

## IDENTIFICATION OF SEQUENCES HOMOLOGOUS TO THE MOBILE ELEMENT OF MAIZE IN THE NUCLEAR AND CHLOROPLAST GENOMES OF COTTON

[A. S. Sadykov], R. S. Mukhamedov, V. M. Tuneyev, R. Z. Gizatullin, A. A. Abdugarimov

Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

### Summary

Sequences homologous to the mobile genetic maize element Ds-6233 in nuclear and chloroplast genomes of different species and cultivars of cotton are identified by blot-hybridization. The pattern of hybridization is different in various cultivars and species.

1. Flavell R. B. Repeated sequences and genome architecture // Structure and function plant genomes.— New York: Acad. press, 1984.— P. 14.
2. Freeling M. Plant transposable elements and insertion sequences // Ann. Rev. Plant Physiol.— 1984.— 35.— P. 277—298.
3. Doring H. P., Starlinger B. P. Barbara McClintock's controlling elements. Now at the DNA level // Cell.— 1984.— 39, N 2.— P. 253—259.
4. Fedoroff N. Controlling elements in maize // Mobile genetic elements / Ed. Y. A. Shapiro.— New York: Acad. press, 1983.— P. 1—63.
5. Bonas U., Sommer H., Saedler H. The 17 kb *Mam1* element of *Antirrhinum majus* induced a 3 bp duplication upon integration into the chalcone synthase gene // EMBO J.— 1984.— 3, N 5.— P. 1015—1019.
6. Vodkin L. O., Rhodes P. R., Goldberg R. B. cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element // Cell.— 1983.— 34, N 15.— P. 1023—1031.
7. Садыков А. С., Мухамедов Р. С., Абдукаримов А. А. Анализ повторяющихся последовательностей ядерных ДНК различных видов хлопчатника // Новые направления биотехнологии: Тез. Всесоюз. конф.— Пушкино, 1984.— С. 76.
8. Ананьев Е. В., Чернышев А. И., Головкин М. В. Молекулярная организация последовательностей ДНК генома ячменя, родственных «Активатор»-элементу кукурузы // V Биохим. съезд: Тез. докл. (январь, Киев).— М.: Наука, 1986.— С. 115.
9. Doring H. P., Tillman E., Starlinger P. DNA sequences of the maize transposable element dissociation // Nature.— 1984.— 307, N 5947.— P. 127—130.
10. Ellis J. Mobile genes of chloroplasts and the promiscuity of DNA // Ibid.— 1983.— 304, N 5941.— P. 308—309.
11. Tewari K. K., William S. G. Chloroplast DNA from tobacco leaves // Science.— 1966.— 153, N 3741.— P. 1269—1271.
12. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis // Anal. Biochem.— 1983.— 135, N 1.— P. 237—251.
13. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I / P. W. J. Rigby, M. Dieckmann, C. Rhodes, P. Berg // J. Mol. Biol.— 1977.— 113, N 1.— P. 237—251.
14. McClintock B. The control of gene action in maize // Brookhaven Symp. Biol.— 1963.— 18.— P. 162—184.

Ин-т биоорг. химии АН УзССР, Ташкент

Получено 24.03.87

УДК 517.963.32:466.057

## СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДИЛ-(5'→N)-ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ АРГИНИН

В. Ф. Зарытова, Е. М. Иванова, С. Н. Ярмолюк, И. В. Алексеева

Для изучения структуры и свойств ковалентносвязанных нуклеиново-белковых комплексов широко используются модельные системы — нуклеотидил-(5'→N)-пептиды [1]. В связи с этим постоянно идет поиск и совершенствование методов их получения. Сложность в данном случае обусловлена многообразием функциональных групп пептидов и олигонуклеотидов. Существующие методы конденсации нуклеотида и пептида (аминокислоты) с помощью карбонимидов, карбонилдиимдазола, пирофосфатов и фосфитов нуклеозидов подробно рассмотрены в монографии [1] и обзоре [2].

Лучшим из них признан способ с применением дициклогексилкарбонимида (DCC) [1, 2]. Однако в случае образования олигонуклеотидил-(5'→N)-пептида время реакции составляет 72 ч, а выход целевого продукта не превышает 60 % [3].

В данной работе предложен и осуществлен простой способ конденсации незащищенного олигонуклеотида и пептида, содержащего аргинин.

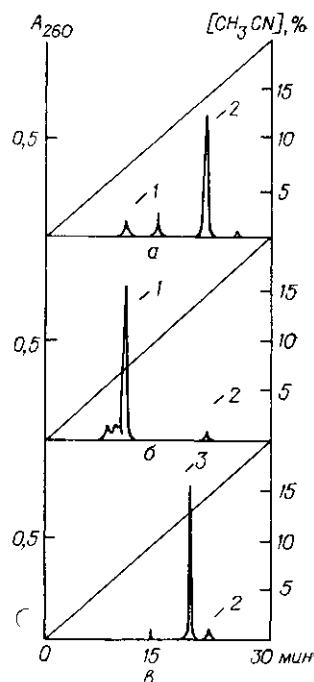
В качестве олигодезоксинуклеотида использован  $d(pC)_4$ .

