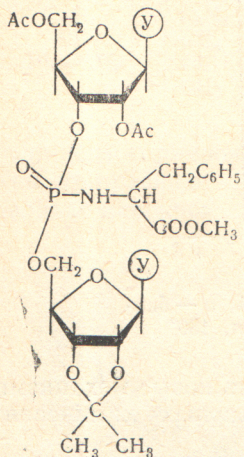


О. Е. ВОРОБЬЕВ, З. А. ШАБАРОВА,
Член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

ДИНУКЛЕОЗИДФОСФО-(P → N)-АМИНОКИСЛОТЫ.
ГИДРОЛИЗ ДИУРИДИНФОСФО-(P_M → N)-ФЕНИЛАЛАНИНА

Нами был разработан удобный метод синтеза аминокислотных производных динуклеозидофосфатов (1), имеющих фосфоамидную связь между аминокислотой и межнуклеотидным атомом фосфора. Сведения, полученные при изучении поведения этих соединений при гидролизе, должны быть очень полезны для выяснения строения природных нуклеотидопептидов.

В настоящем сообщении рассматривается механизм гидролиза аминокислотного производного дирибонуклеозидфосфата — метилового эфира 2',5'-ди-О-ацетил-уридил-ил-(3' → 5')-2' : 3'-О-изопротилиденуридино-(P → N)-фенилаланина (I).



1, У = урацил
Ac = CH₃CO—

На основании данных по гидролизу рибонуклеоти-до-(P → N)-фенилаланинов (2), имеющих фосфоаминокислотную группировку в различных (5' или 3') положениях рибозы, можно было предположить, что на устойчивость дирибонуклеозидфосфо-(P → N)-аминокислот (соединений типа I) решающее влияние также будет оказывать наличие или отсутствие защитной группы у цис-гидроксила (2') рибозы.

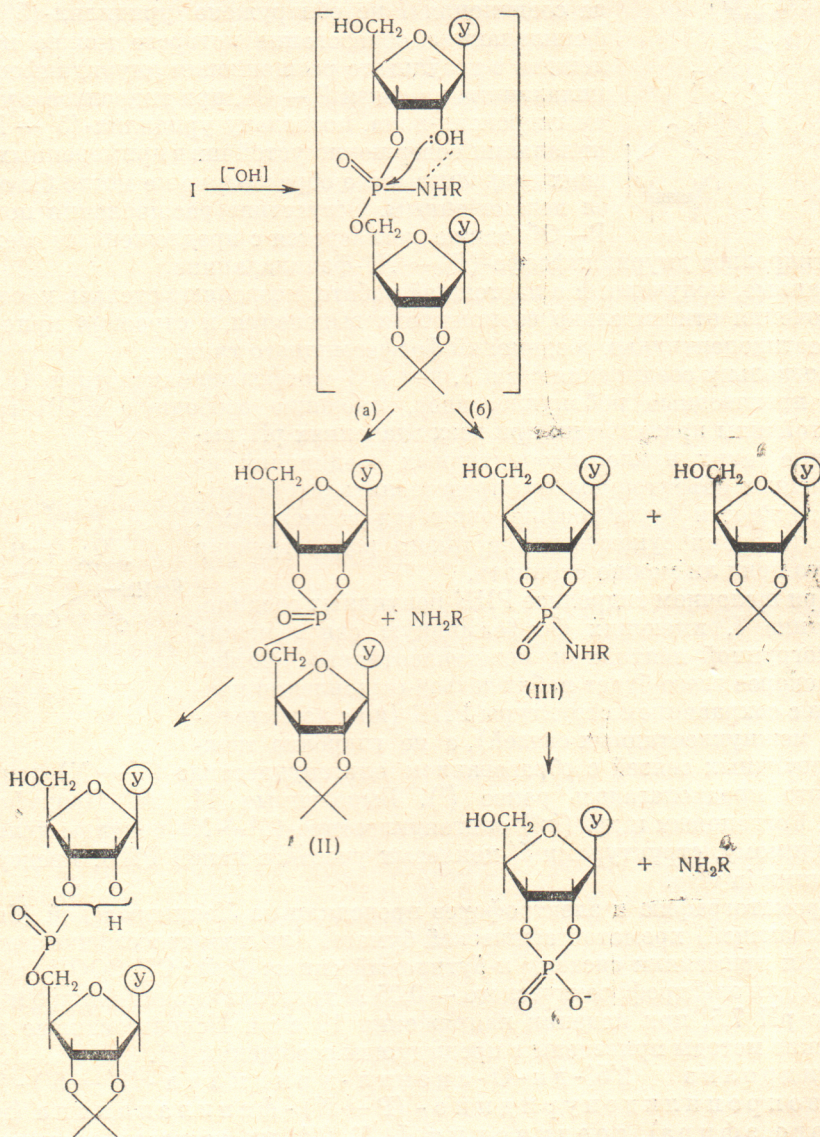
Для выяснения роли цис-гидроксильной группы было изучено поведение в щелочной среде. Оказалось, что соединение I практически устойчиво при pH 10,5 и 37° в течение часа, а после 6-часовой инкубации степень гидролиза не превышает 15%. Однако через 20 час. инкубации в тех же условиях соединение I разрушается на 90%. Специальными опытами было установлено, что межнуклеотидная связь в 2'-ацетилированном диуридинфосфате при этих условиях практически не гидролизуеться.

