

Е. Г. АНТОНОВИЧ, В. М. ПОНОМАРЕВА, Э. А. СЕДЕЛЬНИКОВА,
С. М. ЖЕНОДАРОВА, член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ НЕКОТОРЫХ
ДИНУКЛЕОЗИДМОНО- И ДИФОСФАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ
МИНОРНЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ**

При выяснении роли модифицированных, так называемых минорных, компонентов транспортных рибонуклеиновых кислот исключительно большое значение приобретают олигонуклеотиды, содержащие в своем составе минорные основания и используемые как модельные соединения. Как правило, такие олигонуклеотиды выделяли из гидролизатов тРНК⁽¹⁾, и только недавно появились первые сообщения о синтезе динуклеозидмонофосфатов, содержащих псевдоуридин⁽²⁻⁴⁾, 5,6-дигидроуридин⁽³⁾ и N⁶-(Δ^2 -изо-пентенил)-аденозин⁽²⁾.

В настоящей работе представлены результаты синтеза динуклеозидмоно- и дифосфатов, содержащих псевдоуридин (ψ), тимидин (dT), N⁴-ацетилцитидин (ac⁴C), N⁶-метиладенозин (me⁶A) и инозин (I). Мы считали целесообразным применить для синтеза динуклеотидов, включающих минорные нуклеозиды, методы, основанные на использовании рибонуклеаз⁽⁵⁾. Ферментативные методы синтеза не требуют предварительного блокирования «лишних» функциональных групп и позволяют осуществить синтез межнуклеотидной связи в мягких условиях, что особенно важно, так как многие из минорных компонентов тРНК отличаются большой лабильностью. Синтезы осуществляли по схеме: $N > p + N' \xrightleftharpoons{\text{фермент}} N_p N'$, где $N > p - 2'$, 3'-циклофосфаты цитидина, гуанозина, инозина, аденозина и N⁶-метиладенозина, а N' — ψ , dT, C, ac⁴C, 2'(3')-фосфаты C и U. Возможность синтезировать указанным методом такой фрагмент тРНК, как GpT, проверялась на примере синтеза GdT, так как риботимидин трудно доступен, а рибонуклеаза *Penicillium brevicomractum*, применявшаяся для синтеза, неспецифична относительно 2',3'-диольной группировки в акцепторе фосфата⁽⁶⁾. Результаты синтезов приведены в табл. 1, а характеристики синтезированных динуклеотидов — в табл. 2.

Как следует из табл. 1*, для всех перечисленных динуклеотидов предлагаемый способ синтеза может рассматриваться как препаративный, так как выходы динуклеотидов вполне удовлетворительные, а в ряде случаев — весьма высокие; субстраты же, не вошедшие в реакцию, могут быть легко регенерированы.

В работе использовали 2',3'-циклофосфаты аденозина и цитидина (Na-соли), 2'(3')-фосфаты цитидина и уридина (NH₄⁺-соли), цитидин и панкреатическую рибонуклеазу фирмы «Reanal» (Венгрия), тимидин фирмы «Fluka» (Швейцария); псевдоуридин был выделен по методу⁽⁸⁾. Для получения me⁶A > p была использована реакция изомеризации me⁴A → me⁶A⁽⁹⁾. Аналогичная обработка N⁴-метиладенозин-2'(3')-фосфата, синтезированного нами по методу⁽¹⁰⁾, дает количественный выход N⁶-метильного производного, которое было превращено в соответствующий 2',3'-

* Влияние структуры субстратов на синтез межнуклеотидной связи, катализируемый рибонуклеазой *P. brevicomractum*, и субстратная специфичность этого фермента обсуждаются в работах^(6, 7).

Таблица 1

Синтез динуклеозидмоно- и дифосфатов, содержащих минорные нуклеозиды

Динуклеотид NpN'	Фермент	Время, необ- ходимое для максималь- ного выхода NpN', час	Выход NpN', %		Синтез/ /гидролиз
			на введен- ный N > p	на израс- ходован- ный N > p	
Срф	Панкреатическая РНКаза	0,5	2,1	16,6	0,2
GpdT ¹	РНКаза P. brev.	5	7,6	21,0	0,3
Арас ² C ²	То же	6	4,5	21,5	0,2
me ⁶ ApC ²	»	133	8,1	33,7	0,5
IpC ¹	»	133	47,2	75,6	3,1
IpC ²	»	311	27,3	69,8	2,3
IpCp ¹	»	72	15,5	41,4	0,7
IpCp ²	»	72	27,3	50,0	1,0
IpCp ³	»	144	23,8	37,0	0,6

¹ Синтезы проводили в 0,2 М ацетатном буфере, pH 4,65; ² синтезы проводили в 0,2 М фосфатном буфере, pH 7,0.

