



УДК 547.963.32.07

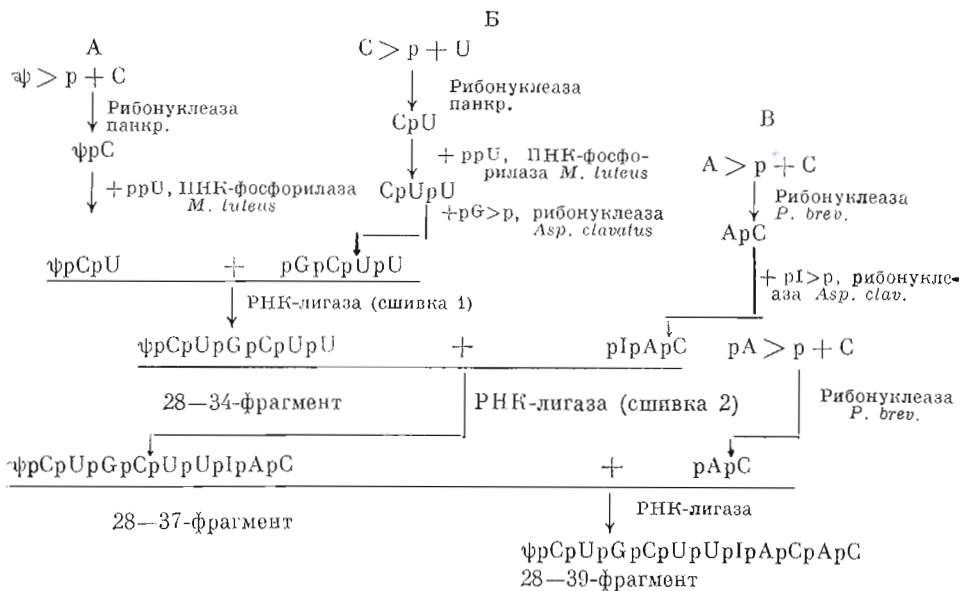
СИНТЕЗ АНАЛОГОВ ФРАГМЕНТОВ АНТИКОДОНОВОЙ ВЕТВИ
ДРОЖЖЕВОЙ ВАЛИНОВОЙ тРНК₁*Женодарова С. М., Клягинс В. П., Седелникова Э. А.,
Смолянинова О. А., Хабарова М. И.**Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пуцзино**Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М.**Специальное конструкторско-технологическое бюро
биологических активных веществ, Новосибирск*

Для поиска наиболее рациональной схемы синтеза фрагмента 28—39 антикодонной ветви дрожжевой тРНК^{Val} получены гексануклеотид $\psi\text{pCpUpGpCpU}$ и гептануклеотиды $\psi\text{pCpUpGpCpUpU}$, GpCpUpUpIpApC — фрагменты 28—33, 28—34 и 31—37 соответственно, в которых остаток псевдоуридина-33 заменен уридином. Для синтеза исходных блоков применяли различные ферменты нуклеинового обмена: панкреатическую рибонуклеазу гуанилрибонуклеазу *Asp. clavatus*, малоспецифичную рибонуклеазу *Pen. brevicompactum* и ПНК-фосфорилазу *Micrococcus luteus*. Сшивку фрагментов блоков, а также ряда модельных олигорибонуклеотидов проводили с помощью РНК-лигазы T₄. Полученные результаты показывают, что для синтеза фрагмента 28—39 более эффективна схема, включающая в себя получение гептануклеотида $\psi\text{pCpUpGpCpUpU}$ и присоединение к нему тринуклеотида pIpApC .

Так как до сих пор остаются невыясненными многие вопросы, связанные с функционированием транспортных РНК, синтез их фрагментов представляет значительный интерес [2]. В частности, важно получение и сравнительное изучение свойств олигонуклеотидов, моделирующих отдельные части молекулы тРНК. С этой целью, а также продолжая исследования по комплексному использованию ферментов нуклеинового обмена для получения фрагментов тРНК и их аналогов [2, 3], мы разработали схему синтеза фрагмента 28—39 антикодонной ветви дрожжевой валиновой тРНК₁, в котором псевдоуридин-33 заменен уридином (см. схему). Схема предусматривает ферментативный синтез коротких фрагментов (ди-, три- и тетрауклеотидов) и сшивку их РНК-лигазой.

Предлагаемый вариант не является единственно возможным. Схема может быть изменена на стадии первой и второй РНК-лигазных сшивок: не исключено, что более успешным может оказаться синтез фрагмента 28—33 и присоединение к нему фрагмента 34—37. Соответственно должны быть изменены части Б и В этой схемы. Отсутствие систематических сведений о субстратной специфичности РНК-лигазы T₄ не позволяет заранее решить, какой из путей окажется предпочтительным. Поэтому, прежде чем

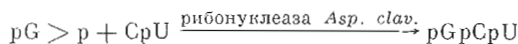
Сокращения: ПНК-фосфорилаза — полинуклеотидфосфорилаза, остальные сокращения соответствуют общепринятым [1].



