



УДК 547.963.3

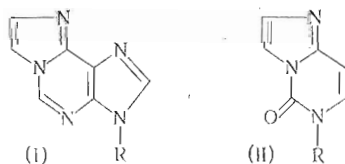
## 1, N<sup>6</sup>-ЭТЕНОАДЕНОЗИН-2',3'-ЦИКЛОФОСФАТ И 3,N<sup>4</sup>-ЭТЕНОЦИТИДИН КАК СУБСТРАТЫ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ РИБОНУКЛЕАЗОЙ *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM*

Женодарова С. М., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А.,  
Шибяев В. Н., Кост А. А.

Институт биофизики Академии наук СССР, Пущино,  
Институт органической химии им. П. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва

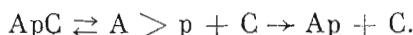
Обработкой аденозин-2'(3')-фосфата и аденилил-(3' → 5')-уридина хлорацетальдегидом синтезированы 1,N<sup>6</sup>-этепоаденозин-2'(3')-фосфат (εAp), превращенный далее в 1,N<sup>6</sup>-этепоаденозин-2',3'-циклофосфат (εA > p) и 1,N<sup>6</sup>-этепоаденилил-(3' → 5')-уридин (εApU). Полученные соединения, наряду с 3,N<sup>4</sup>-этепоцитидином (εC), могут служить субстратами для рибонуклеазы *P. brevicompactum* в реакциях гидролиза и синтеза. С помощью рибонуклеазы *P. brevicompactum* осуществлен синтез двух динуклеозидмонофосфатов, содержащих остатки εA и εC (II), а именно εApC и ApεC. Установлено, что изученный фермент может быть использован для получения модифицированных олигонуклеотидов, содержащих флуоресцирующие гетероциклические основания.

Взаимодействие хлорацетальдегида с производными аденина и цитозина приводит к превращению их в производные имидазопурина (I) и имидазопиримидина (II) [1], которые интенсивно флуоресцируют при облучении длинноволновым УФ-светом [2, 3]. В последнее время эту реакцию интенсивно используют для получения многочисленных производных флуоресцирующих нуклеотидов, широко применяемых в биохимических исследованиях.



R = рибозил

Ранее было показано [4], что превращение динуклеозидмонофосфата CpU в εCpU приводит к соединению, не способному расщепляться под действием панкреатической рибонуклеазы. Настоящая работа посвящена исследованию влияния модификации хлорацетальдегидом на взаимодействие субстратов с рибонуклеазой *Penicillium brevicompactum* [5]. Этот фермент катализирует как расщепление, так и синтез межнуклеотидной связи, например, реакции



Он был использован для получения целого ряда динуклеозидмонофосфатов из нуклеозид-2',3'-циклофосфатов и нуклеозидов [6]. Предпочтительным донором фосфатной группы при этом являются производные аденозина и гуанозина, предпочтительным акцептором фосфата — цитидин. Однако фермент обладает достаточно широкой субстратной специфичностью и с его помощью удалось синтезировать динуклеозидмонофосфаты, содержащие остатки ряда модифицированных нуклеотидов [7, 8].

Для исследования взаимодействия рибонуклеазы *P. brevicompactum* с субстратами, содержащими остаток 1, N<sup>6</sup>-этноаденозина, были получены два не описанных ранее производных: 2',3'-циклофосфат  $\epsilon A > p$  и динуклеозидмонофосфат  $\epsilon ApU$ .

Для получения  $\epsilon A > p$  модифицировали аденозин-2'(3')-фосфат хлорацетальдегидом (см. [1]), и продукт реакции был затем превращен в  $\epsilon A > p$  взаимодействием с *n*-толуолсульфонатом циклогексил- $\beta$ -[N-(N-метилморфолиний)]-этилкарбодиимида при рН 6,0. Следует отметить, что  $\epsilon A > p$  заметно менее устойчив, чем  $A > p$ , и в значительной степени гидролизуеться до монофосфата при очистке.

Динуклеозидмонофосфат  $\epsilon ApU$  был получен взаимодействием  $ApU$  с хлорацетальдегидом при рН 4,5. Модифицированный динуклеозидмонофосфат охарактеризован хроматографической и электрофоретической подвижностью, а также УФ-спектром (см. табл. 1); он полностью расщепляется фосфодиэстеразой змеиного яда с образованием уридин-5'-фосфата и 1, N<sup>6</sup>-этноаденозина\*.

