



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.112.855:54.057:541.6

СИНТЕЗ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ НУКЛЕОТИДОПЕПТИДОВ
ФОСФОЭФИРНОГО И ФОСФАМИДНОГО ТИПОВ

Юодка В. А.

Вильнюсский государственный университет им. В. Каспукаса

В обзоре приведены данные о методах синтеза модельных нуклеотидопептидов с фосфодиаэфирной и фосфамидной связями между компонентами, об их реакционной способности. Обсуждаются методы специфического расщепления фосфамидной и фосфоэфирной связей в нуклеотидопептидах, их поведение по отношению к нуклеазам и протеиназам, а также применение в молекулярной биологии.

В последние годы из различных прокариотических и эукариотических источников выделены смешанные НК-белковые биополимеры с ковалентной связью между компонентами (см. обзоры [1, 2]). При действии топоизомераз на различные формы ДНК образуются промежуточные ковалентные фермент-ДНК-структуры (см. обзоры [3-6]). Ковалентные нуклеотид-белковые структуры образуются при действии ряда ферментов, катализирующих реакции по пинг-понг-механизму (см. обзор [4]). Исследователей в данной области интересует структура нуклеотид(НК)-белковых комплексов, в том числе и тип межбиополимерной связи, а также их функции. В решении этих вопросов важную роль могут сыграть синтетические нуклеотидопептиды с различными ковалентными связями между компонентами. Установлено, что практически во всех природных нуклеотид- и НК-белковых структурах (исключение составляют лишь аминоксил-тРНК) белковая часть молекулы присоединяется к НК или нуклеотиду через фосфатный остаток. В литературе описаны разные производные нуклеотидов и олигонуклеотидов, в которых аминокислоты (пептиды) присоединены к остатку фосфорной кислоты. С другой стороны, белковая молекула может присоединяться к фосфатному остатку через любую свою функциональную группу. Поэтому изучались свойства модельных соединений с фосфодиаэфирной связью, в образовании которой участвуют аминокислоты, содержащие гидроксильную группу, и с фосфамидной связью, в образовании которой принимает участие имидазольное кольцо гистидина, ϵ -аминогруппа лизина и α -аминогруппы разных аминокислот. Особое значение имело подробное исследование влияния структуры нуклеотидного и аминокислотного компонентов и функционального окружения на поведение той или иной нуклеотидопептидной связи в синтетических нуклеотидопептидах. При выделении и различной обработке НК-белковых структур функциональные группы НК или белка могут оказаться близко расположенными по отношению к межбиополимерной связи. Необходимо знать, как они будут влиять на свойства этой связи, тем более что известна миграция нуклеотидного остатка с одной функциональной группы аминокислот на другую [7]. Такая миграция может привести к ошибочному выводу о природе нуклеотидопептидной связи в нативном комплексе. Исследование модельных соединений поможет понять, как обойти нежелательные процессы. Нуклеотидопептиды, в которых рядом с центром, соединяющим отдельные компоненты, находятся функциональные группы, интерес-

Сокращения: DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид, TPS-Cl — триизопропилбензолсульфохлорид; CDI — N,N'-карбонилдимидазол, НК — нуклеиновая кислота.

ны и энзимологам. Ферменты ускоряют химические реакции частично потому, что с их помощью сближаются субстраты, а функциональные группы активных центров принимают непосредственное участие в кислотно-основном катализе. Удобным подходом к решению этих вопросов является использование модельных структур, в которых сближение и ориентация реагирующих групп произошли в результате ковалентного связывания содержащих их компонентов в пределах одной молекулы. Такими моделями могут служить и нуклеотидопептиды, имеющие в своем составе свободные карбоксильные, гидроксильные и аминогруппы. Обсуждаемый класс органических соединений интересен как с молекулярно-биологической, так и с химической точки зрения, так как явления внутримолекулярного катализа в сложных фосфоорганических соединениях исследованы недостаточно.

