



УДК 547.963.3+577.155.2

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXIV *. 5-ЗАМЕЩЕННЫЕ ПИРИМИДИНОВЫЕ НУКЛЕОЗИДЫ
КАК АКЦЕПТОРЫ ФОСФАТА В СИНТЕЗЕ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ СВЯЗИ
С УЧАСТИЕМ РИБОНУКЛЕАЗ РАЗЛИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИЖенодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А.,
Соболева И. А., Хабарова М. И.

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино

Изучено влияние заместителя в положении 5 пириимидиновых нуклеозидов — акцепторов фосфата — на синтез динуклеозидмонофосфатов CpN, GpN и ApN в реакции с 2',3'-циклофосфатами с участием рибонуклеаз A, T₁ и *Penicillium brevicompactum*, имеющих разную субстратную специфичность.

Рибонуклеазы, различающиеся по своей специфичности, могут катализировать синтез межнуклеотидной связи, используя как нативные, так и модифицированные субстраты [2—4]. Многочисленные исследования рибонуклеаз, как правило, связаны с изучением влияния структуры субстрата на гидролиз межнуклеотидной связи [5, 6]. При изучении механизма синтеза межнуклеотидной связи необходимо учитывать влияние двух субстратов — донора и акцептора фосфата. Ранее, используя замещенные в положении 3 и/или 4 цитидин и уридин, мы провели частичное «зондирование» в различных рибонуклеазах контактных участков, соответствующих акцептору фосфата [7, 8]. В настоящей работе мы изучили влияние заместителя в положении 5 пириимидинового акцептора фосфата на синтез межнуклеотидной связи, катализируемый рибонуклеазами различной специфичности: пириимидинспецифичной РНКазой A, гуанилспецифичной РНКазой T₁ и неспецифичной РНКазой *Penicillium brevicompactum*. Мерой активности акцептора фосфата, как и в предыдущих работах [7, 8], служил выход динуклеозидмонофосфата. Синтез динуклеозидмонофосфатов осуществляли в стандартных условиях [4, 9], реакционные смеси анализировали методами электрофореза или хроматографии на бумаге, отбирая пробы через определенные промежутки времени. Акцепторами фосфата служили следующие производные цитидина и уридина: 5-метилдезоксицитидин (m^5C_d) **, 5-бромдезоксицитидин (br^5C_d), 5-гидроксицитидин (jc^5C_d), 5-азацитидин (z^5C), 5-метилуридин (m^5U), 5-метилдезоксиуридин (m^5U_d), 5-фтордезоксиуридин (f^5U_d), 5-бромурин (br^5U). В качестве доноров фосфата были использованы 2',3'-циклофосфаты цитидина (C > p), гуанозина (G > p) и аденозина (A > p) соответственно для рибонуклеаз A, T₁ и *P. brevicompactum*. Результаты синтезов приведены в табл. 1—3.

* Сообщение XXIII см. [1].

** Сокращения соответствуют общепринятым [10].

Таблица 1

**Синтез динуклеозидмонофосфатов типа CpN,
катализируемый рибонуклеазой А**

CpN	Время синтеза, ч	Выход CpN, % от C>p	
		взятого	израсходованного
CpC	1	25,6	52,4
Cp ^m C _d	5	25,8	39,6
Cpz ^s C	3 *	7,2	24,4
CpU	24	22,6	36,0
CpU	24 **	10,6	14,8
CpU _d	6	21,0	40,7
Cp ^m U _d	6 **	12,1	28,4
Cpbr ^s U	24 **	11,7	17,0
Cpf ^s U _d	24	25,5	39,6

* [C>p]:[N]=1:1,5.

** Начальные концентрации субстратов и фермента: [C>p]=0,06 М; [N]=0,18 М; [РНКаза А]=0,1 мг/мл; в остальных случаях [C>p]=0,25 М; [РНКаза А]=0,4 мг/мл при том же соотношении субстратов. Буферный раствор — 0,05 М Трис-НСl (рН 7,6).