приступить к реализации указанной схемы, мы провели предварительное исследование, чтобы выяснить эффективность того или иного варианта.

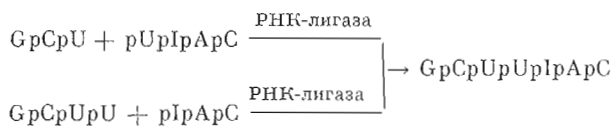
В связи с этим в настоящей работе осуществлен синтез гексануклеотида $\psi p C p U p G p C p U$ и двух гептануклеотидов: $\psi p C p U p G p C p U p U$ и $G p C p U p U p I p A p C$, аналогов фрагментов 28—33, 28—34 и 31—37 соответственно.

Синтез гексануклеотида проводили согласно схеме, изменив часть Б после синтеза $C p U$:



Полученный тринуклеотид сшивали с тринуклеозиддифосфатом $\psi p C p U$ с помощью РНК-лигазы.

Гептануклеотид $\psi p C p U p G p C p U p U$ получали в соответствии со схемой (см. части А и Б), а синтез другого гептануклеотида, служивший моделью второй РНК-лигазной сшивки, проводили двумя способами:



Исходные блоки — динуклеозидмонофосфаты $\psi p C$, $G p C$, $C p U$, $A p C$, тринуклеозиддифосфаты $\psi p C p U$, $G p C p U$, $C p U p U$, $I p A p C$, тринуклеотиды $p G p C p U$, $p I p A p C$, тетра- и пентануклеозидтрифосфат $G p C p U p U$ и тетра- и пентануклеотиды $p G p C p U p U$ и $p U p I p A p C$ — синтезированы при участии рибонуклеаз различной специфичности и полинуклеотидфосфорилазы.

Пиримидинспецифичная панкреатическая рибонуклеаза, легко расщепляющая псевдоуридин-2',3'-циклофосфат, проявляла также достаточную синтетическую активность по отношению к этому субстрату [4]. При проведении синтеза в условиях, обычно используемых в нашей лаборатории для получения динуклеозидмонофосфатов из нормально растворимых субстратов [5] при концентрациях циклофосфата псевдоуридина 0,25 М, цитидина 0,75 М и рибонуклеазы 0,4 мг/мл, через 4 ч реакционная смесь содержала ~20% $\psi p C$ (57% на израсходованный циклофосфат). При увеличении начальной концентрации цитидина до 1,25 М содержание $\psi p C$ достигает ~30% (см. табл. 1), что составляет ~74% на израсходованный

Таблица 1

Зависимость состава реакционной смеси от времени при синтезе ψpC в присутствии панкреатической рибонуклеазы [$\psi > \text{p}$] 0,25 М, [С] 1,25 М, [Е] 0,4 мг/мл

Компоненты	Время, ч			
	5	8	12	22
ψpC	24,1	29,0	31,4	32,1
$\psi > \text{p}$	70,3	63,4	57,7	51,8
ψp	5,6	7,6	10,9	16,1

Таблица 2

Зависимость выхода ψpCrU от начальной концентрации субстратов полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus* и времени [ψpC] 0,01 М, [ψpC]/[ppU]=2

Е, мг/мл	Время, ч	Выход, %		Возврат ψpC , %
		ψpCrU	ψpCrUpU	
3	1	6,2 (12,4) **	3,2	50,0
3	2	10,3 (15,9)	3,2	36,0
6	1	9,2 (15,0)	—	40,0
6	2	11,6 (15,2)	3,2	24,0
12	2	7,4 (8,3)	—	11,2
6 *	2	6,2 (13,3)	3,7	60,0
24 *	2	8,2 (10,7)	—	24,0

* [ψpC] 0,02 М.

** В скобках приведен выход в расчете на вступивший в реакцию динуклеозидмонофосфат.

донор фосфата, т. е. большая часть введенного в реакцию циклофосфата превращается в ψpC , а 50–55% его может быть регенерировано.

Динуклеозидмонофосфат CrU синтезирован нами с применением панкреатической рибонуклеазы, ковалентно связанной с СМ-целлюлозой [6], GrC — при участии гуанил-специфичной рибонуклеазы *Asp. clavatus* [7], а для получения ArC мы использовали малоспецифичную рибонуклеазу *Pen. brevicompactum*, иммобилизованную на СМ-целлюлозу [8].