Цель данного обзора — суммировать данные по синтезу, реакционной способности и применению синтетических нуклеотидопептидов фосфоэфирного и фосфамидного типов. Результаты о синтетических нуклеотидопептидах, полученные до 1968 г., опубликованы в обзоре [8]. Новое направление биоорганической химии, посвященное модельным нуклеотидопептидам, было начато М. А. Прокофьевым и З. А. Шабаровой в МГУ, а потом продолжено в Вильнюсском государственном университете.

1. Синтез нуклеотидопептидов

Нуклеотидопептиды фосфоэфирного и фосфамидного типа синтезированы с помощью пирофосфатного метода, а также методов, использующих DCC, TPS-Cl и CDI в качестве конденсирующих агентов. Выбор агентов, активирующих фосфатный остаток, и определение оптимальных условий реакций стали основными проблемами этой части работы. Для синтеза более сложных нуклеотидопептидов были отработаны химические и ферментативные методы наращивания пептидной и олигонуклеотидной цепей в простых исходных нуклеотидопептидах.

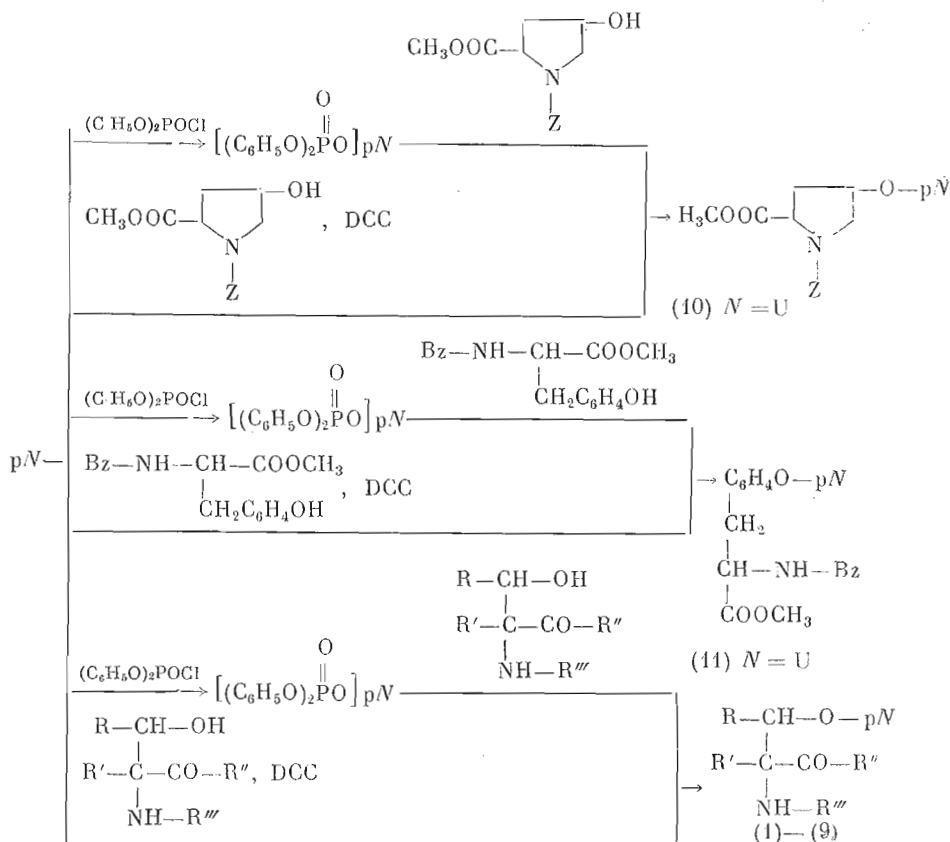
1.1. Синтез нуклеотидил($P \rightarrow O$)аминокислот (пептидов) и их сложных эфиров

Модельные нуклеотидопептиды фосфоэфирного типа являются интересными соединениями с точки зрения органической химии фосфора и с биологической точки зрения. Недавно установлено (см. обзоры [1–6]), что в некоторых нуклеотид- и НК-белковых комплексах отдельные компоненты также соединены между собой с помощью фосфоэфирной связи.

