



УДК 547.963.32+577.155.2

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

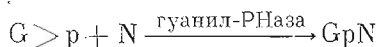
XXIII *. СИНТЕЗ ТРИНУКЛЕОЗИДДИФОСФАТОВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ
ГУАНИЛСПЕЦИФИЧНЫМИ РИБОНУКЛЕАЗАМИ

Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И.

*Институт биологической физики и Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР, Пущино*

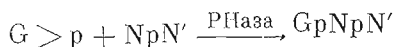
Показано, что гуанилспецифичные рибонуклеазы, продуцируемые микроскопическими грибами *Aspergillus clavatus* и *Penicillium chrysogenum* 152A, могут быть использованы для синтеза тринуклеозиддифосфатов, имеющих на 5'-конце остаток гуанозина или пьозина. Более эффективна в синтезе тринуклеозиддифосфатов рибонуклеаза *Asp. clavatus*. Осуществлен синтез GpCpC, GpUpC, GpApC, GpApU, GpCpU и GpApC, соответствующих антикодоновым участкам некоторых транспортных РНК.

Для структурно-функциональных исследований рибонуклеиновых кислот и ферментов, катализирующих их превращения, необходимы олигорибонуклеотиды, имеющие на 5'-конце остаток гуаниловой кислоты. Удобным и эффективным способом их получения может быть энзиматический синтез, в котором образование 3'—5'-межнуклеотидной связи между остатком гуаниловой кислоты и другим нуклеозидом, нуклеотидом или олигонуклеотидом происходит при участии гуанилспецифичной рибонуклеазы [2—4]:



где N — нуклеозид, нуклеотид или олигонуклеотид со свободной 5'-гидроксильной группой.

Ранее нами было показано, что гуанилспецифичные рибонуклеазы, продуцируемые микроскопическими грибами *Penicillium brevicompactum*, *P. chrysogenum* 152A и *Aspergillus clavatus*, обладают высокой синтетической активностью и могут быть использованы для синтеза динуклеозидмонофосфатов как из нативных, так и из модифицированных субстратов [5]. В настоящей работе мы применили эти ферменты для синтеза тринуклеозиддифосфатов, соответствующих антикодоновым участкам некоторых транспортных РНК (валиновой из дрожжей, *T. utilis*, *E. coli* K12; сериновой и глициновой из *E. coli*; аспарагиновой и глициновой из дрожжей и т. д.). Синтез осуществляли по схеме



в условиях, описанных для рибонуклеазы T₁ [6]. В качестве акцептора фосфата использовали динуклеозидмонофосфаты, полученные фермента-

* Сообщение XXII см. [1].

Таблица 1

Синтез тринуклеозиддифосфатов с участием гуанилспецифичных рибонуклеаз

GpNpN'	РНаз	Состав реакционной смеси, %			Выход GpNpN' на израсходованный G>p, %
		GpNpN'	Gp	G>p	
GpCpC	<i>Asp. clav.</i>	33,3	11,0	55,7	75,1
	<i>P. chrys.</i>	13,7	24,8	61,5	35,5
GpUpC	<i>Asp. clav.</i>	4,9	15,5	79,6	23,9
GpApC	»	7,1	47,7	45,2	13,0
	<i>P. chrys.</i>	2,0	40,0	58,0	4,8
GpApU	<i>Asp. clav.</i>	10,0	27,7	62,3	26,5
GpCpU	»	9,2	19,3	71,5	35,8
	<i>P. chrys.</i>	3,0	15,2	81,8	16,2
IpApC	»	5,7	20,0	74,3	22,2

Таблица 2

Характеристики тринуклеозиддифосфатов

GpNpN'	R_f^*	E_{Gp}	Ферментативный гидролиз		
			РНаз	продукты	отношение оснований
GpCpC	0,69	0,76	<i>P. clavif.</i> **	Gp, Cp, C	1:0,98:0,90
GpUpC	—	0,77	»	Gp, Up, C	1:1,03:0,98
GpApC	1,0	0,83	<i>P. chrys.</i> ***	Gp, ApC	1,15:1
GpApU	—	0,79	<i>P. clavif.</i>	Gp, Ap, U	1:0,80:1,1
GpCpU	1,04	0,76	»	Gp, Cp, U	1:0,92:1,2
IpApC	0,70	0,76	<i>P. chrys.</i>	Ip, ApC	1:1

* Определены относительно 5'-нуклеотида в системе B.

** Неспецифичная рибонуклеаза *Penicillium claviforme* [7].*** Гуанилспецифичная рибонуклеаза *Penicillium chrysogenum* [5].

Таблица 3

УФ-спектры тринуклеозиддифосфатов в воде

GpNpN'	λ_{\max}	λ_{\min}	D_{250}/D_{260}	D_{270}/D_{260}	D_{285}/D_{260}	D_{290}/D_{260}
GpCpC	262	231	0,96	0,99	0,75	0,34
GpUpC	258	230	0,98	0,91	0,65	0,28
GpApC	258	230	0,95	0,83	0,55	0,21
GpApU	258	230	0,89	0,77	0,42	0,15
GpCpU	258	230	0,97	0,90	0,61	0,25
IpApC	260	238	0,97	0,92	0,72	0,49

тивным способом при участии неспецифичной рибонуклеазы *P. claviforme* [7] или панкреатической рибонуклеазы [8] и не расщепляемые гуанилспецифичными ферментами. Результаты синтеза приведены в табл. 1.