Синтез трипептида  $H-Pro-Arg-Val-O-Me$  осуществлен из L-аминокислот следующим образом. Дипептид  $Woc-Pro-Arg-OH$  был получен при взаимодействии  $Woc-Pro-ONSu$  и свободного аргинина [4]. Трипептид синтезирован из дипептида  $Woc-Pro-Arg-OH$  и  $Val-O-Me \cdot HCl$  при помощи DCC с добавкой N-оксисукцинимид и выделен с применением высокоэффективной обращеннофазовой хроматографии (ОФХ). Удаление  $Woc$ -группы с N-концевой аминокислоты проводили обработкой трифторуксусной кислотой (TFA) [5]. Аминокислотный состав синтезированного соединения, определенный при помощи аминокислотного анализатора Т-339 (ЧССР), следующий:  $Pro:Arg:Val = 1,00:1,07:1,05$ .

Для конденсации олигодезоксинуклеотида и пептида мы использовали предварительную селективную активацию концевой фосфатной группы олигодезоксинуклеотида с помощью смеси трифенилфосфина ( $Ph_3P$ )

Профили ОФХ:  $a$  — реакционной смеси, полученной в результате синтеза олигонуклеотидил-( $5' \rightarrow N$ )-пептида;  $b$  — смеси, полученной в результате его кислотного и  $\sigma$  — щелочного гидролиз ( $1 - pdCCCC$ ;  $2 - d(CCCC)-5'-P-Pro-Arg-Val-O-Me$ ;  $3 - d(CCCC)-5'-P-Pro-Arg-Val$ ). Элюцию проводили линейным градиентом концентрации ацетонитрила (0–20 %) в 0,05 М перхлорате лития на колонке Lichrosorb RP-18 ( $6 \times 250$  мм, 5 мкм). Скорость элюции 2 мл/мин

HPLC profiles:  $a$  — reaction mixture obtained from synthesis of oligodeoxynucleotide-( $5' \rightarrow N$ )-peptide;  $b$  — mixtures obtained from its acid and  $\sigma$  — alkaline hydrolysis ( $1 - pdCCCC$ ,  $2 - d(CCCC)-5'-P-Pro-Arg-Val-O-Me$ ;  $3 - d(CCCC)-5'-P-Pro-Arg-Val$ ). Elution was performed by the linear gradient of acetonitrile concentration (0–20 %) in 0.05 M lithium perchlorate on a column Lichrosorb RP-18 ( $6 \times 250$  mm, 5  $\mu$ m). The flow rate — 2 ml/min

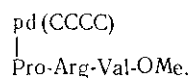


и 2,2-дипиридилдисульфида ( $Pu_2S_2$ ) в присутствии N-метилимидазола (Melm). Как было показано ранее [6], в этом случае образуется N-метилимидазолил-5'-олигодезоксинуклеотид, способный быстро взаимодействовать с аминами в широком диапазоне  $pK_a$ , причем с ростом  $pK_a$  амина скорость образования фосфамида возрастает.

Наиболее основным в синтезированном трипептиде является остаток аргинина. Чтобы исключить его участие в реакции с N-метилимидазолидом олигодезоксинуклеотида, он был протонирован с помощью TFA.

Возможность образования фосфамидной связи между олигодезоксинуклеотидом и пептидом была исследована методом  $^{31}P$ -ЯМР на примере взаимодействия  $pT(Ac)$  и синтезированного трипептида. К раствору мононуклеотида  $pT(Ac)$  (0,1 М) в 1 мл диметилсульфоксида, активированному  $Pu_2S_2$  (0,3 М),  $Ph_3P$  (0,3 М), Melm (0,3 М), через 15 мин прибавляли трипептид  $H-Pro-Arg-Val-O-Me \cdot 2TFA$  (0,2 М) и триэтиламин (TEA) (0,2 М). В спектре реакционной смеси, записанном через 30 мин, отсутствовал сигнал исходного мононуклеотида (–0,2 м. д.) и был зарегистрирован сигнал с химическим сдвигом 5,14 м. д., характерный для фосфамидов [7].