Синтез сложных эфиров нуклеотидил($P \rightarrow O$)-*N*-ациламинокислот (дипептидов) осуществлен с помощью DCC и пирофосфатным методом (схема 1) [7–14].

В случае пирофосфатного метода остаток фосфорной кислоты нуклеотида активируется с помощью дифенилхлорфосфата [15]. Прибавление к P^1 -нуклеозид-5'- P^2 -дифенилди фосфату сложных эфиров *N*-ациламинокислот (дипептидов) со свободной оксигруппой приводит к образованию сложных эфиров нуклеотидил($5' \rightarrow O$)-*N*-ациламинокислот (дипептидов). Выходы продуктов реакции не превышали 20%. Прибавление в реакционную смесь пиридина или триалкиламина увеличивало выход до 60%. Однако пирофосфатный метод весьма трудоемок и не всегда воспроизводим. Лучшим методом синтеза сложных эфиров нуклеотидил($5' \rightarrow O$)аминокислот оказался карбодимидный метод. Кипячение реакционной смеси в течение 1 ч в абс. пиридине с DCC приводит к образованию продуктов реакции с выходами до 80%. С помощью пирофосфатного и карбодимидного методов синтезированы сложные эфиры уридилл($5' \rightarrow O$)-*N*-*Z*-производных *DL*-серина (1), *DL*-треонина (2), 2-метил-*DL*-серина (3), *DL*-серилглицина (4), *DL*-треонилглицина (5), *DL*-серил-*DL*-аланина (6), *N*-*Z*-*DL*-сериновые фосфоэфиры 5'-дезокситимидиловой (7), 5'-дезоксигидриловой (8), 5'-дезоксиадениловой (9) кислот, метиловые эфиры уридилл($5' \rightarrow O$)-производных *N*-*Z*-*L*-оксипролина (10) и *N*-*Bz*-*L*-тирози-

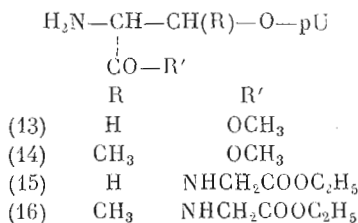
Схема 1



- (1) $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$, $\text{R}''=\text{OCH}_3$, $\text{R}'''=\text{Z}$, $\text{N} = \text{U}$
- (2) $\text{R}=\text{CH}_3$, $\text{R}'=\text{H}$, $\text{R}''=\text{OCH}_3$, $\text{R}'''=\text{Z}$, $\text{N} = \text{U}$
- (3) $\text{R}=\text{H}$, $\text{R}'=\text{CH}_3$, $\text{R}''=\text{OCH}_3$, $\text{R}'''=\text{Z}$, $\text{N} = \text{U}$
- (4) $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$, $\text{R}''=\text{NHCH}_2-\text{COOC}_2\text{H}_5$, $\text{R}'''=\text{Z}$, $\text{N} = \text{U}$
- (5) $\text{R}=\text{CH}_3$, $\text{R}'=\text{H}$, $\text{R}''=\text{NHCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, $\text{R}'''=\text{Z}$, $\text{N} = \text{U}$
- (6) $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$, $\text{R}''=\text{OCH}_3$, $\text{R}'''=\text{COCH}(\text{CH}_3)\text{NH}-\text{Z}$, $\text{N} = \text{U}$
- (7) $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$, $\text{R}''=\text{OCH}_3$, $\text{R}'''=\text{Z}$, $\text{N} = \text{dT}$
- (8) $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$, $\text{R}''=\text{OCH}_3$, $\text{R}'''=\text{Z}$, $\text{N} = \text{dC}$
- (9) $\text{R}=\text{R}'=\text{H}$, $\text{R}''=\text{OCH}_3$, $\text{R}'''=\text{Z}$, $\text{N} = \text{dA}$

