



УДК 511.113.4

© 1993 Е. А. Широкова, А. В. Шипицын,  
Е. В. Кузнецова, Л. С. Викторова, А. А. Краевский

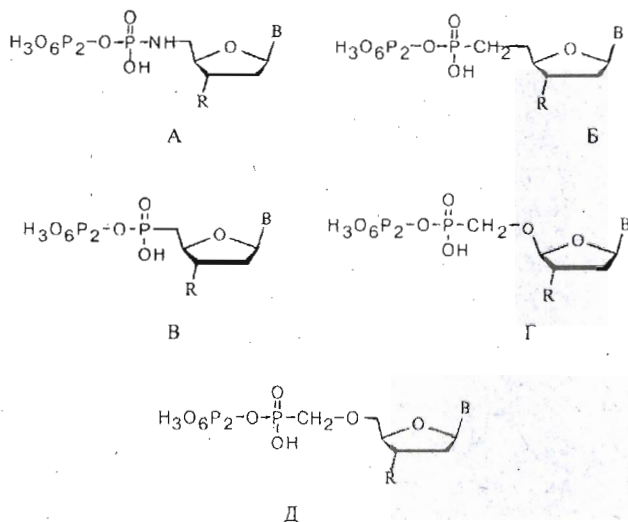
### 5'-S-НУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТЫ. СИНТЕЗ И СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА В ТЕСТАХ С ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ

*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

В целях изучения свойств ДНК-полимераз в реакциях биосинтеза ДНК исходя из 3'-О-ацетилтимидина и 3'-дезокситимидина синтезированы соответственно 5'-S-трифосфаты 5'-меркапто-5'-дезокситимидина и 5'-меркапто-3',5'-дидезокситимидина. Изучение полученных трифосфатных соединений в бесклеточных системах с ДНК-полимеразами показало, что 5'-меркапто-5'-дезокситимидин-5'-S-трифосфат проявил слабые субстратные свойства, включаясь только один раз в 3'-конец растущей цепи ДНК при катализе процесса ДНК-полимеразой I и обратной транскриптазой ВМП. В то же время ДНК-полимераза  $\alpha$  из плаценты человека и ДНК-полимераза  $\beta$  из печени крысы, а также обратная транскриптаза ВИЧ с названным соединением не взаимодействовали совсем. 5'-Меркапто-3',5'-дидезокситимидин-5'-S-трифосфат не элонгировал цепь ДНК при катализе каким-либо из вышеназванных ферментов. Обсуждаются возможные причины резкого снижения субстратных свойств синтезированных соединений по сравнению с природными субстратами ДНК-полимераз.

Как известно, во всех природных ДНК и РНК нуклеотидные остатки связаны между собой фосфатными группами и углевод-фосфатные звенья цепи организуют пространственно регулярные полинуклеотидные цепи, способные образовывать дуплексы всех известных видов, взаимодействовать с соответствующими регуляторными белками и ферментами и выполнять все другие функции, характерные для ДНК и РНК. Активные центры катализирующих синтез ДНК и РНК ферментов — ДНК-полимераз и РНК-полимераз также пространственно соответствуют связыванию природных субстратов — нуклеозидтрифосфатов (dNTP и rNTP). В свою очередь, кислород при C5' выполняет функцию звена, связывающего трифосфатный остаток с нуклеозидным компонентом. Поэтому его замена на звено какой-либо другой химической природы может существенно повлиять как на конформационные, так и на электронные свойства аналогов субстратов dNTP и rNTP, в первую очередь на  $\alpha$ -фосфатный остаток, непосредственно участвующий в реакции образования фосфоэфирной связи.

В литературе описаны замещения кислорода при C5' в dNTP и rNTP на NH-группу (тип А) [1],  $\text{CH}_2$ -группу (Б) [2], исключения кислорода с образованием



где R = OH или H, B - гетероциклическое основание.

