

УДК 547.963.3

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ СИНТЕЗА ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

С. М. Женодарова и М. И. Хабарова

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|------|
| I. Введение | 1265 |
| II. Методы полимеризации | 1266 |
| III. Гомополинуклеотиды | 1270 |
| IV. Гомополинуклеотиды с различными концевыми нуклеотидами | 1273 |
| V. Полинуклеотиды с беспорядочным распределением пуриновых и пиримидиновых оснований вдоль цепи | 1274 |
| VI. Полинуклеотиды с регулярно чередующимися пуриновыми и пиримидиновыми основаниями | 1274 |

I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время вопросы синтеза полинуклеотидов привлекают большое внимание ученых. С помощью ферментов были получены дезоксирибо-¹ и рибополинуклеотиды²⁻⁵, которые характеризуются большим молекулярным весом (от 30 000 до 2 000 000) и беспорядочным распределением пуриновых и пиримидиновых оснований вдоль полинуклеотидной цепи, сыгравшие исключительно важную роль в работах, положивших начало изучению аминокислотного кода^{6,7}. Для ряда исследований требуются полинуклеотиды определенного состава и сравнительно небольшого молекулярного веса^{8,9}. При изучении влияния длины цепи полиуридилевой кислоты на включение фенилаланина в бескеточной дрожжевой системе, было найдено, что полиуридиловая кислота является активной, начиная с нонануклеотида¹⁰. Отмечено резкое повышение включения фенилаланина при переходах от U_8^* к U_9 от U_{11} к U_{12} и от U_{14} к U_{16} (изучали до U_{22}), но для окончательных выводов необходимо проверить полученные данные на чистых образцах полинуклеотидов.

Предварительные опыты с гексауридилевой кислотой, имеющей концевую 3'-фосфатную группу, показали, что в смеси с высокополимерной полиуридилевой кислотой гексануклеотид ~на 30% ингибирует ее активность в отношении синтеза полифенилаланина¹³. Если гексауридиловую кислоту обработать дициклогексилкарбодимидом (ДЦК) в условиях, ведущих к циклизации 3'-монофосфата в 2',3'-циклофосфат, ингибирование не наблюдается. Аналогичный эффект, но с олигоуридиловыми кислотами, имеющими концевую 5'-фосфомоноэфирную группу, наблюдали Джонс и сотрудники¹⁴. Отмечена также зависимость синтеза пептидов лизина от длины цепи полиадениловой кислоты¹⁵.

Гомополинуклеотиды с различными концевыми группами частично использовались в работах по определению специфичности нуклеаз¹⁶⁻¹⁸ и по-прежнему представляют интерес для определения последовательности пуриновых и пиримидиновых оснований в нуклеиновых кислотах и в исследованиях ферментов, синтезирующих нуклеиновые кислоты¹⁹.

* Номенклатура, сокращения и изображения на диаграммах соответствуют общепринятым^{11,12}.

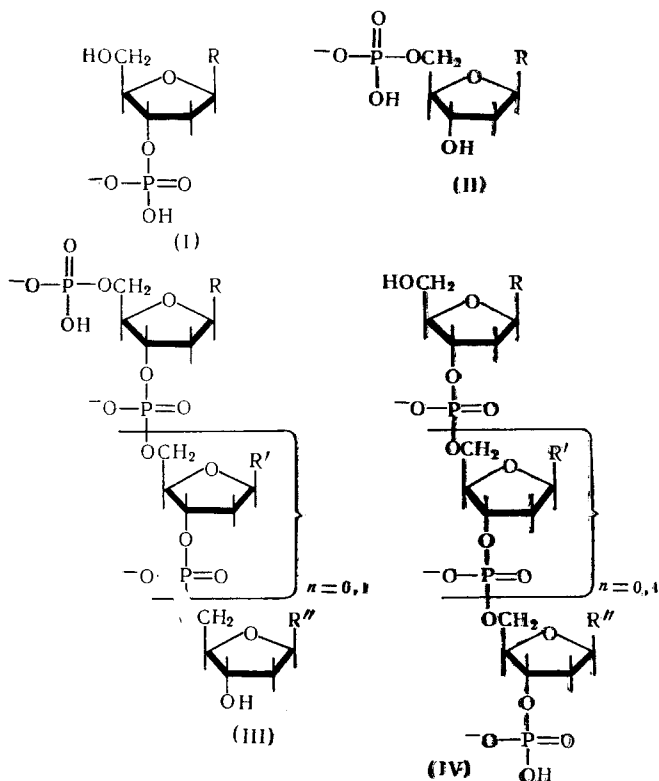
Доступность полинуклеотидов с цепью известных размеров, известного состава и с известными концевыми группами должна облегчить изучение систем, синтезирующих полипептиды, и, по-видимому, указать направление дальнейшей работы по синтезу специфических рибополинуклеотидов, представляющих интерес при изучении аминокислотного кода²⁰. Задачи, связанные с получением таких полинуклеотидов, и должны решать химические методы полинуклеотидного синтеза.

Химические методы синтеза полинуклеотидов развиваются в двух направлениях: 1) ступенчатый синтез олигонуклеотидов и 2) поликонденсация. Ступенчатому синтезу олигонуклеотидов был посвящен недавно специальный обзор²¹. В данном обзоре будут рассматриваться методы синтеза полинуклеотидов путем конденсации* моонуклеотидов или других «мономерных» единиц.