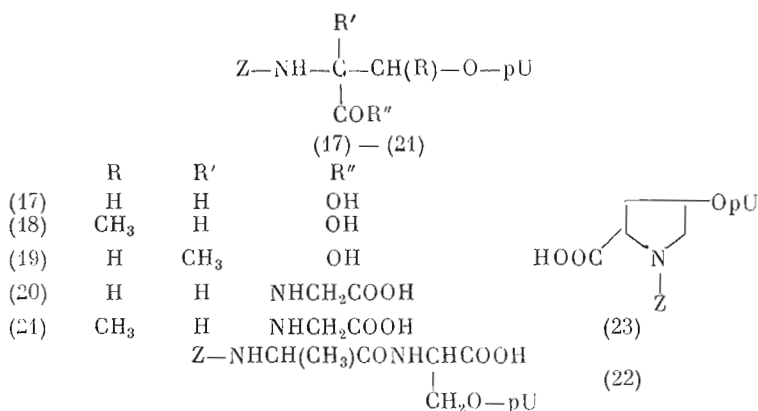
на (11). Карбодимидный метод был использован и для синтеза метилового эфира дезокситимидилил ($5' \rightarrow \text{O}$)- $\text{N}-\text{Z}-\text{DL}$ -серина (12).

Бензилоксикарбонильная группа в сложных эфирах уридиллил ($5' \rightarrow \text{O}$)- $\text{N}-\text{Z}$ -аминокислот (дипептидов) удалялась гидрированием над-окисью платины [9] или с помощью HBr в абс. диоксане [7, 13]. Таким путем получены сложные эфиры уридиллил ($5' \rightarrow \text{O}$)-производных DL -серина (13), DL -треонина (14), DL -серилглицина (15) и DL -треонилглицина (16):



Уридиллил ($5' \rightarrow \text{O}$)- $\text{N}-\text{Z}$ -аминокислоты (дипептиды) со свободной карбоксильной группой получены мягким омылением сложноеэфирных производных. Определены оптимальные условия реакции [13, 14]. Таким образом получены уридиллил ($5' \rightarrow \text{O}$)- $\text{N}-\text{Z}$ -производные DL -серина (17),

DL-треонина (18), 2-метил-*DL*-серина (19), *DL*-серилглицина (20), *DL*-треонилглицина (21), *DL*-аланил-*DL*-серина (22) и *L*-оксипролина (23):



Синтез нуклеотидопептидов с более длинной пептидной цепочкой осуществлен методом ступенчатого наращивания пептидной цепи [13, 14]. Возможно удлинение пептидной цепи с N- или C-конца оксиаминокислот. В первом случае из *Ser-P-5'-Urd-Gly-OEt* (15) и *Z-Ala* получен *Z-Ala-Ser-P-5'-Urd-Gly-OEt* (24), а из *Thr-P-5'-Urd-Gly-OEt* (16) и *Z-Ala* синтезирован *Z-Ala-Thr-P-5'-Urd-Gly-OEt* (25) с выходом 80%. Во втором случае из *Z-Ser-P-5'-Urd-OH* (17) и *H-Gly-OEt* получен *Z-Ser-P-5'-Urd-Gly-OEt* (4), а из *Z-Thr-P-5'-Urd-Gly-OH* (22) и *H-Leu-OEt* синтезирован *Z-Thr-P-5'-Urd-Gly-Leu-OEt* (26) с выходом 60%. В обоих случаях активатором карбоксильной группы использован DCC и реакция проводилась в абс. диметилформамиде.