связи P—C (B) [3], изменения положений 5'O и 5'CH<sub>2</sub> (Г) [4], удлинения на одну CH<sub>2</sub>-группу (Д) [5, 6] (формулы А—Д).

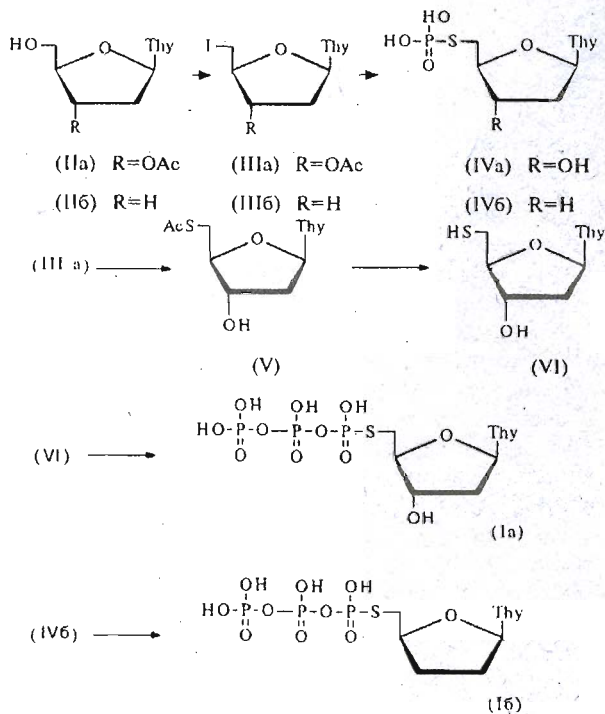
Соединения типа Г достаточно эффективно замещают природный dNTP в реакции с обратной транскриптазой ВИЧ, соединения типа Д в 100—200 раз менее активны, чем dNTP, при катализе синтеза ДНК тем же ферментом, а также другими обратными транскриптазами ретровирусов. Соединения типа А включаются в ДНК относительно эффективно ДНК-полимеразой I (константа Михаэлиса в 60 раз выше, чем для dNTP), а соединения типа В субстратами этого фермента не являются. 3'-Азидопроизводное типа Б было в 1000 раз более слабым терминаторным субстратом синтеза ДНК при катализе процесса обратной транскриптазой ВИЧ.

Нами осуществлен синтез 5'-меркапто-5'-дезокситимидин-5'-S-трифосфата (Ia) и его 3'-дезоксипроизводного (Iб) и изучены их субстратные свойства по отношению к нескольким ДНК-полимеразам.

Исходными соединениями для синтеза 5'-S-трифосфатов 5'-меркапто-5'-дезокситимидина (Ia) и 5'-меркапто-3',5'-дидезокситимидина (Iб) послужили 3'-O-ацетилтимидин (IIa) и 3'-дезокситимидин (IIб) соответственно (схема 1). Мезилирование последних и нагревание полученных 5'-мезилатов до 70° С в присутствии KI в DMF гладко приводит к соответствующим 5'-йодо-5'-дезоксипроизводным (IIIa,б). При взаимодействии иодидов (IIIa,б) с тринатриевой солью ортофосфорной кислоты в условиях работы [7] в обоих случаях с высоким выходом (70—75%) получают 5'-S-монофосфаты 5'-меркапто-5'-дезокситимидина (IVa) и 5'-меркапто-3',5'-дидезокситимидина (IVб). В случае (IIIa) одновременно с реакцией тиофосфорилирования по 5'-положению протекает гидролитическое отщепление 3'-ацетильной группы и соединение (IVa) является единственным продуктом реакции. Структура полученных 5'-S-фосфатов подтверждается данными физико-химического анализа. В спектрах <sup>1</sup>H-ЯМР наблюдается сдвиг сигналов протонов 5'-CH<sub>2</sub>-группы в область сильного поля на 1 м.д. по сравнению с природными нуклеозид-5'-фосфатами. Это согласуется с данными для 3'-S-фосфатов, приведенных в работе [8]. Реакция S-фосфата (IVб), активированного N,N'-карбонилдиимидазолом, с бис(трибутил)аммониевой солью пиррофосфорной кислоты приводит к целевому трифосфату (Iб). Аналогичная реакция (IVa) не привела к образованию нового продукта, поэтому мы использовали иной подход к синтезу трифосфата (Ia). Иодид (IIIa) действием тиоуксусной кислоты и тиосульфата калия превращали в 5'-ацетилтио-5'-деокси-3'-O-ацетилтимидин (V), который гидролизовали в 5'-меркапто-5'-де-