Таблица 2

**Синтез динуклеозидмонофосфатов GpN,
катализируемый рибонуклеазой T₁**

GpN	Время синтеза, ч	Выход GpN, % от G>p	
		взятого	израсходованного
GpC	2,5 *	41,2	—
Gp ^m C _d	48	45,7	72,8
Gpz ^s C	6	8,5	43,6
GpU	6	21,8	50,4
Gp ^m U	22	30,4	65,6
Gp ^m U _d [13]	24	18,2	52,1
Gpbr ^s U [13]	6 *	32,4	67,9

* Начальные концентрации субстратов и фермента: [G>p]=0,02 М; [N]=0,2 М; [РНКаза T₁]=100 ед/мл; в остальных случаях [G>p]=0,06 М; [N]=0,18 М; [РНКаза T₁]=50 ед/мл. Буферный раствор — 0,01 М фосфат, рН 7,0.

Таблица 3

**Синтез динуклеозидмонофосфатов ApN и GpN,
катализируемый рибонуклеазой *P. brevicompactum***

N'pN	Время синтеза, ч	Выход NpN', % от N>p	
		взятого	израсходованного
ApC [9]	144	44,8	61,2
ApC _d [9]	24	32,7	49,6
Ap ^m C _d	12	26,4	41,1
Apbr ^s C _d	58	11,6	14,1
Apjo ^s C _d	58	5,5	6,0
Apz ^s C	36	7,3	9,1
ApU	36	16,4	22,2
Ap ^m U	72	8,6	9,9
GpU	46	16,9	22,4
Gp ^m U	72	9,0	15,6
Gpz ^s C	72	9,4	13,2

Примечание. Начальные концентрации субстратов и фермента: [N'>p]=0,25 М; [N]:[N'>p]=1,5—3; [РНКаза *P. brev.*]=20 ед/мл. Буферный раствор — 0,2 М фосфат (рН 7,0).

Введение как электронодонорных, так и электроноакцепторных заместителей в положение 5 акцептора фосфата не влияет на синтез межнуклеотидной связи, катализируемой РНКазой А, что подтверждает ранее полученные результаты [11, 12]. Более низкий выход Sr^{87}U и Sr^{89}U (см. табл. 1) связан с изменением начальных концентраций субстратов и фермента, так как он сопоставим с результатами синтеза SrU в аналогичных условиях. Выход динуклеозидмонофосфатов в синтезах с участием РНКазы T_1 (см. табл. 2) повышается при замене цитидина или уридина их 5-замещенными производными. Для неспецифичной рибонуклеазы *P. brevicompactum* введение заместителя в положение 5 акцептора фосфата приводит к уменьшению выхода динуклеозидмонофосфата (см. табл. 3). Во всех трех случаях замена С на $z^{13}\text{C}$ приводит к значительному снижению выхода соответствующего динуклеозидмонофосфата $\text{Np}z^{13}\text{C}$.

Полученные результаты не коррелируют и не могут быть объяснены изменением распределения электронной плотности и связанным с этим изменением констант ионизации гетероциклического основания акцептора фосфата, которые вызывает замена Н-атома в положении 5 на CN_3 -группу или галоид [7, 14], хотя указанные факторы и должны приводить к некоторым изменениям во взаимодействии акцептора фосфата с ферментом.

Более вероятным кажется объяснение, учитывающее определенные пространственные влияния, которые могут оказывать заместители в положении 5 акцептора фосфата. Действительно, если принять что в исследованных нами рибонуклеазах области контактных участков, соответствующих акцептору фосфата, «устроены» неодинаково [7, 8], вполне правдоподобным будет предположение, что в рибонуклеазах А и T_1 эта область образует в ферменте некоторую полость, размеры которой не лимитируют объем, занимаемый акцептором фосфата. При этом в случае рибонуклеазы T_1 возникают, по-видимому, дополнительные взаимодействия акцептора фосфата с ферментом за счет заместителей, появляющихся в положении 5. Размеры этой полости в рибонуклеазе *P. brevicompactum*, вероятно, ограничены меньшим объемом, что затрудняет образование фермент-субстратного комплекса с акцептором фосфата, в котором появляются такие объемные заместители, как иод, хотя и нет полной корреляции между размерами заместителей и выходами соответствующих динуклеозидмонофосфатов.