Из этих данных можно заключить, что щелочной распад диуридинфосфофенилаланина (I) действительно определяется степенью деацетилирования 2'-гидроксильной группы. Скорость распада соединения I при pH 10,5 сравнима со скоростью распада 2'-ацетилированного уридил-ил-(3' → N)-фенилаланина (2) при pH 10,0, а также со скоростью снятия ацетильной защитной группы с 2'-ОН-группы нуклеотида. Продуктами мягкого щелочного гидролиза соединения I (pH 10,5, 37°, 20 час.) являются диуридинфосфат (~80%), уридин-2' : 3'-циклофосфат и изопротилиденуридин в соотношении 1 : 1 (общее количество циклофосфата и нуклеозида составляет 10%), а также фенилаланин (90%).

Таким образом, можно предположить, что механизм гидролиза соединения I в щелочной среде подобен механизму щелочного распада 3'-фосфоаминокислотных производных рибонуклеотидов (2), с той лишь разницей, что в этом случае в результате нуклеофильной атаки цис-гидроксильной группой межнуклеотидного атома фосфора может наблюдаться разрыв как по связи P—N (а, см. схему), так и по связи P—O^{5'} (б), приводя к образованию либо циклического триэфира (II), либо к амиду циклофосфата (III).

В примененных условиях гидролиза (рН 10,5) распад по пути а сильно преобладает над расщеплением по пути б, т. е. расщепляется главным образом фосфоамидная связь.

Известно, что триэфиры типа II неустойчивы (гидролизуются спонтанно в водном растворе (3, 4)) и легко претерпевают гидролиз главным образом по одной из связей Р—О циклофосфатной группировки, что приводит к изомеризации межнуклеотидной связи (3'—5' ⇌ 2'—5'). Процент разрыва межнуклеотидной связи в этом случае очень невелик, на что указы-

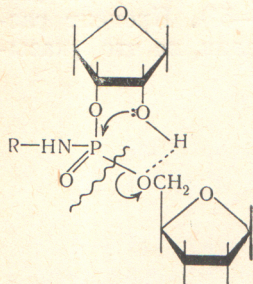


вают высокие выходы динуклеозидфосфатов и олигонуклеотидов при синтезе их через промежуточные циклотриэфиры типа II.

С другой стороны, устойчивость амида циклофосфата II не должна, по-видимому, сильно отличаться от устойчивости циклического триэфира II, а учитывая большую устойчивость к щелочи связи Р—N, чем Р—О, надо ожидать, что щелочной гидролиз амида циклофосфата будет идти исключительно по Р—О-связи, что должно привести к быстрому отщеплению аминокислоты, вследствие неустойчивости 3'-фосфоамидного производного рибонуклеозида со свободной 2'-ОН-группой. Справедливость этого пред-

положения была показана в нашей лаборатории (5): синтетический нуклеозид-2':3'-циклофосфо-(P→N)-фенилаланин при pH 10 (37°, 60 мин.) почти полностью расщепляется до 2':3'-циклофосфата и фенилаланина.

Распад динуклеозидфосфо-(P→N)-фенилаланина (I) по пути б (см. схему) вызван, по-видимому, уходом вместо аминной группы нуклеозида, протонизация которого может осуществляться также с участием 2'-гидроксильной группы.

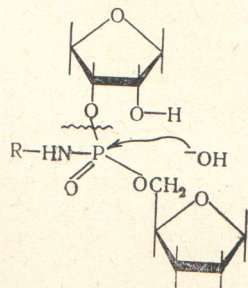


Надо сказать, что в продуктах щелочного гидролиза соединения I не обнаружено уридил-ил-(5'—N)-фенилаланина, образование которого можно предположить в результате расщепления диуридинфосфофенилаланина по связи P—O^{3'}, при гидролизе с участием гидроксил-иона, поскольку уридил-ил-(5'—N)-фенилаланин совершенно устойчив в примененных условиях гидролиза и его образование не могло бы остаться незамеченным. Отсутствие расщепления по связи P—O^{3'} также согласуется с предложенным механизмом гидролиза диуридинфосфо-(P_M→N)-фенилаланина.

Данные, полученные в настоящей работе, позволяют сделать некоторые заключения относительно возможности выделения и строения природных нуклеотидопептидных соединений фосфоамидного типа.

Поскольку соединения типа I, как и 3'-фосфоаминокислотные (пептидные) производные рибонуклеозидов, имеющие свободную 2-OH'-группу, неустойчивы практически при всех значениях pH, выделение таких нуклеотидопептидных соединений из природных объектов должно представлять значительные трудности (если вообще окажется возможным). В то же время существование такого рода структур *in vivo* вряд ли можно отрицать.