зокси тимидин (VI) под действием аммиака в водно-метанольном растворе. Полученный тиол (VI) нестабилен и способен быстро окисляться в соответствующий дисульфид. При этом для соединения (VI) при переходе от нейтральной среды к кислой в УФ-спектре нами не было замечено изменения максимума поглощения, как описано для 5'-меркапто-5'-дезоксиуридина [9]. В то же время по ИК-спектру мы наблюдали быстрое исчезновение SH-полосы в области 2580 см<sup>-1</sup>. Это позволяет предположить, что в случае тимидина процесс окисления в дисульфид преобладает над реакцией внутримолекулярной циклизации, описанной в работе [9]. Для предотвращения окисления нуклеозид (VI) перед использованием выдерживали 1 ч в среде меркаптоэтанола.

Схема 1

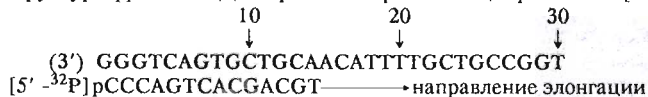


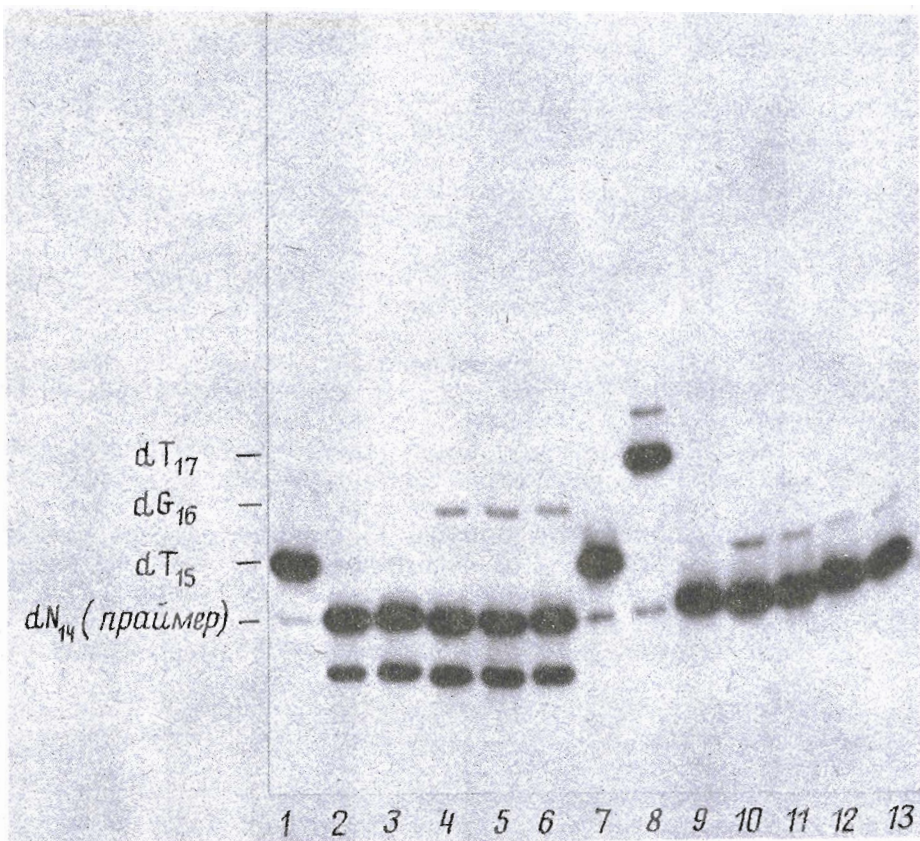
Для фосфорилирования нуклеозида (VI) мы использовали реакцию с POCl<sub>3</sub> и имидазолом в триэтилфосфате. Последующее действие бис(трибутиламмоний)пирофосфата приводит к 5'-трифосфату 5'-меркапто-5'-дезокси тимидина (Ia).