Тринуклеозиддифосфаты ψpCrU , GrCrU , CrUpU и тетрануклеозидтрифосфат GrCrUpU мы получали, наращивая соответствующие динуклеозидмонофосфаты с 3'-конца с помощью полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus*. Блоки CrUpU , GrCrU и GrCrUpU синтезированы как описано в работе [9]. При подборе условий синтеза ψpCrU было найдено, что максимальный выход (50%) может быть получен при концентрации ψpC 0,01 М, фермента 3–6 мг/мл, соотношении [ψpC]/[ppU]=2 и 1–2-часовом инкубировании реакционной смеси при 37°С (табл. 2).

Тринуклеозиддифосфат IrArC синтезирован из циклофосфата инозина и ArC с использованием гуанил-специфичной рибонуклеазы *Asp. clavatus* в условиях, близких к описанным в работе [10], с выходом 12–15% (60% на израсходованный циклофосфат), что в 2–3 раза превышает результат, полученный с применением рибонуклеазы T_1 [11] и рибонуклеазы *Pen. chrysogenum* [10].

Тринуклеотиды pIrArC , pGrCrU и тетрануклеотиды pGrCrUpU , pUpIrArC приготовлены из 5'-фосфорилнуклеозид-2',3'-циклофосфата ($\text{pI} > \text{p}$, $\text{pG} > \text{p}$, $\text{pU} > \text{p}$) и динуклеозидмонофосфата (ArC , CrU) или тринуклеозиддифосфата (CrUpU , IrArC) при участии рибонуклеазы *Asp. cla-*

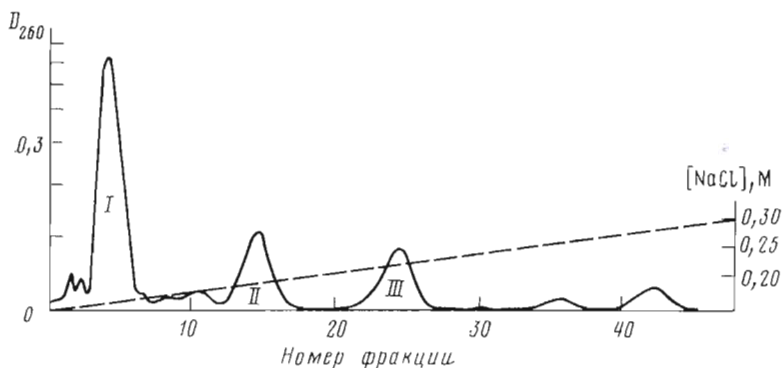


Рис. 1. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе $(Ar)_5A$, на колонке $(0,9 \times 22 \text{ см})$ с DEAE-сефадексом в системе Томлинсона - Тенера (14); пик I - $(Ar)_2A + (pA)_3$; пик III - $(Ar)_5A$

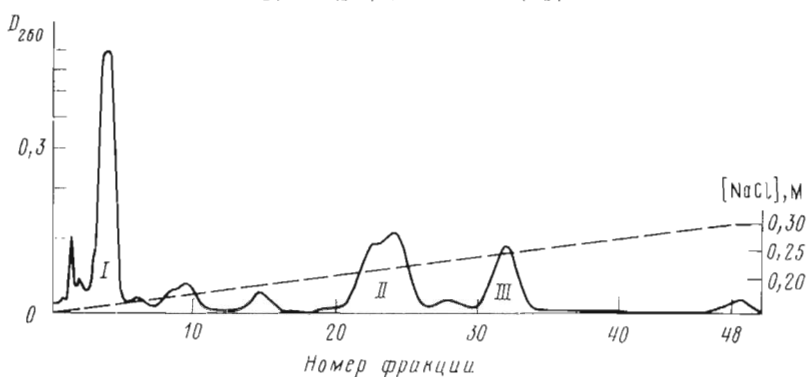


Рис. 2. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе $\psi pCrUpGrCrUpU$: пик I - $\psi pCrU$, пик II - $pGrCrUpU + GrCrUpU$, пик III - $\psi pCrUpGrCrUpU$

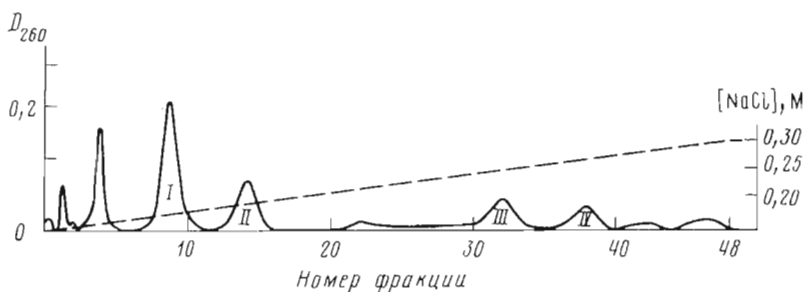


Рис. 3. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе $GrCrUpUrIrArC$: пик I - $GrCrUpU$, пик II - $pIrArC + IrArC$, пик III - $GrCrUpUrIrArC$, пик IV - $(pIrArC)_2 + IrArCpIrArC$

vatus или панкреатической рибонуклеазы (для $pUrIrArC$), как описано в работе [12].

