_f от $d(pA)$ в системе этанол — 1 M ацетат аммония (6:4) амидов $d(pA)_3$ и $T_{пл}$ комплексов тех же амидов с поли-У. Римские цифры — соединения, см. табл. 1

чем гидрофобнее амидный радикал, тем выше его дестабилизирующее влияние. Гидрофобность амидных радикалов определяет различия в коэффициентах распределения (R_f) при бумажной хроматографии амидов олигодезоксинуклеотидов в водно-органических средах. Обнаружена линейная зависимость между величинами R_f амидов олигодезоксиаденилатов в системе этанол — 1 M ацетат аммония (6:4) и $T_{пл}$ комплексов тех же амидов с поли-У (рис. 3). Отклонение от прямой соединения XIII, имеющего карбоксильную группу, можно объяснить появлением дополнительного по сравнению с соединением XII отрицательного заряда, снижающего устойчивость комплекса.

Дестабилизирующее действие амидного радикала убывает по мере роста длины олигомерной цепи. Так, если комплекс соединения XII с поли-У плавится при температуре на 8° ниже, чем комплекс с $d(pA)_3$, то эта разница в случае соединения XIV составляет $5-6^\circ$ (см. табл. 2). Можно предположить, что для достаточно длинных олиго-

дезоксинуклеотидов не будет существенных различий в устойчивости комплексов при замене свободных олигомеров их амидами.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
25 IV 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Z. A. Shabarova, M. A. Prokofiev, FEBs Letters, 11, 237 (1970). ² В. К. Недбай, Н. И. Соколова и др., ДАН, 205, 1114 (1972). ³ Е. С. Громова, Б. В. Тяглов и др., Сборн. тр. научной конф. Межфакульт. лаборатории биоорганической химии МГУ, М., 1970, стр. 11. ⁴ Н. И. Соколова, В. В. Носова и др., ДАН, 206, 129 (1972). ⁵ Н. И. Соколова, Л. Г. Гатинская и др., ДАН, 196, 613 (1971). ⁶ J. C. Thrier, M. Dourlent, M. Leng, J. Mol. Biol., 58, 815 (1971).