Возможность использования этого подхода для синтеза олигонуклеотидил-( $5' \rightarrow N$ )-пептидов продемонстрирована на примере синтеза



В 75 мкл абсолютного диметилсульфоксида растворяли последовательно 20 мг  $OE_{260}$  цетавлоновой соли  $pd(CCCC)$ , 5 мг Melm, 5 мг  $Pu_2S_2$  и 6 мг  $Ph_3P$ . Через 15 мин к полученному активному производному  $d(pC)_4$  прибавляли 7,35 мг (0,12 ммоль)  $H-Pro-Arg-Val-O-Me \cdot 2TFA$  и 3 мкл (0,2 ммоль) TEA в 25 мкл диметилформамида. Нуклеотидный материал через 15 мин осаждали из реакционной смеси раствором перхлора-

та лития в ацетоне [8]. Продукт реакции был выделен методом ОФХ с выходом 85 % (рисунок, а). Увеличение времени выхода с колонки целевого продукта при хроматографии по сравнению с временем выхода исходного олигодезоксирибонуклеотида свидетельствовало о включении гидрофобного фрагмента в структуру исходного соединения.

Обработка выделенного соединения 5,7 н. HCl при 110 °С в течение 24 ч и последующий анализ реакционной смеси дали следующие результаты: основание : Pro : Arg : Val = 4,00 : 0,75 : 1,01 : 1,08. Наличие в продукте, приведенном для примера, свободного (невовлеченного в образование P—N-связи) остатка аргинина подтверждено калориметрически по [9].

В присоединении к олигодезоксирибонуклеотиду пептидного остатка свидетельствовал также кислый (0,1 М HCl, 14 ч [10]) и щелочной (TEA : вода : пиридин, 5 : 3 : 2, 14 ч [10]) гидролизы полученного соединения. Проведение кислотного гидролиза продукта в условиях расщепления фосфамидной связи привело к образованию олигодезоксирибонуклеотида (рисунок, б). Следствием деблокирования карбоксильной группы валлина олигодезоксирибонуклеотидил-(5'→N)-пептида в условиях щелочного гидролиза было уменьшение времени выхода нуклеотидного материала с колонки при ОФХ (рисунок, в).

Приведенные выше данные свидетельствуют, что предложенным методом можно быстро и с достаточно высоким выходом получать олигодезоксирибонуклеотидил-(5'→N)-пептиды, в том числе содержащие аргинин.

Авторы выражают благодарность И. В. Кутявину за предоставленный олигодезоксирибонуклеотид и С. А. Поярковой за рекомендации при синтезе пептида.

#### SYNTHESIS OF ARGININE-CONTAINING OLIGONUCLEOTIDE-(5'→N)-PEPTIDES

V. F. Zarytova, E. M. Ivanova, S. N. Yarmolyuk, I. V. Alekseeva

Institute of Bioorganic Chemistry,  
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk  
Institute of Molecular Biology and Genetics,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

A new method for synthesis of oligonucleotide-peptides of phosphoamide type with the use of a mixture of triphenylphosphine, dipyridyldisulphide and N-methylimidazole is suggested. This approach was applied for synthesizing and isolating d(CCCC)-5'-P-Pro-Arg-Val-OMe.

1. Юодка Б. А. Ковалентные нуклеиново-белковые структуры и их химическое моделирование.— Вильнюс: Мокслас, 1985.—176 с.
2. Юодка Б. А. Синтез и применение нуклеотидопептидов фосфоэфирного и фосфоамидного типов // Биоорг. химия.— 1984.—10, № 2.— С. 149—169.
3. Синтез фенилаланинового амида пентадезоксинуклеотида / В. Д. Смирнов, М. Г. Ивановская, Е. В. Ильина и др. // Докл. АН СССР.— 1972.—206, № 5.— С. 1133—1136.
4. Синтез тафцина и ряда N<sup>ε</sup>-лизинзамещенных пептидов как модельных соединений для исследования ферментативного гидролиза модифицированных белков / С. М. Андреев, О. М. Галкин, С. В. Рогожин и др. // Биоорг. химия.— 1986.—12, № 6.— С. 725—731.
5. Синтез и исследование циклических и линейных аналогов нейротензина / И. В. Гринштейн, Н. В. Мышлякова, Р. Э. Вегнер и др. // Там же.— 1985.—11, № 12.— С. 1589—1597.
6. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Реакционноспособные фосфамиды моно- и динуклеотидов // Там же.— 1986.—12, № 4.— С. 475—481.
7. Лебедев А. В., Резвухин А. И. Закономерности изменений химических сдвигов ядер фосфора в спектрах <sup>31</sup>P-ЯМР производных нуклеотидов // Там же.— 1983.—9, № 2.— С. 149—185.
8. Барам Г. И., Грачев С. А. Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов // Там же.— 1985.—11, № 10.— С. 1420—1422.
9. Functional non-identity of creatine kinase subunits rabbit skeletal muscle / G. A. Nevinsky, V. N. Ankilova, O. I. Lavrik et al. // FEBS Lett.— 1982.—149, N 1.— P. 36—40.
10. Готтих М. Б., Ивановская М. Г., Шабарова З. А. Получение фосфамидов моно- и олигонуклеотидов в водной среде // Биоорг. химия.— 1983.—9, № 8.— С. 1063—1067.

Ин-т биоорг. химии Сиб. отд-ния АН СССР, Новосибирск  
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 04.06.87