Таблица 2

Характеристики динуклеозидмоно- и дифосфатов

Динуклеотид NpN'	R _f ¹	U ² _{отн}	[Np]/[N']	У.-ф. спектры в 0,1 N HCl					
				λ _{max}	λ _{min}	E ₂₅₀ /E ₂₆₀	E ₂₇₀ /E ₂₈₀	E ₂₈₀ /E ₂₉₀	E ₂₉₀ /E ₂₉₀
Срф	0,34 (А)	0,66	0,95 : 1	272	239	0,65	1,26	1,19	0,74
GpdT		0,65	1,04 : 1	262	235	0,84	0,95	0,78	0,50
Арас ² C	0,25 (В)	0,37	1,16 : 5	255 ³	230	0,88	0,75	0,42	0,30
				295					
me ⁶ ApC	0,43 (Б)	0,60	1 : 1	268	236	0,62	1,12	0,90	0,33
IpC	0,18 (Б)	0,65	1,08 : 1	251	233	1,03	1,04	0,98	0,65
				273					
IpCp	0,75 (Б) ⁴		0,99 : 1	253	234	0,98	1,02	1,04	0,87
				273					
IpUp	(0,72 (Б) ⁴)		0,83 : 1	253	227	1,07	0,68	0,29	0,08

¹ В скобках указаны системы растворителей для хроматографии на бумаге; ² определены относительно 5'-нуклеотида; ³ в воде; ⁴ определены относительно Ip, так как хроматографирование проводили в течение 72 час.

циклофосфат обработкой водорастворимым карбодимидом. I > p приготовили дезаминированием А > p аденозиндезаминазой intestinal mucosa, ac⁴C получили по методу (11). Препарат рибонуклеазы P. brevicompactum был выделен и любезно предоставлен нам С. И. Безбородовой и сотрудниками (12).

Хроматографию и электрофорез проводили на ленинградской бумаге марки М, предварительно промытой 2 N HCl, 0,5% раствором динатриевой соли ЭДТА и водой. При хроматографировании по нисходящему способу использовали следующие системы растворителей: (А) пропанол-1 : конц. аммиак : вода (55 : 10 : 35); (Б) пропанол-2 : конц. аммиак : вода (7 : 1 : 2); (В) изомасляная кислота : 0,5 М аммиак (10 : 6). Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 час. при напряжении 20 в/см в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония (pH 7,5). У.-ф. спектры снимали на спектрофотометре «Spectord» (ГДР) с автоматической записью.

Синтез Срф. Раствор 15 μмол. С > p и 42 μмол. ψ в 0,05 мл 50% пиридина охлаждали до 0°, добавляли 0,01 мл раствора панкреатической рибонуклеазы в 50% пиридине (1 мг/мл) и инкубировали смесь при 0° в течение 5 час., отбирая аликвоты 0,004 мл из реакционной смеси и анализи-

руя их при помощи электрофореза и хроматографии на бумаге и у.-ф. спектрофотометрии. Для препаративных целей всю реакционную смесь через 30 мин. наносили на хроматографическую бумагу и делили электрофорезом в течение 2,5 час. Полосы, соответствующие Срф и С > р, хроматографировали в системе А (Срф на электрофореграмме частично идет с С > р, а полоса Срф бывает загрязнена С > р, а также α -изомером ψ , если для синтеза был взят недостаточно очищенный препарат β — ψ). После хроматографии Срф элюировали водой (рН ~ 7) и высушивали лиофильно.

Синтезы динуклеозидмоно- и -дифосфатов, катализируемые рибонуклеазой *R. brevisoltratum*. 22,5 μ мол. N > р и 67,5 μ мол. N' в 0,09 мл буферного раствора (см. сноски к табл. 1), содержащего рибонуклеазу *R. brevisoltratum* (0,8 ед/мл), инкубировали при 0° в течение 24—350 час. При получении IrС и me⁹ArС концентрации субстратов и фермента были уменьшены вдвое. Аликваты или всю реакционную смесь наносили на бумагу через определенные промежутки времени и анализировали методом электрофореза (синтез динуклеозидмонофосфатов) или хроматографии (синтез динуклеозиддифосфатов) на бумаге. Выходы динуклеотидов определяли спектрофотометрически. Полученные соединения анализировали обычными способами (4).

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 VII 1972

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуццино-на-Оке

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Т. В. Венкстерн, Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот, «Наука», 1970. ² M. Schweizer, R. Thedford, J. Siam, *Biochim. et biophys. acta*, **232**, 217 (1971). ³ Л. П. Шершнева, Т. В. Венкстерн, *Мол. биол.*, **5**, 480 (1971). ⁴ Е. Г. Антонович, М. И. Хабарова и др., *ДАН*, **200**, 1099 (1971). ⁵ С. М. Женодарова, *Усп. хим.*, **39**, 1479 (1970). ⁶ Т. А. Масленникова, Э. А. Седелъникова и др., *Мол. биол.*, **6**, № 6 (1972). ⁷ Э. А. Седелъникова, В. П. Клягина, С. М. Женодарова, *Мол. биол.*, **6**, № 6 (1972). ⁸ W. Sohn, *Biochem. Prep.*, **10**, 135 (1963). ⁹ P. Brookes, A. Dipple, P. D. Lawly, *J. Chem. Soc.*, 1968, 2026. ¹⁰ P. L. C. Brimacombe et al., *Biochemistry*, **4**, 2452 (1965). ¹¹ X. A. Watanabe, J. J. Fox, *Angew. Chem.*, **78**, 589 (1966). ¹² С. И. Безбородова, Т. В. Ильина, В. И. Крупяико, *ДАН*, **196**, 1460 (1971).