

УДК 577.15.02

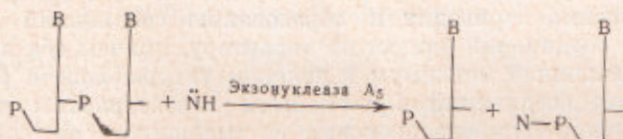
ХИМИЯ

И. А. КОЗЛОВ, Р. К. ЛЕДНЕВА, З. А. ШАБАРОВА,
член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

ГИДРОЛИЗ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ ЭКЗОНУКЛЕАЗОЙ A_5 В ПРИСУТСТВИИ НУКЛЕОФИЛЬНЫХ АГЕНТОВ

Способность некоторых экзонуклеаз осуществлять перенос нуклеотида на нуклеофильные агенты (¹⁻³) представляет большой интерес для выяснения механизма ферментативного катализа. С другой стороны, использование этих ферментов для синтетических целей открывает новые возможности получения труднодоступных соединений: широко известны, например, успехи, достигнутые в синтезе межнуклеотидной связи при помощи различных рибонуклеаз и ряда других ферментов нуклеотидного обмена (⁴).

В настоящей работе была исследована возможность переноса 5'-дезоксирибонуклеотида на нуклеофильные акцепторы при инкубации олигодезоксинуклеотидов в присутствии экзонуклеазы A_5 (⁵).



В качестве нуклеофильных акцепторов были использованы уридин, метиловый эфир фенилаланина и пара-бромбензальоксим. Нуклеозиды и аминокислоты — широко распространенные в природе нуклеофильные акцепторы. Выбор пара-бромбензальоксима обусловлен его чрезвычайно высокой нуклеофильностью (⁶) и наличием сильного хромофора, что позволяет применить этот акцептор в будущем для кинетического изучения механизма действия экзонуклеазы A_5 .

Субстратами ферментативной реакции служили синтетические олигодезоксинуклеотиды — $(\text{dPrA})_4$ и $(\text{dPrG})_2$, полученные по методу Кораны (⁷). Для осуществления реакции переноса мононуклеотидного остатка на нуклеофильный акцептор олигодезоксинуклеотиды инкубировали в течение 15 мин. при 20° с экзонуклеазой A_5 * в присутствии соответствующих нуклеофильных агентов. Состав пробы: $1 \cdot 10^{-3}$ M субстрат, 0,001 мг фермента, нуклеофильный акцептор в концентрации, указанной в табл. 1, $1 \cdot 10^{-2}$ M трис-буфер pH 8,66 и $5 \cdot 10^{-3}$ M Mg^{2+} в общем объеме 1 мл. Контролем служила реакционная смесь того же состава без фермента. Продукты реакции разделяли электрофорезом на бумаге в 0,05 M триэтиламмоний-бикарбонатном буфере pH 7,5 в течение 3,5 час. при 350 в. В процессе ферментативной реакции наблюдали полное превращение исходных олигодезоксинуклеотидов в 5'-мононуклеотиды, являющиеся продуктами гидролиза, и соединений, образующиеся в результате переноса мононуклеотидного остатка на соответствующий нуклеофильный агент. Некоторые характеристики полученных соединений представлены в табл. 1.

* Препарат экзонуклеазы A_5 был любезно предоставлен сотрудниками Института молекулярной биологии АН СССР Р. И. Татарской и Т. Н. Львовой.

Для облегчения идентификации соединения, образующегося при использовании в качестве акцептора нуклеозида, применяли C^{14} -уридин. Сравнение электрофоретической и хроматографической подвижностей соединения, полученного в результате ферментативного переноса остатка 5'-дезоксадениловой кислоты на C^{14} -уридин, с синтезированным по мето-

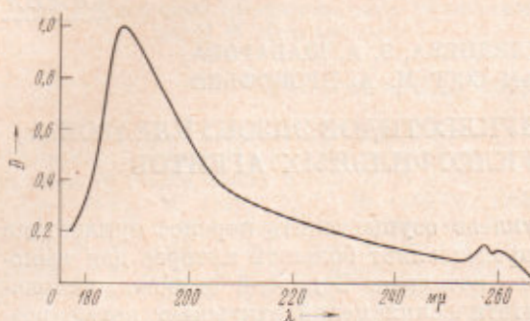


Рис. 1. У.-ф. спектр соединений I и II

дому Кораны dApU свидетельствует о том, что это соединение является динуклеозидфосфатом, природу межинуклеотидной связи в котором не устанавливали. Строение метилового эфира дезоксиаденилил-(5' → N)-фенилаланина доказывали гидролизом 6 N HCl (2 часа, 37°) и определением соотношения аденин : фенилаланин (1 : 1,05). Хроматографическая и электрофоретическая подвижности метилового эфира дезоксиаденилил-(5' — N)-фе-

нилаланина, полученного в присутствии экзонуклеазы A_2 и синтезированного из смешанного ангидрида дезоксиаденозин-5'-фосфата и дифенилфосфорной кислоты (*), совпадали (табл. 1).