При щелочном гидролизе РНК-пептидных соединений типа I, имеющих фосфоамидную связь между аминогруппой пептида и межнуклеотидным фосфором, скорее всего будет наблюдаться отщепление пептидов с сохранением структуры РНК (но с изомеризацией межнуклеотидных связей), а не гидролиз межнуклеотидных связей с образованием олигонуклеотида-(5'→N)-пептидов, как это предполагалось ранее (7). Выделенные М. А. Прокофьевым, А. А. Богдановым и др. (7-9) олигонуклеотида-(5'→N)-пептиды являются, по-видимому, структурами 5'-концевых участков цепей РНК, предсуществующими *in vivo*.



Хроматографию и электрофорез проводили на Ленинградской (быстро впитывающей) хроматографической бумаге. Для хроматографического разделения применяли систему *n*-бутиловый спирт: H₂O : CH₃COOH, лед. (4 : 5 : 1), для электрофоретического — 0,05 M триэтиламмоний-бикарбонатный буфер pH 7,5, при падении напряжения 10 в/см. И использованные аналитические методы приведены в предыдущем сообщении (6).

Гидролиз 2'5'-ди-О-ацетил-уридил-ил-(3'→5')-2':3'-О-изопропилиденуридино-(P→N)-фенилаланина (метилового эфира), соединения I. К 0,1 мл раствора соединения I (1,5 моля) в 96% этаноле добавляют 0,1 мл карбонат-бикарбонатного буфера, pH 10,5, и смесь помещают в термостат (37°). Через определенные промежутки времени отбирают пробы и подвергают сначала электрофорезу при pH 7,5, а затем нисходящей хроматографии в направлении, перпендикулярном направлению электрофореза, для разделения изопропилиденуридина, фенилаланина и исходного вещества, обладающих одинаковой электрофоретической подвижностью, и определяют процентное содержание продуктов гидролиза. Для элюции изопропилиденуридина применяют 70% водный этанол, для элюции исходного соединения — 96% этанол.

Через 20 час. инкубации исходный защищенный диуридинфосфатфенилаланин разрушается почти нацело (защищенный диуридинфосфат в этих условиях устойчив). Продуктами щелочного гидролиза соединения I являются: 1) диуридинфосфат (соотношение УМФ-2'(3') : изопротилиденуридин, определенное после щелочного гидролиза 1 N NaOH, 37°, в течение 18 час., равно 1 : 1; подвижность U относительно УМФ-2'(3') при pH 7,5 равна 0,4; 2) уридин-2 : 3-циклофосфат ($U_{отн. УМФ-2'(3')}$ при pH 7,5 равна 0,7; строение доказано гидролизом до УМФ-2'(3') в 0,1 N HCl при 37° за 60 мин.); 3) следы УМФ-2'(3'); 4) изопротилиденуридин ($U_{отн. УМФ-2'(3')}$ при pH 7,5 равна 0,1; 5) фенилаланин ($U_{отн. УМФ-2'(3')}$ при pH 7,5 равна 0,1).

Последние три соединения идентифицированы прямым сравнением со «свидетелями». Результаты исследования приведены в табл. 1.

Таблица 1

Устойчивость Р—N-связи в 2',5'-ди-О-ацетил-уридиллил-(3'→5')-2',3'-О-изопротилиден-уридино- (Р→N)-фенилаланине (метиловом эфире, I) при pH 10,5 и 37°

Время инкубации, час.	Обнаружение вещества, μ мол (%)					Расщепление Р-N %
	исходное соединение I	диуридинфосфат	уридин-циклофосфат	изопротилиденуридин	фенилаланин	
0	0,375 (100)	0	0	0	0	0
1	0,375 (100)	0	0	0	0	0
6	0,319 (85,2)	0,058 (15,5)	0,056 (14,9)	0,056 (14,9)	0,054 (14,4)	15
20	0,049 (13,05)	0,320 (85,4)	0,320 (85,4)	0,326 (86,8)	0,324 (86,4)	87

Подобным же образом был проведен гидролиз соединения I в 1 N NaOH при 37° в течение 18 час. В продуктах такого жесткого гидролиза были обнаружены уридиловая-2'(3') кислота, изопротилиденуридин и фенилаланин в эквимольных количествах.

Гидролиз соединения I в 1 N HCl при 37° за 60 мин. дает диуридинфосфат и аминокислоту также в эквимольных количествах.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
23 IX 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. Е. Воробьев, Н. И. Соколова и др., ДАН, 166, 95 (1966). ² О. Е. Воробьев, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, Вестн. Московск. унив., 6, 66 (1964). ³ А. М. Michelson, Ann. Rev. Biochem., 30, 133 (1961). ⁴ А. М. Michelson, Nature, 181, 303 (1958). ⁵ Н. Н. Преображенская, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, ДАН, 174, 100 (1967). ⁶ О. Е. Воробьев, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, ДАН, 158, 143 (1964). ⁷ А. А. Богданов, Г. В. Терганова, М. А. Прокофьев, Биохимия, 27, 442 (1962). ⁸ М. А. Прокофьев, Е. Г. Антонович, А. А. Богданов, Биохимия, 25, 931 (1960). ⁹ А. А. Богданов, Е. Г. Антонович и др., Биохимия, 27, 226 (1962).