

Член-корреспондент АН СССР Д. Г. КНОРРЕ.
Н. В. МЕЛАМЕД, С. Г. ПОПОВ, Г. Г. ШАМОВСКИЙ, Т. Н. ШУБИНА

О НЕРЕГУЛЯРНОЙ ВЗАИМНОЙ ОРИЕНТАЦИИ ОЛИГОМЕРОВ В ТРЕХТЯЖЕВОМ КОМПЛЕКСЕ ТРИДЕЗОКСИАДЕНИЛАТА С ПОЛИУРИДИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Ранее в нашей лаборатории было проведено предварительное исследование конденсации тридезоксиаденилата ($d(pA)_3$) в составе трехтяжевого комплекса с полирибоуридилловой кислотой (поли-U) с помощью водорастворимого карбодиимида (1). При этом было обнаружено, что в условиях стабильности комплекса с суммарным выходом около 35% образуются продукты конденсации, которым предположительно было приписано строение гекса-, нона, и додекадезоксиаденилатов. В дальнейшем при изучении индуцируемой водорастворимым карбодиимидом конденсации дидезокси-гуанилата ($d(pG)_2$) в составе комплексов с полирибозитидиловой кислотой (поли-C) было установлено, что основным продуктом конденсации в данной системе является P^1, P^2 -бис-дезоксигуанилил-3'-5'-гуанозин-5'-пирофосфат. Эти данные послужили основанием для предположения о нерегулярной взаимной ориентации олигомеров в комплексах $d(pG)_2$ с поли-C, которое было подтверждено комплексообразованием бис-дигуанилилпирофосфата с поли-C (2). В связи с этим мы оценили возможность нерегулярной взаимной ориентации олигомеров в комплексе $d(pA)_3 : 2$ (поли-U) с помощью молекулярных моделей (СРК Atomic Models фирмы «Schwarz BioResearch», США). Оказалось, что возможно построение трехтяжевой спирали олиго-dA : 2(поли-U) с антипараллельным расположением соседних олигонуклеотидов при сохранении основных параметров комплекса (поли-dA) : 2(поли-U) (3), таких как антипараллельная взаимная ориентация цепей поли-U, межплоскостные расстояния, диаметр спирали и кофформации всех мононуклеотидных остатков. Естественно, что в комплексе такого строения в результате химической конденсации наряду с 3'-5'-фосфодизфирными связями должны образовываться и 5'-5'-пирофосфатные связи. Поэтому было необходимо провести полную идентификацию основных продуктов конденсации $d(pA)_3$ в комплексе с поли-U, что и явилось главной целью данной работы.

В описываемых экспериментах использовали: $d(pA)_3$ — препарат, синтезированный А. Г. Бадашкеевой и содержащий не менее 85% основного вещества с молярным коэффициентом экстинкции $\epsilon = 12,0 \cdot 10^3$ л/моль·см при 259 нм и 20°; поли-U — препарат, синтезированный В. К. Райтом, с $\epsilon = 9,4 \cdot 10^3$ л/моль·см при 262 нм и 20°; *n*-толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*-β-(4-метилморфолиний)-этилкарбодиимида (ЦМЭ-карбодиимид) с т. пл. 115–116°; имидазол фирмы «Reanal» (Венгрия); QAE-сефадекс А-25 фирмы «Pharmacia» (Швеция); щелочная фосфомоноэстераза из *E. coli* (ВАРФ 3ВВ) фирмы «Worthington Biochemical Corporation» (США); высокоочищенная фосфодиаэстераза из яда гюрзы — препарат, полученный Г. Т. Бабкиной. Концентрацию нуклеотидного материала в растворах определяли спектрофотометрически и представляли так же, как и значения ϵ , в расчете на 1 моль оснований. Микроколоночную ионообменную хроматографию проводили с помощью микроспектрофотометра МСФП-1 по (4). Профили плавления получали как описано в (2). Спектр я.м.р. ^{31}P снят А. В. Лебедевым на спектрометре НХ-90 с фурье-преобразованием на ЭВМ

В-NC 12 фирмы «Брукер-физик АГ» (ФРГ) на частоте 36,43 Мгц без гетеродерного подавления с использованием D₂O в качестве внешнего стандарта для стабилизации резонансных условий. Концентрацию ЦМЭ-карбодиимида определяли как описано в (5).

