

Е. Г. АНТОНОВИЧ, М. И. ХАБАРОВА, С. М. ЖЕНОДАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ
АДЕНИЛИЛ-(3' — 5')-ПСЕВДОУРИДИНА**

Олигонуклеотиды, содержащие псевдоуридин (ψ), представляют большой интерес как модельные соединения в связи с той особой ролью, которая отводится псевдоуридину в структуре и функции транспортных РНК⁽¹⁾. До последнего времени единственным способом получения таких олигонуклеотидов было выделение их из гидролизатов тРНК⁽²⁾. При подготовке настоящей работы к печати появилось первое сообщение о синтезе аденилил-(3'—5')-псевдоуридина (Ар ψ)⁽³⁾, проведенном по методу Фолманна⁽⁴⁾, конденсацией N⁶, O^{2'}, O^{5'}-триацетиладенозин-3'-фосфата и ψ в присутствии дициклогексилкарбодимида. Динуклеозидмонофосфат Ар ψ , синтезированный с выходом 10% в расчете на N⁶, O^{2'}, O^{5'}-триацетиладенозин-3'-фосфат, представлял собой смесь (~1:1) изомеров, содержащих α - и β -псевдоуридин.

Хорошо известно, что синтез олигонуклеотидов может быть осуществлен двумя путями — химическим и ферментативным. В последние годы широко и успешно развиваются методы ступенчатого синтеза олигонуклеотидов, основанные на использовании рибонуклеаз⁽⁵⁾. Нами проведен синтез Ар ψ из аденозин-2',3'-циклофосфата ($A > p$) и ψ при участии неспецифической рибонуклеазы *Penicillium brevicompactum*. Смесь $A > p$ и ψ инкубировали в присутствии фермента при 0° в течение 24 час., за ходом реакции следили, нанося аликвоты реакционной смеси на хроматографическую бумагу и анализируя их с помощью электрофореза. Состав реакционной смеси в зависимости от времени приведен в табл. 1.

В аналогичных условиях был проведен синтез аденилил-(3'—5')-уридина (АрU). Результаты синтеза приведены в табл. 2.

Анализ данных табл. 1 и 2 показывает, что синтез Ар ψ очень быстро (через 2 часа) достигает равновесного состояния, в то время как при синтезе АрU равновесие устанавливается очень медленно. Гидролиз.

Таблица 1

Синтез Ар ψ в присутствии РНКазы *P. brevicompactum*

Компоненты * реакционной смеси	R_f	$U_{отн} Ар$	Состав реакц. смеси, %			Выход в % на израсходованный $A > p$		
			2 час.	10 час.	24 час.	2 час.	10 час.	24 час.
Ар ψ	0,49	0,23	0,7	0,7	0,7	2,7	4,0	0,8
АрA > p			2,6	2,6	0,5	10,6	4,0	0,7
Ар	0,46	1,0	21,4	62,4	80,6	86,7	95,0	98,5
A > p	0,50	0,50	75,5	34,6	18,2			

* Здесь и в табл. 2 ψ и U, взятые в избытке, не учитывались при анализе реакционной смеси.

$A > p$ в первом случае также протекает значительно быстрее, чем во втором. В то же время равновесная концентрация ApU . Таким образом, для реакций, катализируемых рибонуклеазой *P. brevicompactum*, ψ может рассматриваться как субстратный аналог U (⁶), однако относительное расположение субстратов на ферменте в случае $A > p$ и ψ менее благоприятно для образования межнуклеотидной связи.

Таблица 2

Синтез ApU в присутствии РНКазы *P. brevicompactum*

Компоненты реакционной смеси	R_f	$U_{отн}^{Ap}$	Состав реакц. смеси, %			Выход в % на израсходованный $A > p$		
			19 час.	38 час.	100 час.	19 час.	38 час.	100 час.
ApU	0,23	0,26	6,4	11,8	14,6	25,3	18,6	16,6
Ap	0,16	1,0	18,9	51,5	73,0	74,7	81,4	83,4
$A > p$	0,50	0,50	74,7	36,7	12,4			

Хотя выход $Ap\psi$ оказался невысоким, предлагаемый способ синтеза $Ap\psi$ может рассматриваться как препаративный, так как $\sim 75\%$ исходного $A > p$ может быть легко регенерировано и вновь введено в реакцию. Если сравнивать этот способ синтеза $Ap\psi$ с химическим (³), то первому следует отдать предпочтение, так как выход $Ap\psi$ в обоих случаях примерно одинаков (~ 3 и 5%) в расчете на исходное вещество, а если при-