1.2. Синтез нуклеотидил(5' → N)- и нуклеотидил(3' → N)аминокислот (пептидов) и их сложных эфиров

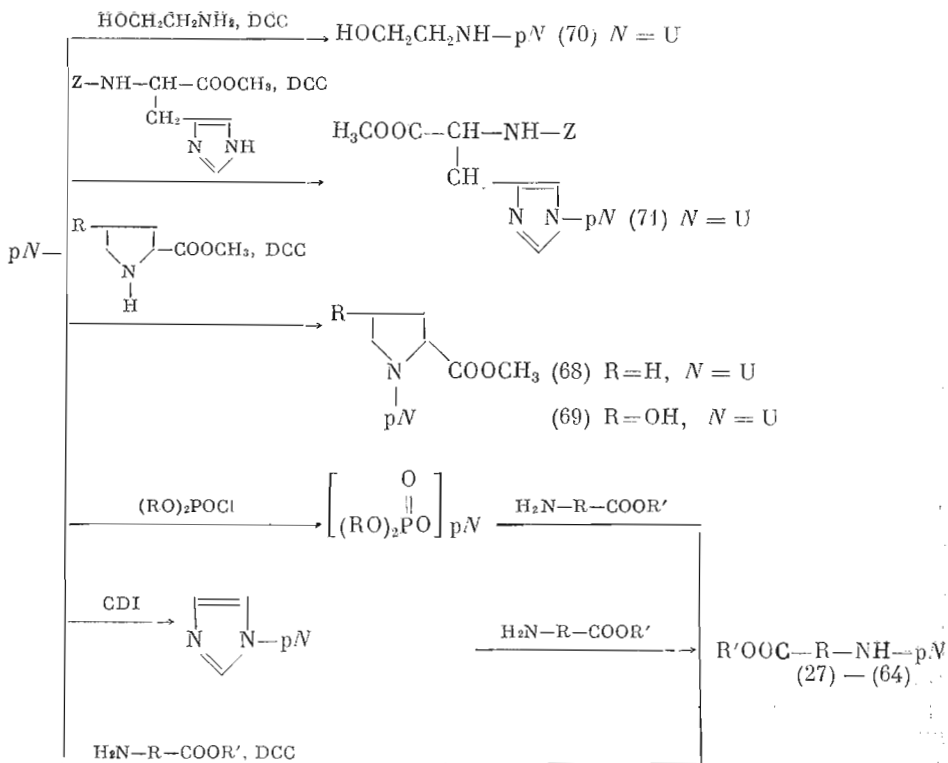
Вначале для синтеза сложных эфиров нуклеотидил(*P*→*N*)аминокислот был применен фосфитный метод [16]. Однако он многостадийен и дает низкие выходы продуктов реакции. В настоящее время для синтеза нуклеотидопептидов фосфамидного типа используются пирофосфатный метод и методы с использованием DCC и CDI (схема 2) (см. обзор [8] и работы [17–21]). Для синтеза простых амидов нуклеотидов успешно применена активация фосфатного остатка с помощью смеси трифенилфосфина и 2,2'-дипиридилдиселенида [22].

В случае пирофосфатного метода из примененных дифенил-, ди(*n*-нитрофенил)- и ди(2,2,2-трихлорэтил)хлорфосфатов рациональнее использовать последний, так как этот диалкилхлорфосфат более устойчив при хранении и его использование приводит к высоким выходам (80–90%) продуктов реакции [19]. Методы, использующие CDI и DCC в орга-