Все синтезированные олигонуклеотиды гомогенны при электрофорезе и хроматографии на бумаге в различных системах растворителей. Нуклеотидный состав этих соединений определяли, анализируя гидролизат, полученный при обработке олигонуклеотида тем или иным ферментом, с помощью хроматографии на бумаге и спектрофотометрии. Характеристики олигонуклеотидов совпали с приведенными в работах [9, 12].

Для сшивки полученных блоков использовали РНК-лигазу Т4, выделенную как описано нами ранее [3]. Активность фермента определяли по образованию фермент-аденилатного комплекса с $[^3H]ATP$, а кроме того, по образованию фосфодиэфирной связи в «стандартной» реакционной смеси $(Ar)_2A + (pA)_3$ (рис. 1) в условиях, близких к опти-

Синтез олигонуклеотидов с применением РНК-лигазы Т4
Начальная концентрация донора фосфата ~1 мМ,
[акцептор]/[донор] = ~3 : 1

Акцептор фосфата	Донор фосфата	РНК-лигаза, ед. акт./мл	Выход, %	Возврат, %	
				акцептор	донор *
ArArA	pArArA	70	24	13	43 (15)
»	»	210	27	47	23 (14)
UpUpUpU	pUpUpU 2*	210	3	60	40
ArUpCpCpC	»	70	10	70	—
»	pGpC	70	—	75	50
»	»	450	11	67	38
ψpCpU	»	400	2	76	79 (26)
»	pGpC 3*	1000	7	78	47 (14)
»	»	2000	10	63	25 (12)
GpCpU	pGpC	1000	17	77	57 (30)
ArCpU	»	1000	20	65	27
»	pCpCpCpC	1000	12	61	56
»	pUpUpUpU	1000	33	—	21

* В скобках указано количество дефосфорилированного донора (% от суммы).

2* [UpUpUpU]/[pUpUpU] = 1 : 1.

3* [ψpCpU]/[pGpC] = ~1,5 : 1.

Таблица 4

Синтез гептануклеотидов ψpCpUpGpCpUpU и GpCpUpUpUpArC из три- и тетра-нуклеотидных блоков в присутствии РНК-лигазы Т4
Начальная концентрация донора фосфата ~1 мМ, [акцептор]/[донор] ~3 : 1

Акцептор фосфата	Донор фосфата	РНК-лигаза, ед. акт./мл	Выход, %	Возврат, %	
				акцептор	донор 1*
ψpCpU	pGpCpU	2600	4 2*	92	61 (25)
»	pGpCpUpU	2500	8	88	32 (8)
»	»	2600	10	79	44 (29)
»	»	3500	16	83	38 (12)
GpCpU	pUpUpArC	225	—	76	75 (28)
»	»	450	11	68	29
GpCpUpU	pUpArC	450	6 3*	69	56 (6)
»	»	2850	8 3*	53	27

* В скобках указано количество дефосфорилированного донора (% от суммы).

2* Гексануклеотид ψpCpUpGpCpU содержал также GpCpUpGpCpU, образовавшийся в результате самоконденсации донора и последующего дефосфорилирования.

3* При обработке субстратов РНК-лигазой образуется также 6—8% смеси pUpArCpUpArC + UpArCpUpArC.

мальным условиям, описанным Уленбеком и Камерон для синтеза $(Ar)_3C(pU)_5$ [13] (см. «Экспериментальную часть»). Выход $(Ar)_5A$ (пик III) для разных препаратов, использовавшихся в настоящей работе, составлял 15—20%. Пик (II) содержал смесь $(Ar)_2A$ и $(pA)_3$ в отношении ~1 : 2; пик (I) — продукты расщепления $oligo(A)$ и АТР. Таким образом, при проведении контрольной сшивки в препаратах РНК-лигазы обнаруживалась активность, приводящая к интенсивному расщеплению олигоаденилатов со свободной 5'-ОН-группой. Поэтому прежде, чем использовать РНК-лигазу Т4 для получения фрагментов 28—33, 28—34 и 31—37, мы применили этого фермент для сшивания модельных олигонуклеотидов гетерогенного состава $(ArUpCpCpC$ с $pGpC$ и $pUpUpU)$ и олигоуридилатов $((Up)_3U-pUpUpU)$ (табл. 3). В этих случаях даже при 7-кратном увеличении концентрации РНК-лигазы удалось регенери-

ровать ~70% ArUrCpCpC и ~60% $(\text{Ur})_3\text{U}$. Эти результаты, а также данные, полученные при синтезе аналога Тψ-петли [3], свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемая при сшивке $\text{oligo}(\text{A})$ нуклеазная активность является высокоспецифичной.