II. МЕТОДЫ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ

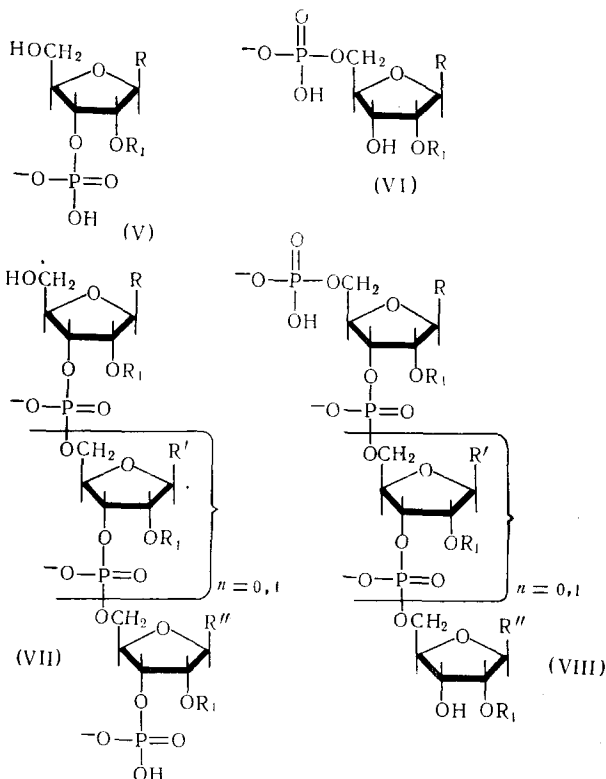
1. Типы «мономеров»

Необходимо особо подчеркнуть, что при разработке методов синтеза полинуклеотидов следует учитывать, что полимерная цепь должна быть образована молекулами сахара (*D*-дезоксирiboзы или *D*-риboзы), соединенными остатками фосфорной кислоты через OH-группу у C_{3'}-атома одной молекулы углевода и OH-группу у C_{5'}-атома другой. В соответствии с этим требованием в качестве «мономеров» для получения полинуклеотидов могут быть использованы производные нуклеотидов следующих типов: а) для ряда дезоксирибополинуклеотидов:



* Обычно в литературе, посвященной вопросам получения полинуклеотидов, этот метод неточно называют полимеризацией; этого названия, как наиболее распространенного, мы и будем придерживаться.

б) Для ряда рибополинуклеотидов:



где R, R', R''=пуриновое или пиримидиновое основание с защищенной аминогруппой для случая аденина, гуанина и цитозина; R₁=ацил или алкил. Из перечисленных типов мономеров для синтеза полинуклеотидов были использованы следующие:

(I) R=тимин²²⁻²⁴.

(II) а) R=тимин^{25, 26}; б) R=N-бензоилладенин²⁷; в) R=N-анизилцитозин²⁸; г) R=N-ацетилгуанин²⁹.

(III) n=0 а) R=N-анизилцитозин, R''=N-ацетилгуанин¹²; б) R=тимин, R''=N-бензоилладенин³⁰; в) R=N-анизилцитозин, R''=тимин³¹.

(V) а) R=N-бензоилладенин, R₁=ацетил³²; б) R=урацил, R₁=ацетил^{13,33}.

Мономер типа (IV) предполагали получить Корана и сотрудники³⁰, но работа в этом направлении пока не развивалась. Мономеры типа (VI) и (VIII) в настоящее время не могут быть получены (пока нет методов, позволяющих избирательно защищать OH-группу у C_{2'}-атома при свободной OH-группе у C_{3'}). Мономеры типа (VII) получить можно, но пока они еще не описаны. Имеется только краткое сообщение³⁴ об использовании в качестве мономера следующих тринуклеотидов: 1) VII, n=1, R=аденин, R'=гуанин, R''=цитозин, R₁=H; 2) VII, n=1, R=аденин, R'=гуанин, R''=урацил, R₁=H.

Кроме перечисленных, в качестве исходных веществ для полимеризации использовали нуклеозид-2',3'-циклофосфаты³⁵, однако мономеры такого типа при полимеризации образуют как C_{3'}-C_{5'}-, так и C_{2'}-C_{5'}-межнуклеотидные связи, поэтому большого интереса не представляют (подробности см. ниже).

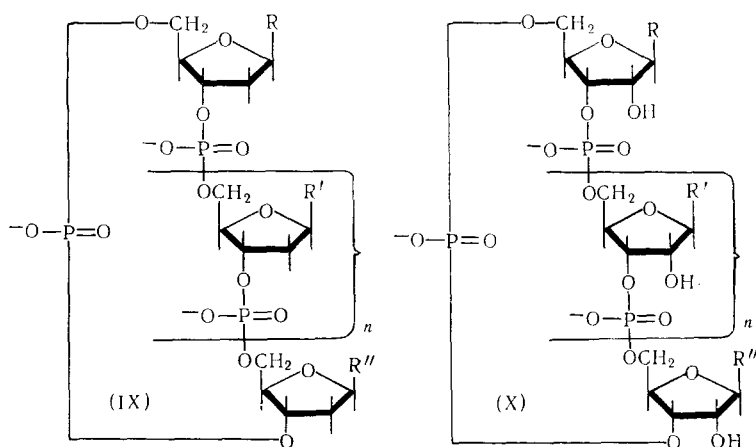
2. Условия полимеризации, выделение и идентификация полинуклеотидов

Полимеризация соответствующих мономеров обычно осуществляется при участии таких активирующих агентов как ДЦК²⁵, *p*-толуолсульфохлорид²⁵, дифенилхлорфосфат³⁶, тетраэтилметафосфат³⁴, енолфосфаты³⁷, полифосфаты³⁸ и т. д. Анализ смесей, получающихся при полимеризации в присутствии перечисленных веществ, показывает, что наиболее подходящим активирующим агентом является ДЦК, так как во всех остальных случаях смесь имеет более сложный состав. Попытка получить более гомогенную реакционную смесь карбодимидным способом, используя диизопропилкарбодимид, не была успешной, так как в присутствии последнего получают полинуклеотиды с несколько меньшей степенью полимеризации¹¹.