Далее мы изучили взаимодействие  $\epsilon A > p$  и  $\epsilon ApU$  с рибонуклеазой *P. brevicompactum* в условиях, оптимальных для гидролиза межнуклеотидной связи этим ферментом [5] (37°, рН 5,2). При этом оказалось, что оба модифицированных субстрата полностью расщепляются за 3 ч, причем в результате гидролиза циклофосфата образуется  $\epsilon Ap$ , а гидролизат динуклеозидмонофосфата содержит  $\epsilon Ap$ , уридин, а также  $\epsilon A > p$ , который постепенно переходит в  $\epsilon Ap$ .

Интересно отметить, что скорость расщепления циклического фосфата заметно уменьшается в присутствии нуклеозида, образующегося при расщеплении динуклеозидмонофосфата. Это явление наблюдалось и при расщеплении других динуклеозидмонофосфатов рибонуклеазой *P. brevicompactum*.

Мы нашли также, что динуклеозидмонофосфат  $\epsilon ApU$  быстро расщепляется и другой малоспецифичной рибонуклеазой — рибонуклеазой  $T_2$  в условиях, оптимальных для действия этого фермента [10]. Таким образом, динуклеозидмонофосфаты, содержащие остаток 1, N<sup>6</sup>-этноаденозина, являются субстратами исследованных малоспецифичных рибонуклеаз.

В связи с этим представляло особый интерес изучение возможности использования рибонуклеазы *P. brevicompactum* для синтеза олигонуклеотидов, содержащих этноадениновые звенья.

Мы изучили взаимодействие  $\epsilon A > p$  с этим ферментом в условиях, оптимальных для синтеза межнуклеотидной связи [6] (0°, рН 7,0). Как видно из табл. 2, в отсутствие акцептора фосфата  $\epsilon A > p$  в этих условиях гидролизуеться до  $\epsilon Ap$ , но скорость гидролиза значительно меньше, чем в случае немодифицированного  $A > p$ , который за 24 ч расщепляется на 90%. Помимо монофосфата ( $\epsilon Ap$ ), в инкубационной смеси было обнаружено присутствие небольших количеств еще одного продукта реакции, соответствующего по свойствам динуклеозиддифосфату  $\epsilon Ap \epsilon A > p$ . При добавлении в качестве акцептора фосфата цитидина гидролиз  $\epsilon A > p$  еще более замедляется и наблюдается синтез  $\epsilon ApC$  (см. рис. 1). Однако скорость синтеза невелика. Изменение значения рН инкубационной сме-

\* Когда данная работа была подготовлена для публикации, появилось сообщение о синтезе ряда динуклеозидмонофосфатов, в частности  $\epsilon ApU$ , модификацией природных динуклеозидмонофосфатов хлорацетальдегидом [9].

Характеристики полученных динуклеозидмонофосфатов

Динуклеозидмонофосфат	Состав	$E_{Ar}$	УФ-спектр					
			$\lambda_{\text{макс}}$	$\lambda_{\text{мин}}$	$\frac{E_{250}}{E_{260}}$	$\frac{E_{270}}{E_{260}}$	$\frac{E_{270}}{E_{260}}$	$\frac{E_{270}}{E_{260}}$
$\epsilon$ АрС Ар $\epsilon$ С	1 : 1 0,85 : 1	0,55 0,54	268 *	252	0,87	1,04	0,81	0,42
			262 *	232	0,72	0,89	0,56	0,27
			258 **	232	0,88	0,93	0,78	0,67
$\epsilon$ АрU	1 : 1,07	0,54	264					
			262 ***	234	0,77	0,89	0,60	0,36
			266 *	248	0,86	0,96	0,73	0,50
			269 **	246	0,85	1,02	0,83	0,55

\* В  $H_2O$ . \*\* В 0,1 н. HCl. \*\*\* В 0,1 н. KOH.