При проведении модельных сшивок мы обнаружили, что концентрация РНК-лигазы, необходимая для образования новой фосфоэфирной связи, зависит от структуры субстратов. При концентрации фермента 70 ед. акт./мл олигоаденилат $(\text{Ar})_5\text{A}$ образуется с выходом 24%, $\text{ArU}(\text{pC})_3(\text{pU})_3$ — 10%, а $\text{ArU}(\text{pC})_3\text{pGpC}$ не образуется, тогда как при концентрации РНК-лигазы 450 ед. акт./мл выход $\text{ArU}(\text{pC})_3\text{pGpC}$ составил ~11%. В связи с этим мы изучили влияние повышенной (400, 1000 и 2000 ед. акт./мл) концентрации РНК-лигазы на синтез пентануклеотида $\psi\text{pCpUrGpC}$ из ψpCpU и pGpC . Замена 5'-концевого псевдоуридина в акцепторе фосфата на пуриновый повышает выход пентануклеотида в 2–3 раза, но при замене 5'-концевого гуанозина в доноре фосфата на цитидин выход понижается, а при замене на уридин — повышается (см. табл. 3).

Учитывая эти данные, при получении фрагментов 28–33, 28–34, 31–37 сшивку блоков проводили при высокой концентрации фермента (табл. 4). Выход гексануклеотида $\psi\text{pCpUrCpCpU}$ вместе с продуктом самоконденсации донора фосфата составил ~4%. Гептануклеотид $\psi\text{pCpUrCpCpUrU}$ образуется со значительно более высоким выходом (12–15%). Сшивка GpCpU и pUrIrArC проходит на ~11%, а GpCpUrU и pIrArC — на 6–8%. В последнем синтезе наблюдали также образование 6–8% гексануклеотида pIrArCpIrArC , который теряет концевой фосфат в процессе выделения. По-видимому, GpCpUrU , имеющий два уридиновых остатка на 3'-конце, является более слабым акцептором, чем pIrArC . Хотя выход GpCpUrUrIrArC в первом варианте несколько лучше, чем во втором, предпочтителен второй путь, так как pIrArC легче доступен, чем pUrIrArC .

Во всех случаях после проведения реакции с участием РНК-лигазы и ингибирования фермента реакционные смеси разделяли на DEAE-сефадексе в системе Томлинсона—Тенера (см. рис. 2, 3).

Микроколоночная хроматография на модифицированном силикагеле «Аминохром» показала, что продукты сшивки, выделенные после дополнительной очистки БХ, как правило, гомогенны или содержат не более 3–5% примесей. Структуру фрагментов $\psi\text{pCpUrGpC}$, $\psi\text{pCpUrGpCpUrU}$ и GpCpUrUrIrArC подтверждали методом нуклеотидных карт (рис. 4).

Таким образом, более эффективным следует считать предлагаемый вариант схемы синтеза фрагмента 28–39, который включает в себя получение гептануклеотида $\psi\text{pCpUrGpCpUrU}$ на стадии первой РНК-лигазной сшивки и присоединение к нему тринуклеотида pIrArC на стадии второй сшивки.

Экспериментальная часть

В работе использовали аденозин, гуанозин, инозин, цитидин, уридин, Na-соли 2',3'-циклофосфатов аденозина, цитидина, UDP и ATP, панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), Na-соль псевдоуридин-2'(3')-фосфата, панкреатическую рибонуклеазу, связанную с СМ-целлюлозой [6], *n*-толуолсульфонат циклогексил-β-[N-(N'-метилморфолий)]этилкарбодимида (ЦГМК), дитиоэритрит (Serva, ФРГ), полинуклеотидфосфорилазу *M. luteus* (Calbiochem, США), сефадекс G-10, G-15, DEAE-сефадекс A-25 (Pharmacia, Швеция), эндонуклеазу *Ser. marcescens* (СКТББАВ, Новосибирск).