Обычно полимеризацию проводят в безводном пиридиновом растворе при комнатной температуре в течение 4—7 дней. Концентрация мономера в реакционной смеси составляет 1 моль/л, концентрация ДЦК — до 2,5 моль/л. Смесь полимеров, как правило, подвергается анализу и разделяется с помощью хроматографии на DEAE- или ЕСТЕОЛА-целлюлозе и хроматографии на бумаге. Длина цепи определяется ферментативным расщеплением соответствующего полинуклеотида до нуклеозид-3'-фосфата и нуклеозида с последующим определением их концентрации методами хроматографии на бумаге и спектрофотометрии, а также сравнением непосредственно с образцами, полученными частичным ферментативным расщеплением соответствующего полинуклеотида высокого молекулярного веса¹³.

Установлено, что реакционная смесь имеет весьма сложный состав: она содержит линейные полинуклеотиды, циклические полинуклеотиды, несимметричные пирофосфаты, нуклеозид-2',3'- или -3',5'-циклофосфаты 5'-С-пиридилий-нуклеозид-3'-фосфаты, а также ряд неидентифицированных побочных продуктов.

Линейные полинуклеотиды (III, $n=0-10$, VII, $n=0-8$) в зависимости от исходного мономера содержат различное число нуклеотидных остатков, но не более 12 (более высокомолекулярные линейные полинуклеотиды присутствуют в реакционной смеси, но они не были идентифицированы).



где R, R', R'' — пуриновое или пиримидиновое основание.

Циклические полинуклеотиды (IX), (X) образуются в больших количествах (до 16—18%) (с увеличением длины цепи их количество

уменьшается), причем в случае пиримидиновых мономеров образуются преимущественно циклические динуклеотиды (IX, X, $n=0$)²⁵, тогда как для пуриновых мономеров характерно образование циклического тринуклеотида (IX, X, $n=1$)^{27,29}. Смешанные мономеры [например, (IIIb)] образуют циклодинуклеотиды¹².

Для подавления образования циклических форм были предприняты попытки найти новые условия для полимеризации²⁶. С этой целью добавляли в полимеризующую смесь производное другого нуклеотида, которое давало бы начало полимерным цепям, не способным к циклизации, использовали более концентрированные растворы, брали мономер в смеси с производным того же нуклеотида, но имеющим свободной только одну фосфатную группу [например: 1) фТ*+фТ-ОАц (3:1)²⁶; 2) (д)-фЦ^{АН} + (д)-фЦ^{АН}-ОАц (3:1)²⁸ и т. д.]. Использование такой смеси для полимеризации особенно желательно в ряду рибонуклеотидов, так как нуклеозид-3'-фосфаты (мономеры типа V) имеют большую тенденцию к образованию внутримолекулярных, 3', 5'-циклофосфатов³⁹, чем нуклеозид-5'-фосфаты, применяемые в качестве мономеров при полимеризации дезоксирибонуклеотидов. Так, добавление 2',5'-О-ди-ацетилюридин-3'-фосфата к 2'-О-ацетилюридин-3'-фосфату должно понижать побочные реакции за счет ускорения образования олигонуклеотидных цепей, имеющих 5'-О-ацетильные концевые группы¹³. Однако эти меры пока не привели к существенному изменению результатов (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1

| Полинуклеотиды | Выход полинуклеотидов **, % | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------------|------------------|---------------------|------------------------|-----------|-------|-------|
| | Н = Т | | | Н = (д)-А ₁ | Н = (д)-Ц | Н = А | Н = У |
| | фТ | полимеризация Тф | | | | | |
| | | ДЦК | трихлор-ацетонитрил | | | | |
| Линейные: | | | | | | | |
| Н*ф | | 0,1 | 6,3 | | | 26,0 | 8,3 |
| НфНф | 5,83 | 0,3 | 4,2 | 18,31 | 10,8 | 20,3 | 8,3 |
| НфНфНф | 9,24 | 3,5 | | 14,20 | 15,0 | 12,0 | 5,5 |
| НфНфНфНф | 8,97 | 3,4 | 5,7 | 12,0 | 11,35 | 7,0 | 4,7 |
| НфНфНфНфНф | 7,8 | 4,0 | | 9,0 | 8,20 | 4,2 | 2,3 |
| Нф(Нф) ₄ Нф | 6,70 | | | 4,95 | 5,33 | | 1,1 |
| Нф(Нф) ₅ Нф | 5,20 | | | 3,09 | 3,14 | | 1,0 |
| Нф(Нф) ₆ Нф | 4,12 | | | 1,5 | 1,84 | | 0,76 |
| Нф(Нф) ₇ Нф | 3,19 | | | | | | 0,08 |
| Нф(Нф) ₈ Нф | 2,57 | | | | | | 0,06 |
| Нф(Нф) ₉ Нф | 2,07 | | | | | | |
| Нф(Нф) ₁₀ Нф | 1,52 | | | | | | |
| Высшие *** | 4,71 | | | | 3,65 | 3,8 | |
| Циклические: | | | | | | | |
| НфНф | 10,0 | 16,5 | 9,5 | | 32 **** | 3,0 | 6,7 |
| НфНфНф | 3,45 | 4,0 | | 8,29 | 2,44 | 7,0 | 5,0 |
| НфНфНфНф | 1,42 | 3,1 | | | 1,05 | | |
| НфНфНфНфНф и неидентифиц. | 1,58 | 3,3 | | | | | |

* Н — остаток нуклеозида.

