

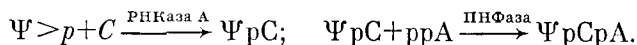
С. М. ЖЕНОДАРОВА, В. П. КЛЯГИНА, О. А. СМОЛЯНИНОВА,  
Е. Г. АНТОНОВИЧ, член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ПСЕВДОУРИДИЛИЛ-(3'-5')-  
ЦИТИДИЛИЛ-(3'-5')-АДЕНОЗИНА — ФРАГМЕНТА  
УНИВЕРСАЛЬНОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА**

Известно, что во всех изученных к настоящему времени тРНК обнаружен так называемый «универсальный» олигонуклеотид GrTrΨrCpN\*, который, по-видимому, участвует в какой-то функции, общей для всех тРНК (1). В ряде работ было высказано предположение об участии этого олигонуклеотида в неспецифическом связывании тРНК с рибосомами (2, 3); однако, в большинстве случаев, это основано на косвенных данных, которые недостаточны для того, чтобы делать определенные выводы о его функциональной роли. Поэтому особый интерес приобретает разработка подходов к синтезу такой «универсальной» последовательности.

В настоящей работе представлены результаты синтеза некоторых фрагментов этой последовательности; динуклеозидмонофосфата псевдоуридилил-(3'-5')-цитидина (ΨpC) и тринуклеозиддифосфата псевдоуридилил-(3'-5')-цитидилил-(3'-5')-аденозина (ΨpCpA). До сих пор был осуществлен синтез

только трех динуклеозидмонофосфатов, содержащих псевдоуридин (Ψ): ApΨ (4-5), GrΨ (6) и CpΨ (7), причем ApΨ был синтезирован химическим методом (4) и ферментативно (5), а два последних — только ферментативно. Следует отметить, что во всех случаях Ψ был 3'-концевым нуклеозидом. Нами осуществлен ферментативный синтез олигонуклеотидов, содержащих Ψ с 5'-конца. Синтез проводили по следующей схеме, используя ферменты двух типов (рибонуклеазу А и полинуклеотидфосфорилазу (ПН фаза) (*Micrococcus lysodeicticus*):



Для сравнения были проведены также синтезы соответствующих олигонуклеотидов, содержащих обычный уридин UpC и UpCpA.

В табл. 1 приведены результаты синтезов динуклеозидмонофосфатов UpC и ΨpC. Реакция с псевдоуридин-2',3'-циклофосфатом идет несколько медленнее, чем с уридин-2',3'-циклофосфатом, что известно и для других ферментов при замене в субстрате U на Ψ, например, для фосфодиэстеразы змеиного яда (1, 6); однако в обоих случаях получен весьма высокий выход динуклеозидмонофосфата. Так как синтез CpΨ в присутствии РНКазы А идет со значительно более низким выходом, чем синтез UpC (сопоставимые результаты получены только в водно-пиридиновом

Таблица 1  
Синтез ΨpC и UpC,  
катализируемый РНКазой А

NpC	Время, необходимое для максимального выхода NpC, час	Выход NpC, %		Синтез Гидролиз
		на введенный N p	на израсходованный N p	
UpC	2	27,8	64,2	1,3
ΨpC	4	19,7	57,1	1,7

\* В тРНК<sub>мет</sub> из *E. coli* и тРНК<sub>сер</sub> из дрожжей N=A, во всех остальных тРНК N=G.

Характеристики динуклеозидмонофосфатов и тринуклеозиддифосфатов

Олиго- нуклео- тид	$R_f$ (II)	U	Отношение компонентов в гидролизате	У.-ф. спектры					
				$\lambda_{\max}$ нм	$\lambda_{\min}$ нм	$\frac{E_{250}}{E_{260}}$	$\frac{E_{270}}{E_{260}}$	$\frac{E_{285}}{E_{260}}$	$\frac{E_{290}}{E_{260}}$
ΨpC	0,27	0,63 <sup>1</sup>	1 : 0,9	271 <sup>3</sup>	238	0,60	1,32	1,24	0,86
				278 <sup>4</sup>	252	0,91	1,24	1,32	1,02
				267 <sup>5</sup>	236	0,79	1,04	0,73	0,30
UpC	0,28	0,63 <sup>1</sup>	1 : 1	270 <sup>3</sup>	237	0,64	1,17	1,03	0,66
				267 <sup>4</sup>	246	0,96	1,0	0,80	0,30
ΨpCpA	0,10	0,70 <sup>2</sup>	1,06 : 1 : 1,06	264 <sup>5</sup>	233	0,80	0,94	0,58	0,27
UpCpA	0,10	0,70 <sup>2</sup>	1 : 1 : 1,09	264 <sup>5</sup>	233	0,79	1,0	0,68	0,29
Ψ > p	0,51	0,80							
Ψp	0,12	1,0							

<sup>1</sup> Определены относительно 5'-нуклеотида; <sup>3</sup> определены относительно pрA; <sup>3</sup> в 0,1 N HCl; <sup>4</sup> в 0,1 N KOH; <sup>5</sup> в H<sub>2</sub>O.

растворе (<sup>7</sup>)), можно полагать, что в РНКазе А участок связывания донора фосфата менее чувствителен к переходу от U к Ψ, чем участок, связывающий акцептор фосфата.