Псевдоуридин-2',3'-циклофосфат приготовлен с количественным выходом циклизацией псевдоуридиловой кислоты в присутствии ЦГМК при автоматическом контроле pH реакционной смеси (5,0–5,5). Ино-

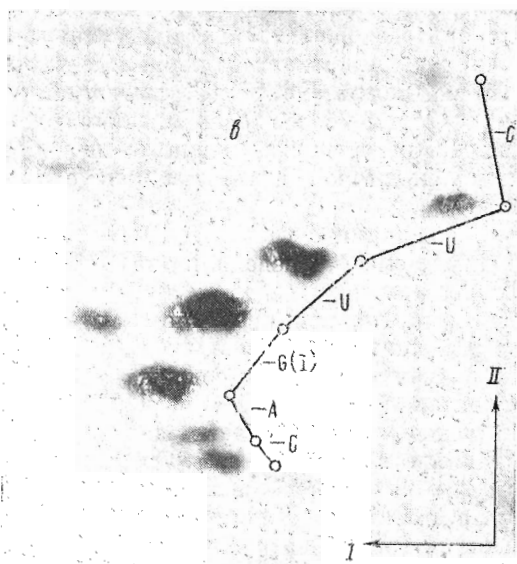
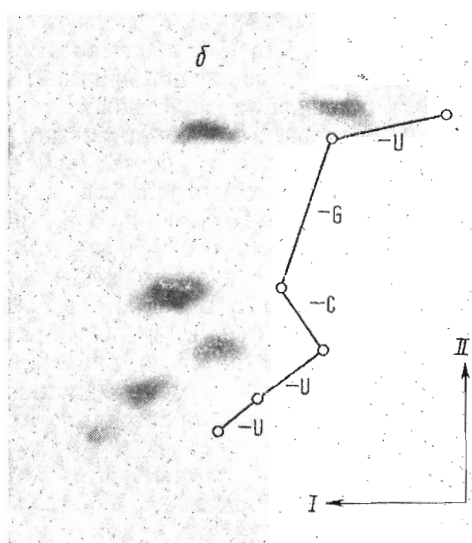
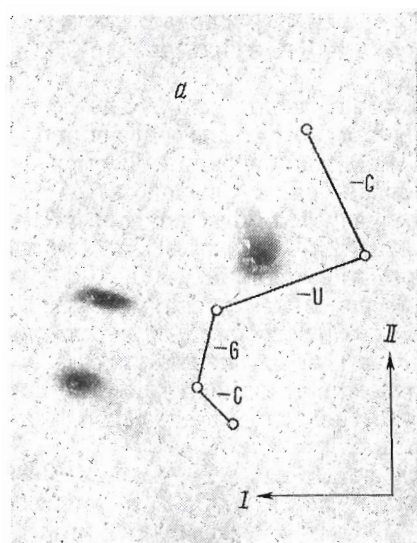


Рис. 4. Нуклеотидные карты $\psi rCpUpGrC$ (а), $\psi rCpUpGr \cdot CpUpU$ (б) и $GrCpUpUpIp \cdot ApC$ (в). Направление I — электрофорез на ацетате целлюлозы (рН 3,5); II — гомохроматографии на DEAE-целлюлозе

зин-2',3'-циклофосфат получали в соответствии с методикой, приведенной в работе [15]. Нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфаты и соответствующие 5'-фосфорилнуклеозид-2',3'-циклофосфаты синтезировали как описано в работе [12].

Песпецифичная рибонуклеаза *Pen. brevicompactum* (КФ 2.7.7.17) и гуанил-специфичная рибонуклеаза *Asp. clavatus* (КФ 2.7.7.26) любезно предоставлены С. И. Безбородовой (ИБФМ АН СССР), а щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ.3.1.3.1) — Р. Ф. Ренхоф (ИОС АН ЛатвССР).

РНК-лигаза T4 была выделена как описано в работе [3].

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге FN-2, FN-3, FN-7, FN-14 (Filtrak, ГДР). Для хроматографии нисходящим способом использовали следующие системы растворителей: этанол — конц. аммиак — вода, 65:10:25(А); пропанол-2 — конц. аммиак — вода,

7:1:2(Б); пропанол-1 — конц. аммиак — вода, 5:1:4(В); этанол — 1 М ацетат аммония, 7:3(Г); этанол — 1 М ацетат аммония (рН 5,0) 5:2 (Д).

Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 ч при напряжении 20 В/см в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония, рН 8,0.

Микроколоночную хроматографию гептануклеотидов проводили на модифицированном амиохроме в градиенте концентрации 0,005—0,05 М Na_2HPO_4 в 7 М мочеvine на колонке размером 0,8×60 мм (скорость элюции 600 мкл/ч, запись на МСФП-1).

УФ-спектры снимали на спектрофотометре «Spectrum» (ГДР) с автоматической записью, остальные спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре СФ-26.