** Выходы даны на основании данных спектрофотометрии.

*** Идентифицированы.

**** Выход циклодинуклеотида + (д)-фЦ.

Для расщепления пиррофосфатов, также образующихся в ходе полимеризации, реакционная смесь сначала обрабатывается водным пиридином¹³, а затем избытком уксусного ангидрида в сухом пиридине⁴⁰.

* См. примечание на стр. 1265

При расширении числа мономеров выяснилось, что стандартные условия, в которых проводится полимеризация, не всегда приемлемы: в некоторых случаях исходные вещества нерастворимы в пиридине, в других — получающиеся при растворении пиридиниевые соли выпадают в осадок. Чтобы избежать этих трудностей, в качестве среды использовали смесь пиридина и формамида с Дауэкс-50 в пиридиниевой форме²⁹, смесь диметилформамида и пиридина с Дауэкс-50 в пиридиниевой форме¹² или заменяли мономер другой, растворимой формой (например, вместо Тф применяли ТффТ)²².

Линейные полинуклеотиды с небольшой степенью полимеризации (примерно до гекса-) выделяют, как уже отмечалось, с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе в карбонатной или бикарбонатной форме при pH 8—9, элюируя соответствующие фракции триэтиламмонийбикарбонатом. Более высокомолекулярные полинуклеотиды очищают, повторно хроматографируя соответствующие фракции на DEAE-целлюлозе в хлоридной форме и используя в качестве элюента линейный градиент LiCl или LiOCOSCH₃. Однородность полученных полинуклеотидов проверяют ферментативно, а также хроматографией и электрофорезом на бумаге.

III. ГОМОПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

1. Дезоксирибополинуклеотиды

К настоящему времени получены полимеры всех четырех основных дезоксирибонуклеотидов. Наибольшее количество работ было посвящено получению тимидиновых полинуклеотидов. В качестве мономеров использовали **I**, **IIa**, а также ТффТ²². Реагентами, активирующими мономер, служили ДЦК, трихлорацетонитрил²⁴, диэтил- $[\alpha$ -этоксид- β -карб-этоксид]виниловый эфир фосфорной кислоты²³. Лучшие результаты дала полимеризация **IIa** в смеси с фТ—ОАц (3:1) в безводном пиридине в присутствии ДЦК (см. табл. 1).

Полимеризация **IIб** в смеси с (д)-ФА^{Бз}ОБз (3:1) и **IIв** в смеси с (д)-фЦ^{Ац}ОАц (3:1) в стандартных условиях (безводный пиридин, ДЦК, комнатная температура) с последующим отщеплением защитных групп привела к смеси полимеров, самые высокомолекулярные члены которой имели степень полимеризации, равную 8 (высшие члены не были идентифицированы) (см. табл. 1). Использование этого же метода для получения дезоксигуанозиновых полинуклеотидов встретило ряд трудностей²⁹. Мономер (**IIг**) оказался практически нерастворимым в сухом пиридине. Поэтому были получены другие защищенные производные гуанозин-5'-фосфата, содержащие более липофильные группы: N-бензил-, N-нафтил-, и N-ди-*p*-метокситриилдезоксигуанозин-5'-фосфат. Из них последнее соединение достаточно хорошо растворимо в безводном пиридине. Однако полимеризация его в стандартных условиях не дала удовлетворительных результатов: было выделено 55% исходного мономера, 8% динуклеотида и только 12% высших олигонуклеотидов. В других работах также было показано, что размер защитных групп влияет на образование межнуклеотидной связи^{31,41}, поэтому полученные производные не могли быть использованы в качестве мономеров. Была сделана попытка применить для полимеризации соли N-ацетилгуанозин-5'-фосфата и более сильных оснований (три-*n*-дециламин), которые лучше растворимы в пиридине, чем пиридиниевые. Так как применение ДЦК в качестве полимеризующего агента не позволяет использовать такие сильные основания, как триалкиламины^{11, 42}, проводили

полимеризацию указанной соли в присутствии *p*-толуолсульфохлорида. Однако полимеризационная смесь была очень сложной и многие ее компоненты не удалось идентифицировать. Наиболее удачной оказалась попытка провести полимеризацию **IIg** в смеси диметилформамида с пиридином при добавлении пиридиниевой формы Дауэкс-50 для создания той концентрации протонов, которая нужна для проведения реакции в присутствии ДЦК⁴¹. Тем не менее получить дезоксигуанозиновые полинуклеотиды в чистом виде и идентифицировать их обычным способом не удалось, так как при обработке продуктов полимеризации концентрированным аммиаком для отщепления *N*-ацетильных групп были получены полимеры, образующие, по данным ферментативных исследований, агрегаты большого молекулярного веса с упорядоченной вторич-

ТАБЛИЦА 2

| Полинуклеотид | Выход, % |
|---|----------|
| <i>N</i> -ацетилгуанозин-динуклеотид | 15,4 |
| <i>N</i> -ацетилгуанозин-тринуклеотид | 9,4 |
| <i>N</i> -ацетилгуанозин-тетрануклеотид | 5,2 |
| <i>N</i> -ацетилгуанозин-пентануклеотид | 4,9 |
| Высшие | 9,78 |
| Циклотринуклеотид | 26,8 |

ной структурой^{29, 43}. Поэтому в дальнейшем смесь после полимеризации без отщепления защитных групп разделяли на колонке с DEAE-целлюлозой в бикарбонатной форме в условиях, исключавших отщепление *N*-ацетильных групп. Полученные результаты приведены в табл. 2.