Таблица 2

Состав реакционной смеси (%) при взаимодействии  $\epsilon A > p$  с РНКазой *Penicillium brevicompactum*

Компоненты реакционной смеси	Время реакции, ч				
	4	28	52	68	94
$\epsilon$ Ар	11,6	12,5	12,2	13,6	15,0
$\epsilon$ Ар $\epsilon A > p$	—	1,4	2,4	2,8	3,5
$\epsilon A > p$	88,4	86,1	85,4	83,6	81,5

Таблица 3

Синтез динуклеозидмонофосфатов типа АрС, модифицированных в аденозиновом или цитидиновом остатках (рН 7,0)

Донор фосфата	Акцептор фосфата	Время синтеза, ч	Состав реакционной смеси, %			$NpN'/Np$	Выход **, %
			$NpN'$	$Np$	$N > p$		
$A > p$	С	144	40,8	21,2	38,0	1,9	65,8
$A > p^*$	С	24	37,5	30,9	27,8	1,2	52,2
$Me^0 A > p$	С	133	8,0	23,7	68,3	0,5	33,7
$Me^1 A > p$	С		Синтез не идет				
$\epsilon A > p$	С	144	3,6	7,4	89,0	0,5	32,7
$\epsilon A > p^*$	С	300	13,6	9,0	77,4	1,5	60,1
$A > p$	$AC^4C$	6	4,5	22,7	68,3	0,2	13,7
$A > p$	$Me^3C$		Синтез не идет				
$A > p$	$\epsilon C$	3	6,8	66,9	24,8	0,1	9,0
$A > p^*$	$\epsilon C$	7	6,2	69,0	20,7	0,1	7,8

\* Синтез проводили при рН 4,7.

\*\* Выход на израсходованный донор фосфата.

си до 4,6 приводит к значительно более быстрому образованию динуклеозидмонофосфата, как и при использовании немодифицированного  $A > p$ , однако, в отличие от результатов, полученных для немодифицированного донора фосфата [6], в данном случае наблюдается более высокая равновесная концентрация  $\epsilon$ АрС в смеси (см. рис. 1).

Инкубация  $A > p$  и  $\epsilon C$  [4] с ферментом в условиях, оптимальных для синтеза АрС, приводит к образованию динуклеозидмонофосфата Ар $\epsilon$ С (см. рис. 2). Синтез этого динуклеозидмонофосфата, в отличие от синтеза

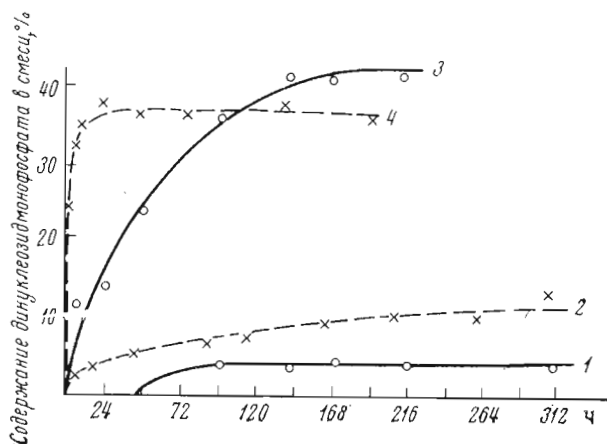


Рис. 1. Кинетика катализируемого рибонуклеазой *P. brevicompactum* синтеза  $\epsilon$ ArC при pH 7,0 (1), pH 4,6 (2) и ArC при pH 7,0 (3), pH 4,6 (4)

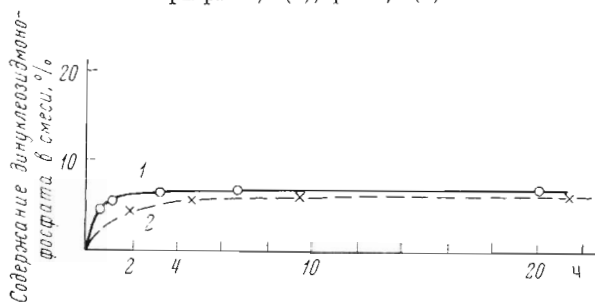


Рис. 2. Кинетика катализируемого рибонуклеазой *P. brevicompactum* синтеза ArεC при pH 7,0 (1), pH 4,6 (2)

$\epsilon$ ArC, практически не зависит от pH. Следует отметить, что в присутствии  $\epsilon$ C гидролиз  $A > p$  резко ускоряется, чего не наблюдается в присутствии цитидина.