Гомеолигорибонуклеотиды *oligo(A)*, *oligo(U)*, *oligo(C)* с 5'-концевой фосфатной группой получали гидролизом соответствующих полинуклеотидов эндонуклеазой *Ser. marcescens* в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 8,2, содержащем 0,005 М MgCl_2 , в течение 3—4 ч при 37° С [16], разделяя гидролизат на колонке с дауэксом 1×2 (200—400 меш, Cl⁻-форма) в градиенте (0,3—0,55 М) NH_4Cl , рН 8,0, с 40%-ным этанолом [17]. Длину олигонуклеотидов определяли после его гидролиза 0,3 н. КОН (24 ч, 37° С) и разделения гидролизата хроматографией на бумаге в системе Д по отношению концевых нуклеозида и нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфата к нуклеозид-2'(3')-фосфату. Гомеолигонуклеотиды со свободной 5'-ОН-группой получали, обрабатывая соответствующие 5'-фосфорилигонуклеотиды щелочной фосфомоноэстеразой *E. coli*.

Синтез олигорибонуклеотидов с участием рибонуклеаз и полинуклеотидфосфорилазы. Динуклеозидмонофосфаты, тринуклеозиддифосфаты, ди-, три- и тетрануклеотиды CrU [6], GrC [7], ArC [8], ArCrU , GrCrU , CrUrU [9], pGrC , pGrCrU , pIrArC , pGrCrUrU , pUrIrArC [12], ArUrCrCrC [9] синтезировали как описано нами ранее.

Синтез ψrC проводили, используя начальные концентрации субстратов и фермента, указанные в табл. 1, и выдерживая реакционную смесь, объем которой составлял ~0,5 мл, при 0° С в течение ~16 ч. ψrC выделяли с помощью электрофореза на бумаге с последующей очисткой на колонке с сефадексом G-10. Выход в препаративных синтезах составлял 17—20%.

Тринуклеозиддифосфат IrArC получали, инкубируя $\text{I}>\text{p}$ и ArC (начальные концентрации 0,25 и 1,25 М соответственно) в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,5 в течение 5 ч при ~0° С с гуанил-специфичной рибонуклеазой *Asp. clavatus* (4 ед. акт./мл). Объем реакционной смеси составлял 0,1—0,2 мл. Из смеси IrArC выделяли препаративной хроматографией в системе А и отделяли от Ir электрофорезом на бумаге, проводя затем повторную хроматографию в системе А или Б.

Тринуклеозиддифосфат ψrCrU синтезировали в условиях, приведенных в табл. 2. Объем реакционной смеси составлял 2—5 мл. ψrCrU выделяли с помощью препаративной хроматографии на бумаге в системе А с последующей очисткой электрофорезом на бумаге и повторной хроматографией в системе А или Б. Выходы в препаративных синтезах составляли 7—10%. Как правило, регенерировали 30—35% ψrC .

Синтезы с участием РНК-лигазы Т4 (см. табл. 3, 4). Раствор донора и акцептора фосфата в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,6, содержащего 1,5 мМ АТФ, 3,3 мМ дитиоэритрит, 20 мМ MgCl_2 , бычий сывороточный альбумин (150 мкг/мл) и РНК-лигазу Т4, выдерживали 4 ч при 37° С, после чего реакционную смесь, объем которой составлял обычно 0,33 мл, прогревали 2 мин на кипящей водяной бане, охлаждали и упаривали в вакууме. Остаток растворяли в 0,5 мл 0,14 М NaCl в 0,02 М трис-НСI-буфере, рН 7,6, с 7 М мочеvine и наносили на колонку (22×0,9 см) с DEAE-сефадексом. Элюцию проводили раствором NaCl (градиент концентрации 0,14—0,3 М) в том же буферном растворе. Скорость элюции ~18 мл/ч, фракции собирали через 30 мин. На рис. 1—3 представлен ход

элюции реакционных смесей, полученных при шивании $(pA)_3$ с $(Ap)_2A$, $pCrpU$ с $pGpCrpUpU$ и $GpCrpUpU$ с $pIpApC$. Фракции, соответствующие отдельным пикам, обессоливали на сефадексе G-15 и после упаривания хроматографировали в системе В.

Авторы приносят сердечную благодарность сотрудникам кафедры химии природных соединений МГУ В. Л. Друце, А. А. Пурмалю за проведение микроколоночной хроматографии и Н. Л. Тетериной за проведение анализа олигорибонуклеотидов методом нуклеотидных карт.