Конденсацию d(pA)₃ проводили при 0° в реакционной смеси следующего состава: 3,3 мМ d(pA)₃, 6,7 мМ поли-U, 0,05 М 2-(N-морфолинил)-этансульфонат калия, 0,02 М MgSO₄, 0,01 М имидазол, 0,17 М ЦМЭ-карбодиимид; рН 6,5. Изменение состава реакционной смеси по сравнению с использованным ранее (1) — добавление имидазола и увеличение рН до

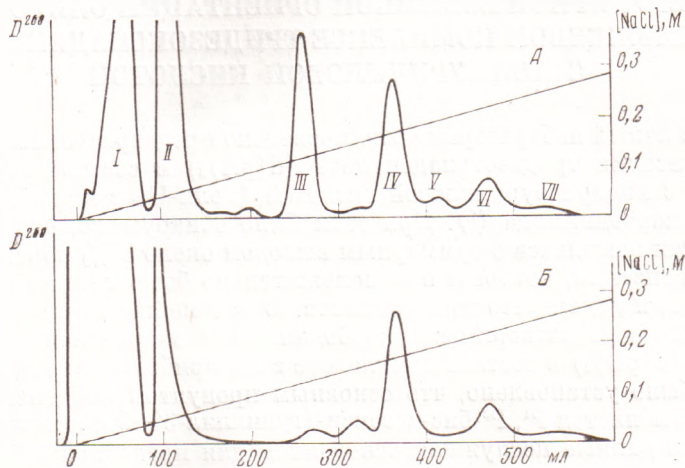


Рис. 1. Профили элюции на ДЭАЭ-целлюлозе щелочного гидролизата реакционной смеси до (А) и после (Б) обработки его фосфомоноэстеразой. Третий пик на профиле Б соответствует недефосфорилируемой примеси в препарате d(pA)₃.

6,5—обусловлено тем, что мы обнаружили существенное возрастание суммарного выхода продуктов конденсации (до 55%) при переходе к таким условиям. После полного израсходования ЦМЭ-карбодиимида (через 20 суток) к смеси добавляли КОН до концентрации 0,2 М и полученный раствор выдерживали при 80° 3 часа для гидролиза поли-U. После нейтрализации и разбавления смеси до концентрации солей 0,02 М проводили микроколоночную хроматографию в системе Томплинсона — Тенера (рис. 1А). Вещества пиков I, II и III по спектрам поглощения и положениям на профиле элюции идентифицированы как *n*-толуолсульфонат натрия, 2'(3')-UMP и непрореагировавший d(pA)₃ соответственно. (Вещества пронумерованных пиков слева и справа от пика III — примеси в исходном препарате d(pA)₃.) Вещества остальных пиков по спектрам поглощения в 7 М мочеvine не отличаются от d(pA)₃ и представляют собой продукты его конденсации. На рис. 1Б приведен хроматографический профиль щелочного гидролизата той же реакционной смеси после обработки его фосфомоноэстеразой в условиях исчерпывающего дефосфорилирования UMP и d(pA)₃. Видно, что единственным из продуктов конденсации, подверженным действию фосфомоноэстеразы, является вещество пика V, которое выходит после такой обработки перед пиком IV. Положения пиков IV, V и VII не изменяются и, следовательно, эти продукты не содержат концевых фосфорильных остатков. Кроме того, из приведенных данных следует, что заряды веществ пиков IV и V различаются на единицу.

Для дальнейшей характеристики основных продуктов конденсации мы провели хроматографическое разделение 32 мл реакционной смеси на QAE-сефадексе (колонка 1,2×50 см; смеситель — 0,9 л 0,01 М трис-HCl в 7 М мочеvine, рН 7,5; резервуар — 0,9 л 0,01 М трис-HCl+0,7 М NaCl в

7 M мочеvine, pH 7,5; скорость элюции 25 мл/час) с последующим обессоливанием по (6). По данным микроколоночной хроматографии чистота полученных продуктов, соответствующих пикам IV и VI (рис. 1A), составляла не менее 95%.

При микроколоночной хроматографии неполных фосфодиэстеразных гидролизатов веществ пиков IV и VI наблюдаются 5 и 8 пиков соответственно, что позволяет приписать этим продуктам величины зарядов -6 и -9 (7). На рис. 2 представлен спектр я.м.р. на ядрах ^{31}P водного раствора вещества пика IV. Видно, что в спектре имеются два сигнала с значе-

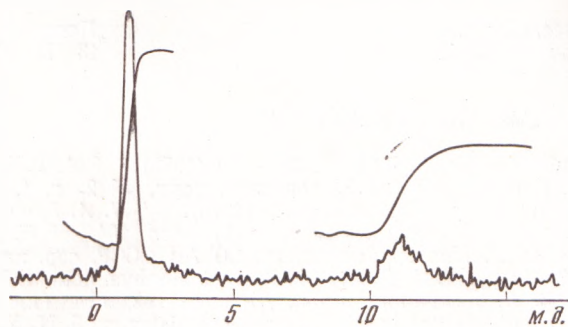


Рис. 2

Рис. 2. Спектр я.м.р. ^{31}P вещества пика IV после 30 000 накоплений интерферограммы и последующего фурье-преобразования. Время накопления одной интерферограммы 0,7-0,8 сек. Диаметр ампулы 10 мм, объем раствора 1,1 мл, концентрация $2,4 \cdot 10^{-2}$ M, температура 28° С. Химические сдвиги приведены относительно 85% H_3PO_4 как внешнего стандарта. Точность интегрирования $\pm 10\%$