Из двух исследованных ферментов более эффективной в синтезе тринуклеозиддифосфатов оказалась рибонуклеаза *Asp. clavatus*. Даже в тех случаях, когда «равновесная» концентрация тринуклеозиддифосфата в реакционной смеси невелика, высокое отношение «синтез/гидролиз» [9], характерное для этих ферментов, приводит к удовлетворительному выходу тринуклеозиддифосфатов. Выход зависит от структуры как 5'-, так и 3'-нуклеозидного остатка в динуклеозидмонофосфате — акцепторе фосфата. При изменении 5'-концевого нуклеозида выход уменьшается в ряду C > U > A. Это совпадает с результатами, полученными для рибонуклеазы

T₁ [6]. Влияние 3'-концевого нуклеозида не так однозначно и зависит от 5'-концевого нуклеозида: например, если 5'-нуклеозидом является С, выход уменьшается в порядке: С > U; для 5'-аденозиновых динуклеозидмонофосфатов выход уменьшается в обратном порядке: U > С.

Таким образом, гуанилспецифичная рибонуклеаза *Asp. clavatus* (C₂) может быть успешно применена для синтеза тринуклеозиддифосфатов, имеющих на 5'-конце остаток гуаниловой кислоты. Выходы тринуклеозиддифосфатов сопоставимы, а в некоторых случаях превосходят выходы, полученные для рибонуклеазы T₁ [2—4, 6]. Замена G > p на I > p, как и в случае динуклеозидмонофосфатов [5], дает более высокий выход олигонуклеотида (см. табл. 1).

Выделение и анализ тринуклеозиддифосфатов осуществляли стандартными методами [1, 4, 6]. Характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 2, 3.

Экспериментальная часть

В работе использовали Ва²⁺-соль гуанозин-2',3'-циклофосфата фирмы Calbiochem (США), которую превращали в аммонийную соль обработкой дауэксом 50 W (NH₄⁺-форма). Инозин-2',3'-циклофосфат (NH₄⁺-соль) получали по методике, охарактеризованной в работе [10]. Динуклеозидмонофосфаты синтезировали как описано в работах [7, 8]. Выделение и очистку внеклеточных гуанилспецифичных рибонуклеаз *Asp. clavatus* и *P. chrysogenum* 152 А (КФ 2.7.7.26) осуществляли в соответствии с работами [11, 12]. За единицу активности принимали количество рибонуклеазы, способное расщепить 1 мкмоль гуанозин-2',3'-циклофосфата за 30 мин при 37°.

Хроматографию, электрофорез на бумаге и УФ-спектрофотометрию, а также установление структуры олигонуклеотидов проводили в условиях, описанных в работах [5, 7, 8].

Синтез тринуклеозиддифосфатов. Буферный раствор (0,1 мл Трис-НСl, рН 7,6), содержащий гуанозин-2',3'-циклофосфат, динуклеозидмонофосфат и фермент, инкубировали при ~ 4°. Начальные концентрации субстратов и фермента составляли 0,02; 0,1 М и 4 ед/мл соответственно. Через 6 ч реакционные смеси наносили на бумагу и хроматографировали в смеси растворителей этанол — конц. аммиак — вода (65 : 10 : 25) (А) или пропанол-2 — конц. аммиак — вода (7 : 1 : 2) (Б), после чего полосы, содержащие тринуклеозиддифосфат и гуанозин-2'(3')-фосфат, а также динуклеозидмонофосфат и гуанозин-2',3'-циклофосфат соответственно разделяли с помощью электрофореза на бумаге в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония. Тринуклеозиддифосфат дополнительно очищали повторной хроматографией на бумаге в одной из упомянутых выше систем растворителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhenodarova S. M., Klyagina V. P., Smolyaninova O. A., Khabarova M. I., Antonovich E. G., Prokof'ev M. A. (1977) *Nucleic Acids Res.*, 4, 2099—2107.
2. Scheit K.-H., Cramer F. (1964) *Tetrahedron Lett.*, 2765—2767.
3. Sekiya T., Furuichi Y., Yoshida M., Ukita T. (1968) *J. Biochim.*, 63, 514—521.
4. Mohr S. C., Thach R. E. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 6566—6576.
5. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. (1976) *Биоорганич. химия*, 2, 1111—1116.
6. Grünberger D., Holý A., Šorm F. (1968) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 33, 286—297.
7. Гуляева В. И., Женодарова С. М. (1972) 5219—72 *Деп. ВИНТИ от 20.12.72.*
8. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолявинова О. А. (1972) *Ж. общ. химии*, 44, 446—451.
9. Женодарова С. М. (1974) в сб. *Нуклеазы микроорганизмов под ред. А. М. Безбородова*, с. 300—326, «Наука», М.

10. Пономарева В. М., Женодарова С. М. (1972) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2632.
11. Морозова В. Г., Безбородова С. И. (1972) Биохимия, 37, 959—965.
12. Безбородова С. И., Грищенко В. М., Маркелова Н. Ю. (1973) Биохимия, 38, 336—343.

Поступила в редакцию
22.II.1977

После доработки
6.VI.1977

STEP-WISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXIII. THE SYNTHESIS OF TRINUCLEOSIDE DIPHOSPHATES CATALYZED BY GUANYLSPECIFIC RIBONUCLEASES

ZHENODAROVA S. M., GULYAEVA V. I., BEZBORODOVA S. I.

*Institute of Biological Physics and Institute of Biochemistry
and Physiology of Microorganisms, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

The synthesis of trinucleoside diphosphates having at 5'-end guanosine or inosine can be carried out with guanylspecific ribonucleases from fungi (*Penicillium chrysogenum* 152 A, *Aspergillus clavatus*). RNase *Asp. clavatus* is more effective in the synthesis of trinucleoside diphosphates. The synthesis has been performed of GpCpC, GpUpC, GpApC, GpApU, GpCpU and IpApC, which correspond to anticodon sites of some tRNAs.