Соединения (Ia) и (Ib) мы исследовали в бесклеточной системе с ДНК-полимеразой I и обратными транскриптазами ВИЧ и ВМП, с ДНК фага M13mp10 в качестве матрицы и с [5'-<sup>32</sup>P]тетрануклеотидным праймером (схема 2).

Схема 2

Структура фрагмента ДНК фага M13mp10 с ассоциированным [5'-<sup>32</sup>P] праймером





Радиоавтограмма электрофоретического разделения продуктов реакции, катализируемой ДНК-полимеразой I (дорожки 1—6) и обратной транскриптазой ВМП (дорожки 7—13). Условия реакции: инкубационная масса в объеме 6 мкл содержала 17 нМ комплекс [матрица + праймер] и 0,8 ед. акт. ДНК-полимеразы I (10 мин, 20° С) либо 2 ед. акт. обратной транскриптазы (15 мин, 37° С). Дорожки 1 и 7 — [матрица + праймер] + 5 мкМ dTTP; 2,3 и 9,10 — [матрица + праймер] + (Ia), 20 и 100 мкМ; 8 — как 7 + 5 мкМ dGTP; 4 и 11 как 3 и 10 соответственно + 5 мкМ dGTP; 5 и 12 — как 4 и 11 соответственно + 10 мкМ ddATP; 6 и 13 — как 4 и 11 соответственно + 5 мкМ dATP. Слева указано положение олигонуклеотидных стандартов

На рисунке показаны результаты, полученные в системе с неполным набором субстратов с ДНК-полимеразой I и обратной транскриптазой ВМП. Как видно из дорожек 2,3, 9,10, имеет место очень незначительное включение трифосфата (Ia) в 3'-конец исходного 14-членного праймера, возрастающее с увеличением концентрации (Ia), введенного в реакцию. В присутствии соединения (Ia) и dGTP (дорожки 4—6 и 11—13) праймер удлиняется на 2 остатка. При этом отмечается, что в случае ДНК-полимеразы I весь пентадекануклеотид переходит в гексадекануклеотид, тогда как для обратной транскриптазы ВМП только часть пентадекануклеотида превращается в гексадекануклеотид. Еще одной особенностью опытов с ДНК-полимеразой I является образование гексадекануклеотида, более интенсивное, чем пентадекануклеотида (ср. дорожки 3 и 4). Мы объясняем это достаточно эффективным гидролитическим удалением мононуклеотидного остатка (IVa) из пентадекануклеотида за счет 3' → 5'-экзонуклеазной активности этого фермента (которая обуславливает также образование тридекануклеотида из праймера, см. дорожки 2—6). Но если в инкубационной смеси присутствует также dGTP, проходит реакция элонгации еще на одно звено с образованием гексадекануклеотида, и избыток в реакционной среде dGTP за счет уравнивающих

друг друга реакций его включения в растущую цепь и  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазного гидролиза (турновера) консервирует ситуацию. Для обратной транскриптазы ВМП, не имеющей  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активности, включение нуклеотидного остатка из трифосфата (Ia) происходит несколько быстрее, чем присоединение к образовавшемуся пентадекануклеотиду остатка из dGTP.

Полученные данные показывают, что трифосфат (Ia) способен не только один раз включаться в  $3'$ -конец растущей цепи (хотя и с очень низкой эффективностью), но также элонгироваться еще на одно звено природным dNTP. Вторичное присоединение остатка (Ia) не наблюдается ни для одного из ферментов, так как на дорожках отсутствует полоса гептадекануклеотида, хотя по программе матрицы 17-м нуклеотидным остатком является тимидин-5'-фосфат.