2. Рибополинуклеотиды

Получение рибополинуклеотидов представляет более сложную задачу в связи с тем, что соответствующие мономеры менее доступны, а реакционная смесь содержит большее число компонентов.

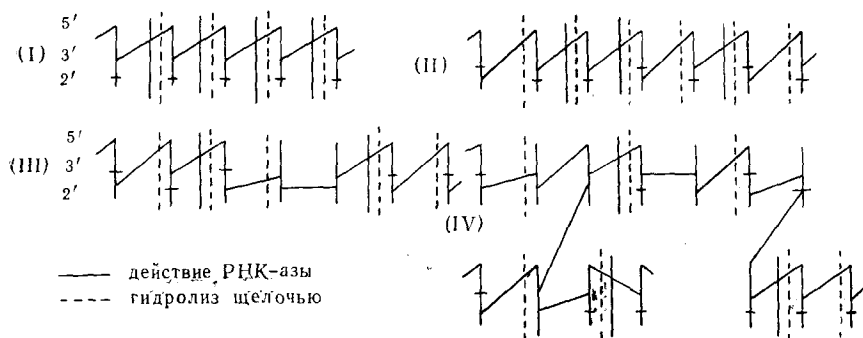
Михельсон⁴⁴ предложил получать рибополинуклеотиды, используя в качестве мономеров рибонуклеозид-2',3'-циклофосфаты. Предварительная работа с глицерол-2 (или 1)-фосфатом показала, что при обработке мономера дифенилхлорфосфатом или тетрафенилпирофосфатом⁴⁵ полиглицерофосфорная кислота легко получается через промежуточную стадию *P*¹-глицерол-2(1)-*P*²-дифенилпирофосфата, быстро превращающегося в глицерол-1,2-циклофосфат. Аналогично обработка аденозин-2'(3')-фосфата дифенилхлорфосфатом дает сначала аденозин-2',3'-циклофосфат⁴⁶, последующая полимеризация которого приводит к полиадениловой кислоте с различной длиной цепи от динуклеотида до полинуклеотидов, содержащих до 15 мономерных единиц.

Метод легко распространяется на синтез полимеров гуанозин-2'(3')-фосфата, уридин-2'(3')-фосфата⁴⁷, псевдоуридин-2'(3')-фосфата³⁵. Подобная полимеризация цитидин-2'(3')-фосфата привела к полимеру, устойчивому к обработке щелочами и диэстеразами и, вероятно, содержащему фосфорамидные связи между 2'-(3')-фосфатными группами и 6-аминогруппой цитозина. Селективное ацетилирование аминогруппы в цитидин-2',3'-циклофосфате и обработка продукта дифенилхлорфосфатом с последующим отщеплением ацетильных групп позволили получить полицитидиловые кислоты с цепями различной длины³⁶.

Дополнительно были получены полимеры из аналогов нуклеотидов, включая *N*-метилуридиловую кислоту, 5-бромуридиловую и 5-иодуриди-

ловую кислоты⁴⁸. Средняя длина цепи полученных этим способом полимеров составляет 10—12 нуклеотидных остатков. Изучение свойств этих полимеров показывает, что они содержат ~50% $C_2'-C_5'$ -межнуклеотидных связей.

Шрамм и сотрудники³⁸ сообщили о получении полиадениловой, полицитидиловой, полигуаниловой, полиуридиловой и политимидиловой кислот с высоким молекулярным весом (от 15 000 до 50 000). Чтобы избежать внутримолекулярную циклизацию, эти авторы рекомендуют применять по возможности самые концентрированные реакционные смеси, смешивая нуклеотиды, подлежащие полимеризации, непосредственно с вязким эфиром полифосфорной кислоты. Однако в работе отсутствуют прямые доказательства того, что образующиеся полинуклеотиды содержат только $C_3'-C_5'$ -связи. В то же время Кочетков и сотрудники⁴⁹ показали, что конденсация нуклеозид-2'(3')-фосфата в указанных условиях теоретически может привести к образованию соединений следующих типов:



Полимеры типа (I) при обработке РНК-азой должны давать только мононуклеотиды, полимеры типа (II) — ди- и олигонуклеотиды. Щелочной гидролиз ведет преимущественно к мононуклеотидам в случае (II) и преимущественно к мононуклеотидам в случае (III). И только в случае (IV) и ферментативный, и щелочной гидролиз приводят к сложной смеси, состоящей главным образом из олигонуклеотидов. Результаты обработки полинуклеотидов, полученных по методу Шрамма, рибонуклеазой и 2*N* КОН говорят о том, что в этих полинуклеотидах преобладают связи ненативного типа.