Таблица 1

Синтез нуклеотидил-5-(5' → N)-пептидов путем удлинения пептидной цепи

Исходные соединения	Получено	Номер соединения
<i>Urd-5'-P-Thr-Gly</i> и <i>Phe-OEt</i>	<i>Urd-5'-P-Thr-Gly-Phe-OEt</i>	(72)
<i>Urd-5'-P-Thr-Gly</i> и <i>Phe-Gly-OEt</i>	<i>Urd-5'-P-Thr-Gly-Phe-Gly-OEt</i>	(73)
<i>Urd-5'-P-Leu</i> и β <i>Ala-OEt</i>	<i>Urd-5'-P-Leu-βAla-OEt</i>	(74)
<i>Urd-5'-P-Gly</i> и β <i>Ala-OEt</i>	<i>Urd-5'-P-Gly-βAla-OEt</i>	(75)
<i>Urd-5'-P-Gly-Phe</i> и β <i>Ala-OEt</i>	<i>Urd-5'-P-Gly-Phe-βAla-OEt</i>	(76)
<i>Urd-5'-P-Gly-Gly</i> и β <i>Ala-OEt</i>	<i>Urd-5'-P-Gly-Gly-βAla-OEt</i>	(77)
<i>Urd-5'-P-Ala-Ala</i> и <i>Ala-Ala-OEt</i>	<i>Urd-5'-P-Ala-Ala-Ala-Ala-OEt</i>	(78)
<i>Urd-5'-P-Ala-Leu</i> и <i>Ala-Val-OEt</i>	<i>Urd-5'-P-Ala-Leu-Ala-Val-OEt</i>	(79)
<i>dThd-5'-P-Gly</i> и <i>Gly-Phe-OEt</i>	<i>dThd-5'-P-Gly-Gly-Phe-OEt</i>	(80)



(27) $R = \text{CH}_2, R' = \text{CH}_3, N = U$

(28) $R = \text{CH}(\text{CH}_3), R' = \text{CH}_3, N = U$

(29) $R = \text{CH}[\text{CH}(\text{CH}_3)_2], R' = \text{CH}_3, N = U$

(30) $R = \text{CH}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2], R' = \text{CH}_3, N = U$

(31) $R = (\text{CH}_2)_2, R' = \text{CH}_3, N = U$

(32) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{COOCH}_3), R' = \text{CH}_3, N = U$

(33) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5), R' = \text{CH}_3, N = U$

(34) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}), R' = \text{CH}_3, N = U$

(35) $R = \text{CH} \left(\text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{NH} \\ | \\ \text{N} \end{array} \right), R' = \text{CH}_3,$

$N = U$

(36) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{OH}), R' = \text{CH}_3, N = U$

(37) $R = \text{CH}[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}], R' = \text{CH}_3, N = U$

(38) $R = \text{CH}_2\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{OH}), R' = \text{CH}_3,$
 $N = U$

(39) $R = \text{CH}_2\text{CONHCH}[\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}],$
 $R' = \text{CH}_3, N = U$

(40) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})\text{CONHCH}_2, R' = \text{CH}_3,$
 $N = U$

(41) $R = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONHCH}_2, R' = \text{CH}_3,$
 $N = U$

(42) $R = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONHCH}(\text{CH}_3), R' = \text{CH}_3,$
 $N = U$

(43) $R = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONHCN}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2],$
 $R' = \text{CH}_3, N = U$

(44) $R = \text{CH}_2\text{CONHCH}_2, R' = \text{CH}_3, N = U$

(45) $R = \text{CH}_2\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5), R' = \text{CH}_3,$
 $N = U$

(46) $R = \text{CH}[(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2], R' = \text{CH}_3, N = U$

(47) $R = \text{CH} \left(\text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{NH} \\ | \\ \text{N} \end{array} \right), R' = \text{CH}_2,$
 $N = U$

(48) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3), R' = \text{CH}_3,$
 $N = U$

(49) $R = \text{CH}[(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2],$
 $R' = \text{CH}_3, N = U$

(50) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5), R' = \text{CH}_3, N = A$

(51) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5), R' = \text{CH}_3, N = C$

(52) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5), R' = \text{CH}_3, N = G$

(53) $R = \text{CH} \left(\text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{NH} \\ | \\ \text{N} \end{array} \right), R' = \text{CH}_3,$

$N = A$

(54) $R = \text{CH} \left(\text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{NH} \\ | \\ \text{N} \end{array} \right), R' = \text{CH}_3,$

$N = C$

(55) $R = \text{CH}[(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2], R' = \text{CH}_3, N = A$