2',3'-Дидезоксипроизводное (Iб) не включалось ни одним из вышеназванных ферментов. Кроме того, (Ia) и (Iб) не включались в ДНК при катализе процесса ДНК-полимеразой  $\alpha$  из плаценты человека, ДНК-полимеразой  $\beta$  из печени крысы и обратной транскриптазой ВИЧ (данные не приводятся).

Как видно из приведенного выше материала, замещение кислорода на серу при C5' в dNTP практически лишает такие модифицированные dNTP субстратных свойств; только незначительное однообразное включение нуклеотидного остатка наблюдается под действием ДНК-полимеразы I и обратной транскриптазы ВМП. Включение трифосфата (Ia) значительно менее эффективно, чем соединений типа Д, несмотря на то что в последних у C-5' вместо атома серы имеется дополнительная  $\text{CH}_2$ -группа. Можно предположить, что решающее значение здесь имеет угол, образуемый связями, идущими от серы (около  $92^\circ \text{C}$ ), и отличающийся от такового для кислорода ( $105^\circ \text{C}$ ), определяющий взаиморасположение 5'-трифосфатной части и сахарного остатка. Существенное значение может иметь и объем атома серы, препятствующий допускаемому параметрами активного центра ДНК-полимераз включению нуклеотидного остатка с 5'-S в цепь ДНК.

Обращает на себя внимание также более высокая специфичность обратной транскриптазы ВИЧ по сравнению с ферментом ВМП по отношению к соединению (Ia).

### Экспериментальная часть

Пиридин и DMF фирмы Aldrich перегоняли над  $\text{CaH}_2$ , MeCN — над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . В работе использовали сферон DEAE 1000 (Chemapol, ЧР), DEAE Toyoparl-650M (Toyosoda, Япония), силикагель Kieselgel 60 (0,025—0,04 мк; Fluka). УФ-спектры получены на спектрофотометре Specord M10.  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектры регистрировали на приборе Varian XL-100 $\times$ 15 (внутренний стандарт — трет-бутанол),  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектры — на приборе Bruker 250 в  $\text{D}_2\text{O}$  (внутренний стандарт — триметилфосфат). Масс-спектры в режиме FAB получены на спектрометре Kratos MS 50TC (образцы смешивали с глицерином). ДНК-полимераза I — препарат фирмы Amersham. ДНК-полимеразы ( $\beta$  из печени крысы и  $\alpha$  из плаценты человека) выделены по методикам, описанным в работах [10] и [11] соответственно. Обратная транскриптаза ВМП предоставлена Омутнинским химическим заводом. Обратная транскриптаза ВИЧ-I выделена Т. А. Розовской и Р. Ш. Бибилашвили (РКНЦ РАМН)\*.

5'-Иодо-5'-дезокси-3'-О-ацетилтимидин (IIIa) и 5'-иодо-3', 5'-дидезокситимидин (IIIб). К раствору 520 мг нуклеозида (IIa) или 450 мг (2 ммоль) нуклеозида (IIб) в 3 мл пиридина при 5—10° С прибавляли 171 мкл (2,2 ммоль) мезилхлорида, реакционную смесь выдерживали 2 ч при комнатной температуре. Раствор упаривали, остаток разбавляли 10 мл хлороформа, экстрагировали насыщ.  $\text{NaHCO}_3$  (2 $\times$ 4 мл), водой (3 $\times$ 5 мл), органический слой сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали. Остаток разбавляли 4 мл DMF, прибавляли 330 мг (2 ммоль) прокаленного KI и суспензию нагревали при 70° С в течение 40 мин до выпадения гелеоб-

\* Статья об этом будет опубликована в журнале «Молекулярная биология».