Таблица 3

У.-ф. спектры * $Ap\psi$ и ApU

Спектральные характери- стики	$Ap\psi$			ApU
	0,1 М HCl	0,1 М КОН	70% C_2H_5OH	0,1 М HCl
λ_{max}	259	262	264	265
λ_{min}	234	240	233	237
E_{250}/E_{260}	0,88	0,88	0,75	0,72
E_{270}/E_{260}	0,83	0,91	0,93	0,96
E_{280}/E_{260}	0,38	0,65	0,47	0,50
E_{290}/E_{260}	0,15	0,50	0,15	

* У.-ф. спектр $Ap\psi$ хорошо согласуется с литературными данными для $Ap\psi$ (?).

нять во внимание, что конденсация в присутствии дициклогексилкарбодиимида проводится в безводных растворителях и требует от 8 до 14 дней, аденозин-3'-фосфат должен быть превращен в триацетильное производное, а обработка реакционной смеси и выделение $Ap\psi$ весьма сложны (расщепление 3'-3'- и 3'-2'-динуклеозидмонофосфатов, образующихся при конденсации, хроматография на ДЕАЕ-целлюлозе и т. д.), то преимущества ферментативного способа станут еще более очевидными.

$Ap\psi$ был выделен нами из реакционной смеси методом электрофореза на бумаге и очищен хроматографированием на бумаге. Характеристики $Ap\psi$ приведены в табл. 1 и 3. Гидролиз $Ap\psi$ неспецифической рибонуклеазой *P. brevicompactum* дает Ap и ψ в соотношении 1:1, причем в гидролизате обнаружен только β -псевдоуридин.

Хроматографию и электрофорез проводили на ленинградской хроматографической бумаге марки «медленная», предварительно промытой 2 М соляной кислотой, 0,5% раствором динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и водой. При хроматографировании по восходящему

способу использовали систему растворителей пропанол-2-конц. аммиак-вода (7:1:2). Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 час. при напряжении 20 в/см в 0,05 M растворе бикарбоната триэтиламония (рН 7,5). У.-ф. спектры снимали на спектрофотометре «Unicam» SP 800 с автоматической записью. В работе использовали аденозин-2',3'-циклофосфат (Na-соль) и уридин фирмы «Reanal» (Венгрия); псевдоуридин был выделен по методу (8). Препарат неспецифической рибонуклеазы *R. breviscompactum* был выделен и любезно предоставлен нам С. И. Безбородовой (9). За единицу фермента принимали количество рибонуклеазы, способное расщепить 1 μ мол. цитидин-2',3'-циклофосфата за 1 мин. при рН 5,2 и 37°.

Синтез динуклеозидмонофосфатов. 22,5 μ мол. А > р (Na-соль) и 67,5 μ мол. нуклеозида инкубировали с 0,8 ед. фермента в 0,09 мл 0,2 M фосфатного буфера (рН 7,0) при ~0°, отбирая аликвоты (0,004 мл) из реакционной смеси и анализируя их при помощи электрофореза на бумаге и у.-ф. спектрофотометрии. Для препаративных целей всю реакционную смесь наносили на хроматографическую бумагу и делили электрофорезом с последующим хроматографированием ArN.

Гидролиз динуклеозидмонофосфатов. 2 о.е. динуклеозидмонофосфата инкубировали с 0,16 ед. рибонуклеазы *R. breviscompactum* в 0,01 мл ацетатного буфера (рН 5,2) в течение 18 час. при ~20°, после чего гидролизат хроматографировали на бумаге и пятна, соответствующие аденозин-3'-фосфату и нуклеозиду, элюировали 0,1 M HCl и спектрофотометрировали в у.-ф.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 V 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. В. Венкстерн, Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот, «Наука», 1970. ² J. Ofengand, C. Henes, J. Biol. Chem., 244, 6241 (1969). ³ M. Schweizer, R. Thedford, J. Slama, Biochim. et biophys. acta, 232, 217 (1971). ⁴ H. Follman, Tetrahedron Letters, № 22, 2113 (1967). ⁵ С. М. Женодарова, Усп. хим., 39, 1479 (1970). ⁶ E. Goldwasser, R. Henrikson, Progr. Nucl. Acid Res., 5, 399 (1966). ⁷ Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов РНК, «Наука», 1967. ⁸ Biochem. Prep., 10, 135 (1963). ⁹ С. И. Безбородова, Т. В. Ильина, В. И. Крупнянко, ДАН, 196, 1460 (1971).