Синтезированные динуклеозидмонофосфаты  $\epsilon$ ArC и ArεC были выделены препаративным электрофорезом на бумаге и очищены препаративной БХ. Структура полученных соединений подтверждалась расщеплением их рибонуклеазой *P. brevicompactum* с последующим анализом гидролизата методами БХ и УФ-спектроскопии. Характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 1.

Таким образом, на этих примерах показана принципиальная возможность введения флуоресцирующих этенодениновых и этеноцитидиновых производных в олигонуклеотиды с помощью рибонуклеазы *P. brevicompactum*. Такие соединения могут быть полезны при исследовании топографии активного центра ферментов, взаимодействующих с олигонуклеотидами.

В табл. 3 результаты опытов по синтезу  $\epsilon$ ArC и ArεC сопоставлены с данными синтеза немодифицированных субстратов, а также с результатами опытов с другими субстратами, модифицированными по  $-N-C(NH_2)$ -группировке гетеродиклического ядра нуклеозид-2',3'-циклофосфата или нуклеозида — акцептора фосфата [7, 8]. Эффективность  $\epsilon A > p$  как субстрата сравнима с эффективностью N<sup>6</sup>-метиладенозин-2',3'-циклофосфата [6].

Как было показано ранее [7], N<sup>1</sup>-метиладенозин-2',3'-циклофосфат ( $Me^1A > p$ ) не является субстратом исследуемого фермента. При обсуждении возможных причин этого явления было отмечено, что это может быть

связано с непосредственным участием N<sup>1</sup>-атома в связывании субстрата с ферментом и блокированием взаимодействия при введении Me-группы или с блокированием образования фермент-субстратного комплекса из-за положительного заряда гетероциклического ядра в N<sup>1</sup>-метиладенозин-2',3'-дифосфате при рН ферментативной реакции. Сохранение субстратных свойств у εA > р подтверждает справедливость второго варианта объяснения.

Аналогичные соображения справедливы и относительно значения атома азота N<sup>3</sup> в структуре цитидина — акцептора фосфата. εC близок по своим субстратным свойствам к N<sup>4</sup>-ацетилцитидину и отличается от N<sup>3</sup>-метилцитидина, не способного участвовать в данной реакции. Высокое значение отношения синтез : гидролиз, характерное для взаимодействия цитидина с A > р, связано, по-видимому, с присутствием незамещенной аминогруппы при C<sup>4</sup> гетероциклического ядра акцептора фосфата. Это соотношение существенно меньше при использовании в качестве акцепторов как N<sup>4</sup>-ацетилцитидина так и εC (см. табл. 3) и уридина [6]. Независимость этого соотношения от рН при реакции с εC аналогична картине, наблюдаемой при реакции с уридином, но не с цитидином.

### Экспериментальная часть

Водный раствор хлорацетальдегида получали хлорированием ацетальдегида [11], концентрацию хлорацетальдегида определяли как описано в работе [12]. Для получения димергидрата хлорацетальдегида использовали методику [13].

Хроматографию и электрофорез проводили на бумаге марки ленинградская М, предварительно промытой 2 н. HCl, 0,5%-ным раствором динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и водой. При хроматографии использовали следующие системы растворителей: изопропанол — конц. аммиак — вода, 7 : 2 : 1 (А), *n*-бутанол — этанол — вода, 13 : 8 : 4 (Б), этанол — 0,5 М ацетат аммония (рН 7,5), 7 : 3 (В). Электрофорез на бумаге проводили в приборе для вертикального электрофореза фирмы «Labor» (Венгрия) в течение 2 ч с градиентом напряжения 20 В/см в 0,05 М триэтиламмонийбикарбонате, рН 7,5. Электрофоретическая подвижность ( $E_{AP}$ ) приведена относительно аденозинфосфата.

УФ-спектры снимали на регистрирующем спектрофотометре «Spectrum» (ГДР). Для расчетов использовали коэффициенты экстинкции, приведенные в работе [14] для природных нуклеотидов и в работе [2] для εAp и εC.