Тринуклеозиддифосфаты ΨpCpA и UpCpA были получены при инкубировании динуклеозидмонофосфатов (NpC) и дифосфата аденозина (pрA) с полинуклеотидфосфорилазой *M. lysodeicticus* при начальной концентрации компонентов реакционной смеси, рекомендованной для синтезов с участием полинуклеотидфосфорилазы в работе (<sup>8</sup>). ΨpC более стабилен в условиях синтеза, чем UpC, и значительно более стабилен, чем CpΨ, что позволяет легко регенерировать его из реакционной смеси. Поведение ΨpC и UpC как акцепторов фосфата в этой реакции практически одинаково. Это дает основание считать, что структура 5'-нуклеозидного остатка в акцепторе фосфата несущественна для полинуклеотидфосфорилазы *M. lysodeicticus*. Выход ΨpCpA и UpCpA составляет 3–5% в расчете на израсходованный динуклеозидмонофосфат. Возможность легко регенерировать динуклеозидмонофосфат, с одной стороны, и неустойчивость производных псевдоуридина в условиях химического синтеза (<sup>4</sup>), с другой, несмотря на низкий выход, позволяют рекомендовать этот путь для приготовления фрагментов тРНК, содержащих минорные основания. Характеристики синтезированных динуклеозидмонофосфатов и тринуклеозиддифосфатов приведены в табл. 2.

В работе использовали цитидин, 2',3'-циклофосфат уридина (Na-соль), 5'-дифосфат аденозина (Na<sub>3</sub>-соль) и РНКазу А фирмы «Reanal» (Венгрия) и полинуклеотидфосфорилазу *M. lysodeicticus* фирмы «Calbiochem» (США); псевдоуридин-2',3'-циклофосфат (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-соль) был получен из псевдоуридина, выделенного по методу (<sup>9</sup>), фосфорилированием 5'-О-замещенного производного Ψ β-цианэтилфосфатом по (<sup>10</sup>) с последующей циклизацией по (<sup>11</sup>). Хроматографию и электрофорез на бумаге проводили, как описано ранее (<sup>7</sup>), используя следующие системы растворителей: (I) *n*-пропанол – конц. аммиак – вода (55 : 10 : 35); (II) пропанол-2 – конц. аммиак – вода (7 : 1 : 2); (III) этанол – конц. аммиак – вода (65 : 10 : 25).

Синтез динуклеозидмонофосфатов. Смесь 12,5 мкмол. нуклеозид-2',3'-циклофосфата и 37 мкмол. цитидина в 0,05 мл трис-HCl буфера (рН 7,6) инкубировали с РНКазой А 0,4 мг/мл при 0°. Анализ реакционной смеси через определенные промежутки времени проводили методами электрофореза на бумаге и у.-ф. спектрофотометрии. Для сравнительных целей всю реакционную смесь наносили на бумагу через

2 часа (УрС) или 4 часа (УрС) и делили электрофорезом в течение 2 час. Полосы, соответствующие УрС и УрС, хроматографировали в системе II, после чего элюировали водой (рН~7), высушивали лиофильно и анализировали обычным способом<sup>(5)</sup>.

Синтез тринуклеозиддифосфатов. Смесь 6,5 мкмол. НрС, 3,25 мкмол. ррА и 4 мг полинуклеотидфосфорилазы *M. lysodeicticus* растворяли в 0,65 мл 0,05 М трис-НСl буфера (рН 9), содержащего 0,05 М ЭДТА и 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, и инкубировали при 37° в течение 2 час. Реакционную смесь наносили на бумагу и хроматографировали в системе I или III в течение 24 час., а затем 48 час. в системе II. Полосы, содержащие тринуклеозиддифосфат и исходный динуклеозидмонофосфат, элюировали и подвергали электрофорезу. Выделенные вещества очищали рехроматографией в системе II и анализировали обычным способом<sup>(5)</sup>.

Институт биологической физики  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке  
Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
28 III 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Т. В. Венкстери, Первичная структура транспортных рибонуклеиновых кислот, «Наука», 1970. <sup>2</sup> А. D. Mirzabekov et al., Biochim. et biophys. acta, v. 145, 845 (1967). <sup>3</sup> J. Ofengand, C. Henes, Federat. Proc., v. 28, 350 (1969). <sup>4</sup> M. Schweizer, R. Thedford, J. Slama, Biochim. et biophys. acta, v. 232, 217 (1971). <sup>5</sup> Е. Г. Антонович, М. И. Хабарова и др., ДАН, т. 200, 1099 (1971). <sup>6</sup> Л. П. Шершнева, Т. В. Венкстери, Мол. биол., т. 5, 480 (1971). <sup>7</sup> Е. Г. Антонович, В. М. Пономарева и др., ДАН, т. 207, 718 (1972). <sup>8</sup> Ph. Leder, M. F. Singer, R. L. C. Brimacombe, Biochemistry, v. 4, 1561 (1965). <sup>9</sup> W. Cohn, Biochem. Prepr., v. 10, 135 (1963). <sup>10</sup> Сборн. методических разработок к спецпрактикуму по химии белка и нуклеиновых кислот под ред. М. А. Прокофьева и А. А. Богданова, МГУ, 1970. <sup>11</sup> R. W. Chambers, Biochemistry, v. 4, 219 (1965).