разного осадка. Реакционную смесь охлаждали, разбавляли 3 мл воды; экстрагировали хлороформом (3×5 мл), промывали раствором тиосульфата натрия (1×3 мл), водой (2×3 мл), сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривали.

(IIIa): выход 550 мг (70%). УФ (MeOH),  $\lambda_{\text{max}}$  267,5 нм. Масс-спектр ( $m/z$ ): 395 ( $M^+$ ).

(IIIб): выход 280 мг (81%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , м.д. ( $J$ , Гц): 7,43д ( $J_{6, \text{CH}_3}$  1,0, 1H, 6H), 6,15—6,0м (1H, H1'), 4,10—3,90м (1H, H4'), 3,44д ( $J_{5', 4'}$  5,0, 2H, H5'), 2,40—1,90м (4H, H3', H2'), 1,96д (3H,  $\text{CH}_3$ ).

5'-Меркапто-5'-дезокситимидин-5'-S-монофосфат, диаммониевая соль (IVa) и 5'-меркапто-3', 5'-дезокситимидин-5'-S-монофосфат, диаммониевая соль (IVб). К раствору 200 мг иодида (IIIa) или 180 мг (0,5 ммоль) иодида (IIIб) в 1 мл DMF прибавляли раствор 450 мг (1,25 ммоль)  $\text{PS}(\text{ONa})_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  и смесь нагревали при 40—45° С и перемешивали в течение 2 ч. После охлаждения реакционную смесь разбавляли 10 мл спирта, выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток хроматографировали на колонке (15×2 см) с DEAE-сфероном ( $\text{HCO}_3^-$ ) в градиенте 0 → 0,15 М бикарбоната аммония (суммарный объем 400 мл). Продукт элюируется при концентрации буфера 0,08—0,09 М.

(IVa): выход 130 мг (70%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ , м.д. ( $J$ , Гц): 7,59с (1H, H6), 6,25т ( $J_{1', 2'}$  6,5, 1H, H1'), 4,60—4,48м (1H, H4'), 4,20—4,15м (1H, H3'), 3,07д, 2,97д ( $J_{5', 4'} = J_{5', 4'}$  6,0, 2H, H5'), 2,45—2,33м (2H, H2'), 1,94с (3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР,  $\delta$ , м.д. ( $J$ , Гц): 16,76дд ( $J$  9,8; 8,1).

(IVб): выход 275 мг (74%). УФ (вода),  $\lambda_{\text{max}}$ , нм: 268,5, pH 7,0; 266, pH 12,0.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ , м.д. ( $J$ , Гц): 7,47д ( $J_{6, \text{CH}_3}$  1,0, 1H, 6H), 6,09дд ( $J_{1', 2'}$  4,0, 6,0, 1H, H1'), 4,4—4,2м (1H, H4'), 3,10д, 2,99д ( $J_{5', 4'} = J_{5', 4'}$  = 6,0, 2H, H5'), 2,4—1,9м (4H, 2H3', 2H2'), 1,92д (3H,  $\text{CH}_3$ ).

5'-Ацетилтио-5'-дезоксидеокси-3'-О-ацетилтимидин (V). Раствор 400 мг иодида (IIIa), 230 мг (2 ммоль) тиацетата калия и 110 мкл (1,5 ммоль) тиюксусной кислоты в 20 мл смеси спирт — ацетон (1 : 1) нагревали 3 ч при кипении. Осадок отфильтровывали, промывали ацетоном (2×5 мл), к фильтрату прибавляли 90 мкл уксусной кислоты и реакционную смесь упаривали. Остаток растворяли в 20 мл смеси хлористый метилен — пентан (9 : 1) и промывали водой (2×5 мл). Органический слой упаривали, остаток хроматографировали на колонке (2,5×15 см) с силикагелем, элюируя хлороформом. Выход 250 мг (75%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),  $\delta$ , м.д. ( $J$ , Гц): 6,89д ( $J_{6, \text{CH}_3}$  1,5, 1H, H6), 5,89—5,75м (1H, H1'), 3,95—3,70м (1H, H4'), 3,40—3,22м (1H, H3'), 2,93д ( $J_{5', 4'}$  6,0, 2H, H5'), 2,03с (3H,  $\text{CH}_3\text{COO}-3'$ ), 1,75с (3H,  $\text{CH}_3\text{COS}$ ), 1,60д (3H,  $\text{CH}_3$ ). Масс-спектр ( $m/z$ ): 343 ( $M^+$ ).