Поведение 5-азацитидина как акцептора фосфата в исследуемых реакциях может быть объяснено в рамках ранее предложенных для этих ферментов схем контактных участков, соответствующих акцептору фосфата [7, 8]: замена С-атома N-атомом приводит к появлению в положении 5 нуклеинового основания отрицательного заряда, в результате чего уменьшается избыточная электронная плотность на $\text{N}_{(3)}$ и $\text{O}_{(2)}$ и, следовательно, ослабляются взаимодействия с положительно заряженными группами, которые, согласно модели, имеются в контактных участках, что должно сопровождаться понижением эффективности акцептора фосфата.

Экспериментальная часть

В работе использовали цитидин, уридин, 5-бромуридин, аденозин-2', 3'-циклофосфат (Na-соль) и панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), 5-метилдезоксцитидин, 5-бромдезоксцитидин, 5-иоддезоксцитидин, 5-фтордеоксиуридин, 5-метилуридин, 5-метилдеоксиуридин и 5-азацитидин (Serva, ФРГ), дезоксиуридин и рибонуклеазу T_1 (Calbiochem, США). Дициклогексилгуанидиниевые соли 2', 3'-циклофосфатов цитидина и гуанозина (Calbiochem, США) превращали в аммониевые обработкой дауэксом 50 W (NH_4^+ -форма). Рибонуклеаза *P. brevicompactum* была любезно предоставлена нам С. И. Безбородовой.

Хроматографию, электрофорез на бумаге, УФ-спектрофотометрирование и установление структуры динуклеозидмонофосфатов проводили как описано в работах [3, 9, 13].

Характеристика динуклеозидмонофосфатов

NpN'	R _f *	U* _{отн}	Ферментативный гидролиз			УФ-спектры в 0,1 н. HCl				
			РНКаза	Продукты	Отноше- ние оснований	λ _{макс}	λ _{мин}	$\frac{D_{250}}{D_{260}}$	$\frac{D_{270}}{D_{280}}$	$\frac{D_{280}}{D_{260}}$
Срz ⁵ С	1,4	0,41	<i>P. brev.</i>	Ср, z ⁵ С	1,04:1	272	238	0,71	1,15	1,04
Срm ⁵ С _d	2,1	0,38	А	Ср, m ⁵ С _d	1,16:1	282	244	0,51	1,54	2,08
Срm ⁵ U	2,3	0,34	»	Ср, m ⁵ U	1,10:1	274	240	0,62	1,34	1,28
Срbr ⁵ U	2,0	—	»	Ср, br ⁵ U	1:1,05	279	245	0,70	1,40	1,60
Срm ⁵ U _d	—	0,34	»	Ср, m ⁵ U _d	1:1,03	274	242	0,52	1,39	1,38
СрГ ⁵ U _d	2,2	—	»	Ср, Г ⁵ U _d	1:1,05	276	240	0,52	1,47	1,50
Срm ⁵ С _d	1,4	0,35	<i>P. brev.</i>	Ср, m ⁵ С _d	1:0,97	279	235	0,88	1,07	1,18
Срz ⁵ С	1,1	0,37	»	Ср, z ⁵ С	1:0,72	255	230	1,03	0,86	0,75
Арm ⁵ U	2,2	0,34	»	Ар, m ⁵ U	1:1,02	261	235	0,83	0,88	0,53
Арm ⁵ С _d	2,5	0,40	»	Ар, m ⁵ С _d	1:0,92	263	238	0,80	0,94	0,78
Арbr ⁵ С _d	—	0,39	»	Ар, br ⁵ С _d	1:1,05	262 **	233	0,83	0,87	0,51
Арjо ⁵ С _d	—	0,33	»	Ар, jо ⁵ С _d	1:0,90	262 **	246	0,89	0,87	0,53
Арz ⁵ С	2,4	0,38	»	Ар, z ⁵ С	1:1,07	257	234	0,90	0,77	0,21

* Определены относительно 5'-нуклеотида.