В работе использовали аденозин-2'(3')-фосфат, аденозин-2',3'-дифосфат и цитидин фирмы «Reanal» (Венгрия), чистоту которых контролировали при помощи БХ, а также фосфодиэстеразу змеиного яда и рибонуклеазу T<sub>2</sub> (КФ 3.1.4.23) фирмы «Calbiochem» (США). Рибонуклеаза *P. brevicompactum* (КФ 3.1.4.23) была выделена С. И. Безбородовой и соавт. [5]. Для определения ферментативной активности использовали методику, предложенную в работе [5]. ApU был синтезирован нами по методу [6]. Синтез εC проведен в условиях, описанных в работе [1], с последующим осаждением нуклеозида ацетоном и очисткой методом препаративной БХ.

1, N<sup>6</sup>-этноаденозин-2'(3')-фосфат. К раствору 1 г (1,6 ммоль) аденозин-2'(3')-фосфата в 40 мл воды добавляли 3,5 г (20 ммоль) димергидрата хлорацетальдегида и доводили рН смеси до 4,5 добавлением 1 н. раствора NaOH. Реакционную смесь термостатировали 30 ч при 37°, поддерживая заданное значение рН смеси автоматическим добавлением раствора щелочи с помощью титриграфа ТТТ-11. После окончания реакции смесь медленно выливали при перемешивании в 1 л охлажденного до 0° ацетона, выпавший осадок отделяли центрифугированием и растворяли в 60 мл воды. Раствор пропускали через колонку (2 × 40 см) с дауэксом 1 × 8 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>),

колонку промывали водой (0,5 л), а затем раствором триэтиламмоний-бикарбоната (рН 8,0, линейный градиент концентрации от 0,4 до 0,6 М, объем сосудов 0,5 л). Фракции, содержащие продукт реакции (контроль по УФ поглощению), обрабатывали дауэксом-50 (H<sup>+</sup>) до рН 6,2—6,5, концентрировали в вакууме до небольшого объема, от остатка дважды отгоняли воду. Полученный раствор пропускали через колонку (1,5 × 75 см) с сефадексом G-10. Колонку промывали водой, нуклеотидные фракции объединяли и лиофилизировали. Выход εАр 1,35 ммоль (85%). R<sub>f</sub> 0,13 (А); 0,8 (В); 0,28 (В).

1, N<sup>6</sup>-этноаденозин-2',3'-циклофосфат. Растворяли 38 мкмоль εАр (триэтиламмониевая соль) в 1 мл воды, доводили рН раствора 0,1 н. HCl до 6,0, добавляли 80 мг *n*-толуолсульфоната циклогексил-β-[N-(N-метилморфолиний)]-этилкарбодимиды и оставляли на 4 ч при комнатной температуре, следя за тем, чтобы рН реакционной смеси сохранялось равным примерно 6,0. Затем всю реакционную смесь наносили на бумагу и делили методом электрофореза. Циклизация идет практически количественно. Полосы, содержащие εА > р, пришивали к новым листам бумаги и хроматографировали в системе А. В процессе хроматографии происходит частичное разложение εА > р до εАр, поэтому после элюции с хроматограмм удалось выделить только 12 мкмоль εА > р (31,5%; R<sub>f</sub> 0,79 (А); E<sub>Ar</sub> = 0,63).

1, N<sup>6</sup>-этноаденилил-(3' → 5')-уридин. Раствор 160 ОЕ<sub>260</sub> АрU в 8 мл 0,5 М раствора хлорацетальдегида в воде выдерживали при 37° и рН 4,5 (автоматическое подтитрование) в течение 24 ч и реакционную смесь лиофилизировали. Остаток растворяли в 1 мл воды и разделяли препаративной ВХ в системе Б. Из основной зоны с R<sub>f</sub> 0,05 получили εАрU, выход 70 ОЕ<sub>260</sub> R<sub>f</sub> 0,14 (А); 0,52 (В).

Гидролиз А > р, εА > р и εАрU неспецифичными рибонуклеазами. Инкубировали 20 ОЕ<sub>260</sub> субстрата при 37° а) в 0,15 мл 0,5 М ацетатного буфера (рН 4,5), содержащего 15 мкг рибонуклеазы Т<sub>2</sub> или б) в 0,1 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН 5,2), содержащего рибонуклеазу *P. brevicorpastrum* в концентрации 1 ед./мл. Пробы из гидролизатов анализировали методом ВХ (система А) с последующим спектрофотометрированием элюатов пятен, соответствующих определенным компонентам реакционной смеси. В гидролизате εАрU (в условиях опыта б) через 2 ч отношение (εАр + εА > р) : (U) найдено равным 1 : 1,07; изменение относительного содержания εАр и εА > р было следующим:

Часы	2	4	8	14	24
ε Ар, %	34	42	59	72	86
ε А > р, %	66	58	41	28	14

Синтез динуклеозидмонофосфатов АрС, εАрС и АрεС, катализируемый рибонуклеазой *P. brevicorpastrum*. Растворяли 12,5 мкмоль нуклеозид-2',3'-циклофосфата и 37,5 мкмоль нуклеозида в 0,1 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,0) или 0,2 М ацетатного буфера (рН 4,6), содержащего рибонуклеазу *P. brevicorpastrum* в концентрации 0,4 ед. акт/мл. Смесь инкубировали при 0°, пробы реакционной смеси анализировали через определенные промежутки времени методом электрофореза на бумаге с последующим спектрофотометрированием элюатов (Н<sub>2</sub>О, рН 7,0) пятен, соответствующих отдельным компонентам реакционной смеси. Результаты представлены на рис. 1 и 2 и в табл. 3.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kochetkov N. K., Shibaev V. N., Kost A. A. (1971) Tetrahedron Lett., 1993—1996.
2. Barrio J. R., Secrist III J. A., Leonard N. J. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 46, 597—604.
3. Secrist III J. A., Barrio J. R., Leonard N. J., Weber G. (1972) Biochemistry, 11, 3499—3506.

4. Кочетков Н. К., Шibaев В. Н., Кост А. А. (1972) Докл. АН СССР, 205, 100—103.
5. Безбородова С. И., Ильина Т. В., Крупянко В. И. (1970) Докл. АН СССР, 196, 1460—1462.
6. Хабарова М. И., Женодарова С. М. (1972) Молекулярн. биология, 6, 682—688.
7. Седелникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 27—35.
8. Масленикова Т. А., Седелникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М. (1973) Молекулярн. биология, 7, 36—41.
9. Tolman G. L., Baggio J. R., Leonard N. J. (1974) Biochemistry, 13, 4869—4877.
10. Sato S., Uchida T., Egami F. (1966) Arch. Biochem. and Biophys., 115, 48—52.
11. Патент Японии № 1982 (1954) РЖ Химия, 1957, № 1, 2085 П.
12. Явницкий Б. Г., Сатаповская Ц. И. (1964) Ж. общ. химии, 34, 1043—1048.
13. Явницкий Б. Г., Дольберг Е. В., Сатаповская Ц. И. (1970). Методы получения химических реактивов и препаратов, изд. ИРЕА, НИИТЭХИМ, М., вып. 21, 8—11.
14. Вепкстерн Т. В., Баев А. А. (1967) Спектры поглощения миворных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, «Наука», М.

Поступила в редакцию  
10.1.1975

**1, N<sup>6</sup>-ETHENOADENOSINE 2',3'-CYCLIC PHOSPHATE  
AND 3,N<sup>4</sup>-ETHENOCYTIDINE AS SUBSTRATES FOR RIBONUCLEASE  
FROM *PENICILLIUM BREVICOMPACTUM***

ZHENODAROVA S. M., SEDELNIKOVA E. A., SMOLJANINOVA O. A.,  
SHIBAEV V. N., KOST A. A.

*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the USSR,  
Pushchino, N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Interaction of adenosine 2'(3')-phosphate and adenylyl (3'—5') uridine with chloroacetaldehyde leads to 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenosine phosphate which is converted to 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenosine 2',3'-cyclic phosphate and 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenylyl (3' → 5') uridine. These compounds and 3,N<sup>4</sup>-ethenocytidine were found to serve as substrates for ribonuclease from *Penicillium brevicompactum* in hydrolytic and sunthetic reactions. Efficiency of 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenosine 2',3'-cyclic phosphate and 3,N<sup>4</sup>-ethenocytidine as substrates for dinucleoside phosphate synthesis is similar to that of adenosine and cytidine derivatives substituted at the exocyclic amino group. Enzymatic synthesis of 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenylyl (3'→5') cytidine and adenylyl (3'→5') ethenocytidine has been described. *Penicillium brevicompactum* ribonuclease may be used for preparation of modified oligonucleotides with fluorescent heterocyclic nuclei.