ЛИТЕРАТУРА

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their constituents.— *Biochim. et biophys. acta*, 1971, v. 27, № 1, p. 1–12.
2. Zhenodarova S. M. Synthesis of tRNA fragments containing minor components and their analogues.— In: Synthesis, structure and chemistry of tRNAs and their components. Poznań, 1976, p. 186–201.
3. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Манькин А. С., Прокофьев М. А., Загребельный С. Н., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезнин М. И., Смолянинов В. В. Ферментативный синтез понануклеотида $GpTrUpCrpGpArUpCrpC$ — аналога ТФ — петли дрожжевой тРНК₁^{Val}.— *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1037–1046.
4. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Прокофьев М. А. Ферментативный синтез псевдоуридиллил-(3'→5')-цитидиллил-(3'→5')-аденозина — фрагмента универсального олигонуклеотида.— *Докл. АН СССР*, 1974, т. 217, № 1, с. 221–223.
5. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XVII. Синтез цитидиллил-(3'→5')-цитидина и цитидиллил-(3'→5')-уридина, модифицированных в 3'-концевом цитидиновом и уридиновом остатках.— *Ж. общ. химии*, 1974, т. 44, № 2, с. 446–449.
6. Хабарова М. И., Смолянинова О. А., Багдонас А. С., Коваленко М. И., Женодарова С. М. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XXVI. Энзиматический синтез динуклеозидмонофосфатов в препаративном масштабе и подходы к ингибированию фермента.— *Биоорганическая химия*, 1978, т. 4, № 6, с. 740–744.
7. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. Зондирование активного центра некоторых гуанилспецифичных рибонуклеаз модифицированными субстратами.— *Биоорганическая химия*, 1976, т. 2, № 8, с. 1111–1116.
8. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XXVIII. Имобилизованная рибонуклеаза *Penicillium brevicompactum* в синтезе олигорибонуклеотидов.— *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 5, с. 736–742.
9. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XXIX. Полинуклеотидфосфорилаза в синтезе олигорибонуклеотидов.— *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 10, с. 1505–1515.
10. Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XXX. Синтез тринуклеозиддифосфатов, катализируемый гуанилспецифичными рибонуклеазами.— *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 11, с. 1475–1478.
11. Grünberger D., Holý A., Sorm F. Synthesis of trinucleoside diphosphates with ribonuclease T₁.— *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1968, v. 33, № 1, p. 286–295.
12. Женодарова С. М., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. XXX. Синтез 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов.— *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 10, с. 1516–1521.
13. Uhlenbeck O. C., Cameron V. Equimolar addition of oligoribonucleotides with T₄ RNA ligase.— *Nucleic Acids Res.*, 1977, v. 4, № 1, p. 85–98.
14. Тенер Г. Ионообменная хроматография в присутствии мочевины.— В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1970, с. 85–90.
15. Седельникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. Н. Ступенчатый синтез олигонуклеотидов. Специфичность синтетической функции РНКазы *Penicillium brevicompactum* и структура донора фосфата.— *Молекулярная биология*, 1973, т. 7, № 1, с. 27–36.
16. Малкова И. А., Сенженко Л. П., Старостина В. К., Тихомирова Е. А. Некоторые свойства эндонуклеазы *Serratia marcescens*.— Тезисы докладов Второго Всесоюзного совещания по ферментам микроорганизмов, Минск. М.: 1978, ч. 1, с. 166.
17. Asteriadis G. T., Armbruster M. A., Gilham P. T. Separation of oligonucleotides, nucleotides and nucleosides on columns of polystyrene anion-exchangers with solvent systems containing ethanol.— *Anal. Biochem.*, 1976, v. 70, p. 64–74.

Поступила в редакцию
25.VII.1980

SYNTHESIS OF ANALOGS OF FRAGMENTS OF THE ANTICODON LOOP
OF YEAST tRNA^{Val}₁

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SEDELNIKOVA E. A.,
SMOLYANINOVA O. A., KHABAROVA M. I., MAISTRENKO V. F.,
PUSTOSHILOVA N. M.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino;
Special Design and Technology Bureau for Biologically
Active Compounds, Novosibirsk*

In a search of the most rational scheme for synthesis of the 28-39 fragment of yeast tRNA^{Val}₁ anticodon loop, heptanucleotides $\psi\psi\text{CpUpGpCpUpU}$ and GpCpUpUpIpApC have been synthesized, which represent the 28-34 and 31-37 fragments with pseudouridine-33 replaced by uridine. The starting blocks were prepared enzymatically by consecutive use of different nucleolytic enzymes: pancreatic ribonuclease, guanylyl-specific ribonuclease *Aspergillus clavatus*, nonspecific ribonuclease *Penicillium brevicompactum* and polynucleotide phosphorylase *M. luteus*. The joining of fragments, as well as a number of model oligonucleotides, was performed by T4 RNA ligase. In view of the results obtained, the most effective route to the fragment 28-39 involves preparing the heptanucleotide $\psi\psi\text{CpUpGpCpUpU}$ and its coupling with trinucleotide pIpApC .