Корана и сотрудники получили адениновые³² и уридиновые^{13, 33} полинуклеотиды, взяв в качестве мономеров (Va) и (Vb). Смесь Va и N-2',5'-триацетиладенозин-3'-фосфата (3:1) они обрабатывали ДЦК в сухом пиридине по стандартной методике в течение 6 дней и после обычной обработки (расщепление пиродифосфатных связей и удаление защитных групп) разделяли на DEAE-целлюлозе (см. табл. 1). Аналогично была осуществлена полимеризация смеси Vb и 2',5'-О-диацетилуридин-3'-фосфата, причем после повторной хроматографии на DEAE-целлюлозе удалось получить в индивидуальном состоянии полинуклеотиды до декауридиловой кислоты включительно (см. табл. 1). Однако осталось неидентифицировано большое число побочных веществ. Они, вероятно, содержат главным образом два ряда соединений: гомологичные олигонуклеотиды с 2',3'-циклофосфатными концевыми группами и с 3'-фосфатными или 2',3'-циклофосфатными группами на одном и С-5'-пиридиновой группой — на другом конце цепи. Присутствие большого числа побочных продуктов в полимерной смеси подчеркивает дополнительные трудности работы с рибополинуклеотидами.

IV. ГОМОПОЛИНУКЛЕОТИДЫ С РАЗЛИЧНЫМИ КОНЦЕВЫМИ НУКЛЕОТИДАМИ

Корана и сотрудники²⁶ предложили общий метод получения гомополинуклеотидов, имеющих с 3'-конца цепи другой нуклеотид. Метод состоит в добавлении к мономеру (нуклеозид-5'-фосфату) полностью защищенного производного другого нуклеотида. В частности, была подвергнута полимеризации в стандартных условиях смесь тимидин-5'-фосфата и N,O^{3'}-диацетилдезокситидин-5'-фосфата. Полученные результаты приведены в табл. 3.

ТАБЛИЦА 3

| Полинуклеотиды | Выход, % | | |
|---|---------------------------------|---------------------|-----------|
| | хроматография на DEAE-целлюлозе | повт. хроматография | |
| | | гомо- | смешанные |
| фТфТ + (д)-фТфЦ | 13 | 35 | 65 |
| фТфТфТ + (д)-фТфТфЦ | 15,3 | 46 | 54 |
| фТфТфТфТ + (д)-фТфТфТфЦ | 9,8 | 42 | 58 |
| фТ(фТ) ₃ фТ + (д)-фТ(фТ) ₃ фЦ | 8,25 | 41 | 59 |
| фТ(фТ) ₄ фТ + (д)-фТ(фТ) ₄ фЦ | 5,05 | 41 | 59 |
| фТ(фТ) ₅ фТ + (д)-фТ(фТ) ₅ фЦ | 3,52 | 41 | 59 |
| фТ(фТ) ₆ фТ + (д)-фТ(фТ) ₆ фЦ | 2,14 | 41 | 59 |
| фТ(фТ) ₇ фТ + (д)-фТ(фТ) ₇ фЦ | 1,38 | 37 | 63 |

В этой же лаборатории¹² было предложено получать гомополинуклеотиды с отличающимся концевым нуклеотидом, обрабатывая смесь после полимеризации нуклеозид-5'-фосфата соответствующим защищенным нуклеозидом, имеющим свободную 3'-ОН-группу, в присутствии конденсирующего агента. Так, смесь N-анизилдезокситидиновых поли-

ТАБЛИЦА 4

| Полинуклеотиды | Выход, % | Полинуклеотиды | Выход, % |
|--|----------|-----------------|----------|
| (д)-ТфЦ | 28,0 | (д)-фЦфЦфЦфЦфЦ | 4,6 |
| (д)-фТфЦфЦ + цикло-(д)-фЦфЦ | 14,0 | (д)-ТфЦфЦфЦфЦфЦ | 3,3 |
| (д)-фЦфЦ | 6,1 | (д)-фЦфЦфЦфЦфЦ | 4,0 |
| (д)-ТфЦфЦфЦ | 8,7 | (д)-ТфЦфЦфЦ | 2,3 |
| (д)-фЦфЦфЦ + цикло-(д)-фЦфЦфЦ + неидентифиц. | 9,7 | (д)-фЦфЦфЦфЦ | 2,2 |
| (д)-ТфЦфЦфЦфЦ | 7,5 | Высшие | 0,9 |

нуклеотидов сразу после полимеризации обрабатывали избытком 5'-О-диметокситритилтимидина и ДЦК в безводном диметилформамиде. После отщепления защитных групп и хроматографии смеси на DEAE-целлюлозе получили результаты, приведенные в табл. 4. Попытки обрабатывать подобным образом не смесь полимеров, а очищенный олигонуклеотид показали, что лучшие результаты получаются при работе со смесью.

V. ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ С БЕСПОРЯДОЧНЫМ РАСПРЕДЕЛЕНИЕМ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ ВДОЛЬ ЦЕПИ

Полинуклеотиды, состоящие из различных нуклеотидных единиц, с беспорядочным распределением пуриновых и пиримидиновых оснований, были получены Михельсоном⁴⁷ из различных смесей нуклеозид-

2',3'-циклофосфатов. Однако полученные сополимеры не представляют большого интереса, так как наряду с C_3' — C_5' -межнуклеотидными связями содержат $\sim 50\%$ C_2' — C_5' -связей, и поэтому нами подробно не рассматриваются. Наибольшая длина полинуклеотидной цепи, полученная таким способом, не превышает 10—12 нуклеотидных единиц.