5'-Меркапто-5'-дезокситимидин (VI). К раствору 340 мг (1 ммоль) соединения (V) в 10 мл метанола добавляли 1 мл 25%-ного раствора аммиака и 80 мкл меркаптоэтанола, выдерживали 3 ч при комнатной температуре и затем упаривали. Остаток наносили на колонку с силикагелем (2,5×15 см), элюировали смесью хлороформ — спирт (9 : 1). К фракции, содержащей тиол (IV), прибавляли 80 мкл меркаптоэтанола и после 1 ч при комнатной температуре упаривали. Выход 200 мг (77%). УФ (вода),  $\lambda_{\text{max}}$ , нм: 266, pH 7,0; 266, pH 2,0; 265, pH 11,0.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$ , м.д. ( $J$ , Гц): 7,45д ( $J_{6, \text{CH}_3}$  1,0, 1H, 6H), 6,40—6,27м (1H, H1'), 3,96—3,64м (2H, H3', H4'), 2,97д, 2,90д ( $J_{5', 4'} = J_{5', 4'}$  = 6,0, 2H, H5'), 2,56—2,44м (2H, H2'), 1,92д (3H,  $\text{CH}_3$ ).

5'-Меркапто-5'-дезокситимидин-5'-S-трифосфат (Ia). К раствору 409 мг (6 ммоль) имидазола и 835 мкл триэтиламина в 9 мл ацетонитрила прибавляли при перемешивании и 0° С 187 мкл (2 ммоль) хлорокси фосфора, перемешивали 30 мин при комнатной температуре и осадок отделяли. Полученный раствор трис(N-имидазол)фосфата прибавляли к 140 мг (0,55 ммоль) тиола (VI), свежепаренного с 42 мкл меркаптоэтанола в 1 мл метанола. Реакционную смесь перемешивали 16 ч при 4° С, после чего прибавляли 5 мл 0,5 М раствора бис(трибутиламмоний)-

пирофосфата и 800 мкл (5,5 ммоль) трибутиламина и перемешивали 26 ч при комнатной температуре. Раствор упаривали в вакууме при 10—20° С для удаления ацетонитрила, остаток разбавляли 500 мл воды и хроматографировали на колонке (2×15 см) с DEAE-сфероном (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>), элюируя линейным градиентом буфера (0 → 0,5 М) бикарбоната аммония, рН 7,5. Общий объем 300 мл. Трифосфат (Ia) элюируется при концентрации буфера 0,3 М. Выход 8 мг. УФ (вода), λ<sub>max</sub> 267 нм. <sup>31</sup>P-ЯМР (D<sub>2</sub>O), δ, м.д., с подавлением фосфор-протонного спин-спинового взаимодействия (J, Гц): -5,62д (J 18,0, α), -10,27д (J 17,0, γ), -21,27м (J 17,0, 18,0, β).

5'-Меркапто-3', 5'-дидезокситимидин-5'-S-трифосфат (Iб). К раствору 22 мг (0,06 ммоль) S-фосфата (IVб) в 0,5 мл DMF прибавляли 22 мкл (0,09 ммоль) трибутиламина и раствор упаривали в вакууме масляного насоса. К остатку прибавляли 3 мл DMF и 70 мг (0,4 ммоль) N, N'-карбонилдимидазола, перемешивали 1 ч, прибавляли 1 мл 0,5 М бис(трибутиламмоний)пирофосфата и реакционную смесь перемешивали еще 5 ч при комнатной температуре. Смесь разбавляли 5 мл холодной воды и вещество хроматографировали на колонке (2×10 см) с Тоуорearl-DEAE (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>), элюируя линейным градиентом (0 → 0,3 М) бикарбоната аммония, рН 7,5. Общий объем 300 мл. Выход 7 мг. УФ (вода), λ<sub>max</sub> 266,5 нм. <sup>31</sup>P-ЯМР-спектр (D<sub>2</sub>O), δ, м.д. (J, Гц): -5,74д (J 18,0, α), -10,32д (J 18,0, γ), -22,14т (18,0, β).