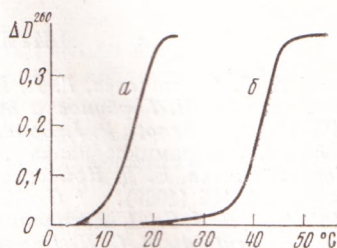


Рис. 3

Рис. 3. Профили плавления 2 : 1 смесей поли-U с $d(\text{pA})_3$ (а) и с ПФ (б) при 260 нм. Растворитель: 0,05 M трис-HCl - 0,02 M MgSO_4 , pH 7,6. Суммарная концентрация нуклеотидного материала 10^{-4} M

ниями химического сдвига 1,2 и 11,1 м.д. и соотношением интенсивностей 2,2 : 1, которые обусловлены резонансом ядер ^{31}P в фосфодиэфирных и пирофосфатных связях соответственно (8). Из этих данных, а также на основании устойчивости этого вещества к действию фосфомоноэстеразы и наличия у него шести зарядов следует однозначный вывод, что основным продуктом конденсации $d(\text{pA})_3$ в комплексе с поли-U является P^1, P^2 -бис-[дезокси-(аденилил-3'-5'-аденилил-3'-5'-аденозин)] - 5 - пирофосфат (в дальнейшем ПФ). Поскольку заряд вещества пика V больше заряда ПФ на единицу и у него есть фосфомоноэфирный остаток, это вещество следует идентифицировать как гексадезоксаденилат. Исходя из величины заряда и устойчивости к действию фосфомоноэстеразы, веществу пика VI можно

приписать строение несимметричного пирофосфата $\text{O} \begin{matrix} \diagup d(\text{pA})_3 \\ \diagdown d(\text{pA})_6 \end{matrix}$. Что каса-

ется ошибочной идентификации основного продукта реакции в предварительном исследовании (1), то она обусловлена, вероятно, недостаточной чистотой использовавшихся для анализа препаратов ферментов.

Таким образом, строение основного продукта конденсации $d(\text{pA})_3$ в составе трехтяжевого комплекса с поли-U свидетельствует в пользу нерегулярной, статистической взаимной ориентации олигомеров в данном комплексе. Дополнительным подтверждением предложенного строения $d(\text{pA})_3 : : 2$ (поли-U) является то, что ПФ взаимодействует с поли-U с образованием стабильного ассоциата (рис. 3), характеризующегося спектрами поглощения и кругового дихроизма, сходными с таковыми комплекса $d(\text{pA})_3 : : 2$ (поли-U). В рамках предположения о нерегулярной взаимной ориентации олигомеров в (олиго-dA) : 2 (поли-U) находит естественное объяснение и низкий выход продуктов конденсации фосфамидов олиго-dA в комп-

лексе с поли-У (⁹), поскольку образование пирофосфатных связей в этом случае невозможно из-за отсутствия свободных фосфомоноэфирных групп.

В заключение следует отметить, что сравнительно высокий выход несимметричного пирофосфата свидетельствует об образовании наряду с 5',5'-пирофосфатными связями и значительного количества 3',5'-фосфодифирных связей. Это позволяет рассчитывать на получение с достаточно высокими выходами олигонуклеотидов нормального строения с помощью ЦМЭ-карбодимида при проведении реакции в комплексах, в которых невозможна антипараллельная взаимная ориентация соседних олигомеров.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Поступило
13 III 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Г. Бадашкева, Г. Н. Кабашева и др., ДАН, т. 206, 670 (1972). ² А. Г. Бадашкева, Н. И. Горбунов и др., Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук, № 2, в. 1, 96 (1974). ³ S. Arnott, P. J. Bond, Nature New Biol., v. 244, 99 (1973). ⁴ М. А. Грачев, В сборн. Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот, «Наука», 1973, стр. 104. ⁵ И. К. Коробейничева, Е. Д. Кривоусова, О. И. Миргородская, Изв. СО АН СССР, сер. хим. наук, в. 1, 115 (1969). ⁶ G. W. Rushizky, H. A. Sober, Biochim. et biophys. acta, v. 55, 216 (1962). ⁷ С. К. Василенко, В. Я. Демушкин и др., ДАН, т. 162, 694 (1965). ⁸ М. М. Crutchfield, C. H. Dungan et al., Topics in Phosphorus Chemistry, v. 5, N. Y. - London - Sydney, 1967. ⁹ В. К. Недебай, Н. И. Соколова и др., ДАН, т. 205, 1114 (1972).