ТАБЛИЦА 5

| Реагенты | | | | Условия реакции | | Выход полимера, % | Состав оснований (А/Ц или А/У) |
|-----------|-----------|-----------|----------|-----------------|------|-------------------|--------------------------------|
| АМФ, ммол | УМФ, ммол | ЦМФ, ммол | ПФЭ *, г | °С | часы | | |
| — | 2,5 | — | 24 | 70—80 | 40 | 20—25 | — |
| 0,15 | — | 0,31 | 3,5 | 70—75 | 60 | 12,2 | 1:4,5 |
| 0,23 | — | 0,23 | 3,5 | 70—75 | 60 | 12,5 | 1:3,3 |
| 0,31 | — | 0,15 | 3,5 | 70—75 | 60 | 7,6 | 1:1,4 |
| 0,15 | 0,31 | — | 4,0 | 60 | 30 | 8,9 | 1:1,91 |
| 0,23 | 0,23 | — | 4,0 | 60 | 30 | 5,8 | 1:0,95 |
| 0,31 | 0,15 | — | 4,0 | 60 | 30 | 3,2 | 1:0,58 |

* ПФЭ — эфир полифосфорной кислоты.

Смешанные полинуклеотиды были получены также конденсацией смеси нуклеозид-2' (3')-фосфатов в присутствии эфира полифосфорной кислоты⁴⁹. Данные по соотношению реагентов, условиям реакции, выходам и составу полимеров приведены в табл. 5. Как уже отмечалось выше, в этих полинуклеотидах преобладают связи ненативного характера.

VI. ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ С РЕГУЛЯРНО ЧЕРЕДУЮЩИМИСЯ ПУРИНОВЫМИ И ПИРИМИДИНОВЫМИ ОСНОВАНИЯМИ

К настоящему времени известны всего лишь три работы по получению полинуклеотидов с регулярно чередующимися основаниями. В первой работе по полимеризации динуклеотидов³⁰ мономером служил **IIIб**. Интерес к изучению полинуклеотидов с такой последовательностью стимулировался тем, что в некоторых

ТАБЛИЦА 6

| Полинуклеотиды | Выход, % |
|--------------------------------------|----------|
| Цикло-(д)фТФА | 36,3 |
| (д)фТФА | 22,6 |
| (д)фТФАфТФА | 10,7 |
| (д)фТФАфТФАфТФА | 5,0 |
| (д)фТФАфТФАфТФАфТФА | 2,0 |
| Высшие ($\sim 50\%$ декануклеотида) | 1,1 |

видах крабов нашли ДНК, содержащие преимущественно два этих нуклеотида в чередующейся последовательности⁵⁰⁻⁵². Полимеризацию **IIIб** проводили в присутствии ДЦК в стандартных условиях и после обычной обработки получили результаты, приведенные в табл. 6.

Изучение УФ поглощения (260 $m\mu$) как функции температуры в присутствии 1 М NaCl (рН 7) по-

казало, что полученные полинуклеотиды имеют вторичную структуру. Предварительно установлено, что додекануклеотид и фракция, содержащая высшие нуклеотиды, служат затравками для катализируемого ДНК-полимеразой синтеза больших сополимеров Т-(д)-А.

Полимеризацию **IIIа** осуществляли в смеси диметилформамида, пиридина и пиридиниевой формы Дауэкс-50 в присутствии ДЦК. Полученную смесь после стандартной обработки разделяли на DEAE-целлюлозе в присутствии 7 М мочевины⁵³. Следует отметить, что в обоих слу-

чаях образуется большое количество циклодинуклеотида, а степень полимеризации невысока (табл. 7).

Наконец, недавно появилось краткое сообщение Шрамма и сотрудников³⁴ о полимеризации АфГфЦф и АдГфУф в этиловом эфире тетраметафосфорной кислоты и трис-диметиламинофосфате. Разделение полимеров проводили на Сефадексе G-75. Сведения о составе смеси, степени полимеризации и т. п. в сообщении не приводятся.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что методы химического синтеза полинуклеотидов являются в настоящее время весьма несовершенными и требуют улучшения и дальнейшей разработки. В частности, один из основных недостатков обсуждаемых методов состоит в том, что, несмотря на многочисленные попытки, до сих пор не удалось получить и выделить полинуклеотиды, содержащие более 12 нуклеотидных остатков, а выход наиболее длинных из идентифицированных полинуклеотидов не превышает 1—2%. В связи с этим главные задачи химического синтеза полинуклеотидов состоят в повышении степени полимеризации и выхода полимеров, а также в развитии методов разделения высокомолекулярных олигонуклеотидов. Весьма вероятно, что потребуются более внимательное изучение кинетики и термодинамики реакции поликонденсации, подбор новых конденсирующих агентов, введение в «мономер» более активных групп, участвующих в реакции. Новый подход к химическому синтезу полинуклеотидов должен сделать доступными полинуклеотиды с заданной последовательностью пуриновых и пиримидиновых оснований в полинуклеотидной цепи, что, как известно, невозможно в случае ферментативного синтеза полинуклеотидов. Это позволит решать на молекулярном уровне вопросы, связанные со структурой и функциями нуклеиновых кислот, механизмом синтеза белка и т. п.