** Спектр в H₂O.

Синтез динуклеозидмонофосфатов. Нуклеозид-2',3'-циклофосфат и нуклеозид растворяли в буфере и инкубировали с ферментом при ~ 0°. Начальные концентрации субстратов и фермента, а также состав буферного раствора и продолжительность инкубирования приведены в табл. 1—3. Реакционную смесь разделяли с помощью электрофореза на бумаге в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламония во всех случаях, за исключением синтезов Срbr⁵U (БХ в системе этанол — 0,1 М ацетат аммония (7:3)) и СрГ⁵U (БХ в системе пропанол-2 — конц. аммиак — вода (7:1:2)). Все выделенные динуклеозидмонофосфаты очищали дополнительно БХ в системе пропанол-2 — конц. аммиак — вода (7:1:2), Срbr⁵U и СрГ⁵U_d — электрофорезом и хроматографией. Свойства вновь синтезированных динуклеозидмонофосфатов приведены в табл. 4.

ЛИТЕРАТУРА

- Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. (1977) Биоорг. химия, 3, 1475—1478.
- Женодарова С. М. (1974) в сб. Нуклеазы микроорганизмов под ред. А. М. Безбородова, с. 300—326, «Наука», М.
- Смолянинова О. А., Седельникова Э. А., Женодарова С. М. (1974) Ж. общ. химии, 44, 442—446.
- Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. (1974) Ж. общ. химии, 44, 446—451.
- Gassen H. G., Witzel H. (1967) Eur. J. Biochem., 1, 36—45.
- Holy A. (1973) in Reaction Mechanisms and Control Properties of Phosphotransferases, pp. 555—571, Academic-Verlag, Berlin.
- Женодарова С. М., Гогованов И. Б., Соболев В. М. (1976) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1846—1850.
- Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. (1976) Биоорг. химия, 2, 1111—1116.
- Мисленникова Т. А., Седельникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) Мол. биол., 7, 36—41.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1971) Biochim. et biophys. acta, 247, 1—12.
- Женодарова С. М., Клягина В. П. (1970) Ж. общ. хим., 40, 2124—2127.
- Кавуненко А. П., Тихомирова-Сидорова Н. С. (1972) Биохимия, 87, 682—688.
- Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Пономарева В. М. (1975) Биоорг. химия, 1, 598—603.

14. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., Свердлов Е. Д., Симуква Н. А., Турчинский М. Ф., Шибяев В. Н. (1970) Органическая химия нуклеиновых кислот, с. 146—211, «Химия», М.

Поступила в редакцию
22.IV.1977

STEP-WISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXIV. THE 5-SUBSTITUTED
PYRIMIDINE NUCLEOSIDES AS PHOSPHATE ACCEPTORS IN THE SYNTHESIS
OF INTERNUCLEOTIDE BOND CATALYZED BY RIBONUCLEASES
OF DIFFERENT SPECIFICITY

ZHENODAROVA S. M., SEDELNIKOVA E. A., SOBOLEVA I. A.,
HABAROVA M. I.

*Institute of Biological Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino*

Dinucleoside monophosphates CpN, GpN and ApN were synthesized from nucleoside 2',3'-cyclic phosphates and 5-substituted pyrimidine nucleosides (5-methyldeoxycytidine, 5-bromodeoxycytidine, 5-iododeoxycytidine, 5-bromouridine, 5-methyluridine, 5-methyldeoxyuridine, 5-fluorodeoxyuridine, 5-azacytidine) with the participation of ribonuclease A, ribonuclease T₁ and *Penicillium brevicompactum* ribonuclease, respectively. The effects caused by the substituents in the position 5 of phosphate acceptors are different for ribonucleases of different substrate specificity. This fact seems to indicate that the above ribonucleases differ in the arrangement of «contact» sites for phosphate acceptors.