(56) $R = \text{CH}[(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2],$
 $R' = \text{CH}_3, N = A$

(57) $R = \text{CH}_2; R' = \text{CH}_3, N = dT$

(58) $R = \text{CH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5), R' = \text{C}_2\text{H}_5, N = dT$

(59) $R = \text{CH}(\text{CH}_3); R' = \text{C}_2\text{H}_5, N = dT$

- (60) $R = CH_2CONHCH(CH_2C_6H_5)$, $R' = C_2H_5$, $N = dT$ (65) $R = CH_3$,
 $N = dT$
(61) $R = CH(CH_2C_6H_5)$; $R' = CH_3$, $N = dA$
(62) $R = CH(CH_2C_6H_5)$, $R' = CH_3$, $N = dU$ $dTp-NH-\overset{R}{\underset{|}{CH}}-COOCH_3$
(63) $R = (CH_2)_4CH(NH_2)$, $R' = CH_3$, $N = U$ (66) $R = CH(CH_3)OH$,
(64) $R = (CH_2)_4CH(NH_2)$, $R' = CH_3$, $N = A$ (67) $R = CH_2C_6H_5$

нических растворителях, хороши только для легко растворяющихся пиримидиновых нуклеотидов [20]. Лучшим методом синтеза сложных эфиров нуклеотидил (P→N) аминокислот (пептидов) является карбодимидный метод в смеси *трет*-бутилового спирта и воды (3 : 1). Кипячение реакционной смеси в течение 1 ч приводит к полному исчезновению нуклеотида в реакционной смеси. Эти условия не подходят для синтеза аминокислотных производных пуриновых дезокси-нуклеотидов, так как имеет место частичное расщепление гликозидной связи [23]. Таким образом получены соединения (27)–(37), (39)–(71).

Нуклеотидил (5'→N) пептиды с пептидным фрагментом больше двух аминокислот синтезированы методом ступенчатого, или блочного, удлинения пептидной цепи [24–26]. Карбоксильную группу в нуклеотидил (5'→N) аминокислотах (дипептидах) активировали с помощью DCC и реакцию со сложными эфирами аминокислот (пептидов) проводили в абс. диметилформамиде. Установлено, что в качестве исходного соединения целесообразнее использовать дипептидные производные нуклеотида, так как в моноаминокислотном аналоге под влиянием α-карбоксильной группы имеют место побочные процессы, приводящие к частичному расщеплению исходного соединения. Этим методом получены соединения (72)–(80) (табл. 1).

Дезоксиаденилил (3'→N^α) лизин (81) и дезоксиаденилил (3'→N^ε) лизин (82) синтезировали из ангидрида мезитиленкарбоновой кислоты и нуклеотида с последующим прибавлением лизина при pH 10 [27].

Уридил (5'→N^α)-производные глицина (83), аланина (84), валина (85), лейцина (86), β-аланина (87), фенилаланина (88), тирозина (89), гистидина (90), глицилглицина (91), глицилфенилаланина (92), аланилаланина (93), аланиллейцина (94), пролина (95), оксипролина (96), а также dThd-5'-P-Gly (97), Ado-5'-P-Phe (98), Guo-5'-P-Phe (99), Cyd-5'-P-Phe (100), dThd-3'-P-Phe (101), dThd-3'-P-Ala (102), dThd-3'-P-Thr (103) были получены омылением сложнэфирных производных [28–30].

1.3. Синтез олигонуклеотидил (P → N) аминокислот

Для синтеза олигонуклеотидил (P→N) аминокислот могут быть использованы два пути: присоединение аминокислотного компонента к готовому олигонуклеотиду или наращивание олигонуклеотидной цепи в мононуклеотидном производном аминокислоты.