Опыты в бесклеточных системах с ДНК-полимеразами проведены на ДНК фага H13mp10 в качестве матрицы, а праймером служил тетрадекануклеотид, меченный по 5'-концу введением [<sup>32</sup>P]фосфата, как указано в схеме 2. Условия эксперимента описаны в работе [12].

Работа финансировалась госбюджетом РФ и Государственной программой «Борьба с наиболее распространенными заболеваниями. СПИД». Гранты sp38 и sp290.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Letsinger R. L., Wilkers J. S., Dumas L. B. // *Biochemistry*. 1976. V. 15. № 5. P. 2810—2816.
2. Freeman G. A., Rideout J. L., Miller W. H., Reardon J. E. // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. № 17. P. 3192—3196.
3. Rammner D. H., Yengoyan L., Paul A. V., Vax P. C. // *Biochemistry*. 1967. V. 6. № 13. P. 1828—1837.
4. Coe D. M., Roberts S. M., Storer R. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*. 1992. № 9. P. 2695—2704.
5. Кулессо Т. Ю., Тарусова Н. Б., Атражева Е. Д., Куханова М. К., Шуленин С. В., Бобков А. Ф., Гараев М. М., Галегов Г. А., Краевский А. А. // *Биоорганическая химия*. 1990. Т. 16. № 4. С. 530—536.
6. Jie L., Van Aerschot A., Balzarini J., Johnssen G., Busson R., Hoodmartens J., DeClercq E., Herdewijn P. // *J. Med. Chem.* 1990. V. 33. № 17. P. 2481—2486.
7. Hampton A., Brox L. W., Bayer M. // *Biochemistry*. 1969. V. 8. № 6. P. 2303—2310.
8. Morr M., Ernst L., Mengel K. // *Lieb. Ann. Chem.* 1982. № 4. P. 651—655.
9. Bannister B., Kagan F. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1960. V. 82. № 13. P. 3363—3368.
10. Атражева А. М., Куханова М. К. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. № 12. С. 1627—1635.
11. Мозжерин Д. Ю., Атражева А. М., Куханова М. К. // *Молекулярная биология*. 1992. Т. 26. № 5. С. 999—1010.
12. Vištorova L. S., Dyatkina N. B., Mozherin D. Ju., Atrazhev A. M., Krayevsky A. A., Kukhanova M. K. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 4.

Поступила в редакцию  
13.V.1993

*E. A. Shirokova, A. V. Shipitsin, E. V. Kuznetsova,  
L. S. Victorova, A. A. Krayevsky*

**5'-S-NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATES. SYNTHESIS AND SUBSTRATE  
PROPERTIES IN TESTS WITH DNA POLYMERASES**

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,  
Moscow*

In the course of our investigations on DNA polymerases a synthesis of new triphosphate analogues, 5'-mercapto-5'-deoxythymidine 5'-S-triphosphate and 5'-mercapto-3',5'-dideoxythymidine 5'-S-triphosphate, was brought about starting from 3'-O-acetyl-thymidine and 3'-deoxythymidine, respectively. The former compound proved to be a weak substrate for *E. coli* DNA polymerase I and AMV reverse transcriptase and inactive towards DNA polymerases  $\alpha$  from placenta and  $\beta$  from rat liver. The second synthesized triphosphate was incorporated into DNA chain by none of the tested enzymes. Probable reasons for so strong a decrease in the substrate properties of the prepared compounds are discussed.