Гидролиз динуклеотида (dpG)₂ экзонуклеазой A_2 в присутствии пара-бромбензальоксида приводит к образованию соединений I и II. У.-ф. спектры этих соединений близки по характеру, причем оба продукта имеют ярко выраженный максимум в далеком ультрафиолете (рис. 1). Для идентификации соединений I и II были синтезированы нуклеотидные производные пара-бромбензальоксида из смешанного ангидрида дезоксигуанозин-5'-фосфата и дифенилфосфорной кислоты. Синтезированные этим путем соединения полностью идентичны по хроматографическим и спектральным свойствам соединениям I и II. При инкубации соединения II при pH 5,5 в течение 7 дней (2°) образуются в эквимольных количествах пара-бромбензальоксим (λ_{max} 261 мк, ϵ_{261} $2 \cdot 10^4$) и дезоксигуанозин-5'-фосфат. Соединение I в этих условиях устойчиво. Известно, что ароматические оксиды вступают в реакции нуклеофильного замещения с обра-

Таблица 1

Некоторые характеристики соединений, образующихся при гидролизе олигодезоксинуклеотидов экзонуклеазой A_2 в присутствии нуклеофильных агентов

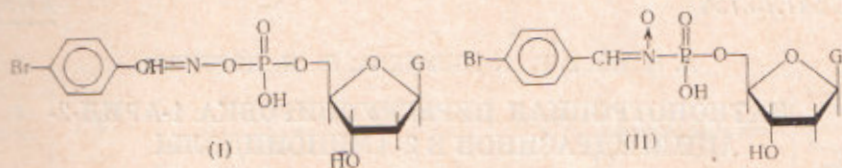
Олиго- дезокси- нуклеотид	Акцептор	Концентрация акцептора	Продукты акцептирования	Выход продук- тов * акцепти- рования, %	R_f в си- стеме эта- нол : 1 М ацетат аммония pH 7,5 (7 : 8)	$U_{\text{отн}}$ УМФ-5' pH 7,5
(dpA) ₄	C^{14} -уридин	$1 \cdot 10^8$ расп/мин **	Динуклеозидфос- фат, содержащий C^{14} -уридин ***	0,22	0,60	0,45
(dpA) ₁	Метилловый эфир фенил- аланина	$3 \cdot 10^{-2}$ М	Дезоксиаденилил- (5')-фенилаланин, метилловый эфир	15	0,50	0,55
(dpG) ₂	p-Бромбенз- альоксим	$2 \cdot 10^{-3}$ М	I II		0,10 0,02	0,35 0,50

* Выход продуктов акцептирования относительно реагента, взятого в недостатке.

** Акцептирование C^{14} -уридином проводили в присутствии избытка олигодезоксинуклеотида.

*** Природу межинуклеотидной связи в динуклеозидфосфате не устанавливали.

зованием как N-, так и O-производных. Учитывая идентичность хромофорных систем соединений I и II (близкий характер у.-ф. спектров), а также кислотолабильность соединения II, мы предполагаем для этих соединений следующее строение:



Наличие частичного отрицательного заряда на связанном с азотом атоме кислорода соединения II объясняет его несколько большую электрофоретическую и меньшую хроматографическую подвижность.

Все использованные нами нуклеофильные акцепторы существенно отличаются как по своему строению, так и по нуклеофильности. Отсутствие у фермента специфичности к структуре акцептора свидетельствует, по-видимому, о том, что в ходе реакции имеет место скорее всего активация субстрата, а не акцептора.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
19 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. M. J. Menon, M. Smith, *Biochemistry*, **9**, 1585 (1970). ² W. E. Razzell, H. G. Khorana, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1144 (1961). ³ L. A. Herpel, et al., *Biochem. J.*, **60**, 1, 8 (1955). ⁴ С. М. Женодарова, *Усп. хим.*, **39**, 1479 (1970). ⁵ R. I. Tatarskaya, T. N. Lvova et al., *Europ. J. Biochem.*, **15**, 442 (1970). ⁶ W. P. Jencks, I. Carriuola, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1778 (1960). ⁷ R. Lahrmann, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2981 (1966). ⁸ Н. И. Соколова, Р. К. Леднева и др., *Хим. природных соед.*, **4**, 290 (1967).