ТАБЛИЦА 7

| Полинуклеотиды | Выход, % |
|---|----------|
| (д)-фЦфГ | 23,2 |
| Цикло-(д)-фЦфГ | 16,8 |
| (д)- $\left(\begin{smallmatrix} \text{фЦфГ} \\ \text{О} \end{smallmatrix}\right)$ | 18,0 |
| (д)-фЦфГфЦфГ | 8,75 |
| (д)- $\left(\begin{smallmatrix} \text{фЦфГ} \\ \text{О} \end{smallmatrix}\right)$ | 3,43 |
| (д)-фЦфГфЦфГфЦфГ + высшие + + пирофосфаты | 8,75 |

ЛИТЕРАТУРА *

1. M. J. Bessman, J. R. Lehman, E. S. Simms, A. Kornberg, J. Biol. Chem., **233**, 171 (1958).
2. M. Grunberg-Manago P. J. Ortiz, S. Ochoa, Biochim. Biophys. Acta, **20**, 269, (1965).
3. U. L. Littauer, A. Kornberg, J. Biol. Chem., **226**, 1047 (1957).
4. R. F. Beers, Biochem. J., **66**, 686 (1957).
5. B. E. Griffin, A. R. Todd, A. Rich, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **44**, 1123 (1958).
6. M. W. Nirenberg, J. H. Matthaei, Там же, **47**, 1958 (1961).
7. P. Leuquel, J. E. Speyer, S. Ochoa, Там же, **47**, 1936 (1961).
8. H. G. Khorana, J. Cell. Comp. Physiol., **54**, Suppl. 1, 5 (1959).
9. A. Rich, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **46**, 1044 (1960).
10. S. Marcus, R. K. Bretthauer, R. M. Bock, H. O. Halvorson, Там же, **50**, 782 (1963).
11. Г. Корана, Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты, М., «Мир», 1964.
12. H. Schaller, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3841 (1963).
13. C. Coutsoyorgopoulos, H. G. Khorana, Там же, **86**, 2926 (1964).
14. O. W. Jones, E. Townsend, H. A. Sober, L. Heppel, Biochemistry, **3**, 238 (1964).

* После сдачи настоящего обзора в редакцию были опубликованы работы^{54—55}.

15. J. D. Smith, *J. Molec. Biol.*, **8**, 772 (1964).
16. W. E. Razzel, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2114 (1959).
17. R. K. Ralph, R. A. Smith, H. G. Khorana, *Biochemistry*, **1**, 131 (1962).
18. W. Tiers, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2789 (1963).
19. A. Falaschi, J. Adler, H. G. Khorana, Там же, **238**, 3080 (1963).
20. F. H. C. Crick, *Progress in Nucleic Acid Research*, N. Y., 1963, vol. 1.
21. С. М. Женодарова, *Усп. химии*, **34**, 82 (1965).
22. A. F. Turner, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4651 (1959).
23. F. Cramer, R. Wittmann, *Angew. Chem.*, **72**, 628 (1960).
24. F. Cramer, H. J. Baldauf, H. Kuntzel, Там же, **74**, 77 (1962).
25. H. G. Khorana, G. M. Tener, R. Markham, E. H. Pol, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6223 (1958).
26. H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi, Там же, **83**, 675 (1961).
27. R. K. Ralph, H. G. Khorana, Там же, **83**, 2926 (1961).
28. H. G. Khorana, A. F. Turner, J. P. Vizsolyi, Там же, **83**, 686 (1961).
29. R. K. Ralph, W. Y. Connors, H. Schaller, H. G. Khorana, Там же, **85**, 1983 (1963).
30. G. Weimann, H. Schaller, H. G. Khorana, Там же, **85**, 3855 (1963).
31. H. Schaller, H. G. Khorana, Там же, **85**, 3828 (1963).
32. Y. Lapidot, H. G. Khorana, Там же, **85**, 3857 (1963).
33. D. H. Rammner, Y. Lapidot, H. G. Khorana, Там же, **85**, 1989 (1963).
34. J. H. Matthaei, H. Kleinkauf, G. Schramm, *Angew. Chem.*, **76**, 717 (1964).
35. A. M. Michelson, *The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, Academic Press, 1963, p. 418.
36. A. M. Michelson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 3655.
37. F. Cramer, *Angew. Chem.*, **73**, 49 (1961).
38. G. Schramm, H. Grötsch, W. Pollman, Там же, **74**, 53 (1962).
39. M. Smith, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1141 (1958).
40. H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi, Там же, **81**, 4660 (1959).
41. G. Weimann, H. G. Khorana, Там же, **84**, 4329 (1962).
42. M. Smith, J. G. Moffat, H. G. Khorana, Там же, **80**, 6204 (1958).
43. R. K. Ralph, W. J. Connors, H. G. Khorana, Там же, **84**, 2265 (1962).
44. A. M. Michelson, *Nature*, **181**, 303 (1958).
45. A. M. Michelson, *Chem. a. Ind.*, **1958**, 1147.
46. A. M. Michelson, Там же, **1958**, 70.
47. A. M. Michelson, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 1371.
48. R. Letters, A. M. Michelson, Там же, **1962**, 71.
49. N. K. Kochetkov, E. I. Budowsky, V. D. Domkin, N. N. Khromov-Borissov, *Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 145 (1964).
50. N. Suoka, T. Y. Cheng, *J. Mol. Biol.*, **4**, 161 (1962).
51. N. Suoka, T. Y. Cheng, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **48**, 1851 (1962).
52. M. Smith, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 67 (1963).
53. G. M. Tener, N. Tomlinson, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 2644 (1962).
54. S. Nishimura, T. M. Jacob, H. G. Khorana, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **52**, 1494 (1964).
55. H. G. Khorana, T. M. Jacob, M. W. Moon, S. A. Narang, E. Ohtsuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2954 (1965).
56. E. Ohtsuka, M. W. Moon, H. G. Khorana, Там же, **87**, 2956 (1965).

Институт биофизики
АН СССР, Москва