При синтезе олигонуклеотидил (P→N) аминокислот первым способом остаток фосфорной кислоты олигонуклеотида активировался с помощью DCC [20, 26]. Реакция проведена при кипячении в смеси *трет*-бутилового спирта и воды. С выходами 60–90% получены dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-Phe-OEt (104) и dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-Phe-OEt (105). Этот метод неприменим для синтеза пуриновых дезоксирибоолигонуклеотидопептидов. Для синтеза аминокислотных производных дезоксирибонуклеотидов активирующим агентом можно использовать хлорангидрид мезитиленкарбоновой кислоты. Таким путем были получены dAdo-3'-P-5'-dAdo-3'-P-5'-dAdo-3'-P-Lys (106) и dAdo-3'-P-5'-dAdo-3'-P-5'-dAdo-3'-P- $\underset{Lys}{-}$ (107) с выходами 12 и 40% соответственно [26]. Однако лучшим способом синтеза дезоксиолигорибонуклеотидопептидов следует считать карбодимидный метод в органических растворителях [31].

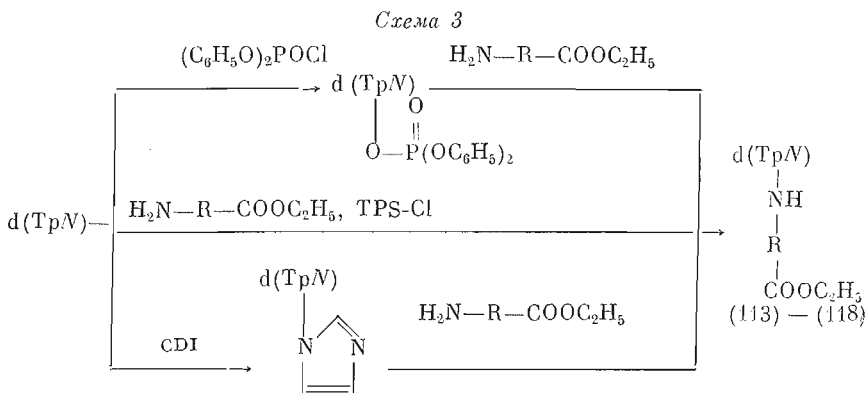
При синтезе олигонуклеотидил (P→N) аминокислот путем постепенного наращивания олигонуклеотидной цепи использованы химический и ферментативный методы [26]. Инкубация dThd-5'-P-Phe-OEt и P-5'-dThd-Ac в присутствии TPS-Cl приводит к 65% выходу Ac-dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-Phe-OEt (108). Обработка последнего кислотой дает P-5'-dThd-3'-P-5'-dThd-Ac, который далее используется для следующего акта удлинения цепи. Выход Ac-dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-Phe-OEt (109) 40%.

Интерес вызывает синтез фенилаланиновых амидов олиготимидиловых кислот с помощью химической полимеризации dTMP в присутствии в качестве терминирующего агента dThd-5'-P-Phe-OMe [32]. Этим методом удалось получить аминокислотные производные олигонуклеотидов, длина цепи в которых варьировала от 2 до 8 мононуклеотидов. Основным недостатком этого метода является сложность разделения продуктов полимеризации, среди которых имеется большое количество циклических (3',5')-олигонуклеотидов.

Для синтеза аминокислотных производных олигорибонуклеотидов были применены гуаниловая, панкреатическая рибонуклеазы и полинуклеотид-фосфорилаза из *E. coli* [23, 26, 33]. Из P-2':3'-Urd-5'-P-Phe-OEt и цитидина с помощью панкреатической рибонуклеазы синтезирован Cyd-5'-P-3'-Urd-5'-P-Phe-OEt (110), из P-2':3'-Guo-5'-P-Phe-OMe и уридина с помощью гуаниловой рибонуклеазы синтезирован Urd-5'-P-3'-Guo-5'-P-Phe-OMe (111), а из Ado-5'-P-His-OEt и UDP с помощью полинуклеотид-фосфорилазы получен Urd-5'-P-3'-Ado-5'-P-His-OEt (112).

1.4. Синтез олигонуклеотидил (P → N) аминокислот, содержащих остаток аминокислоты у межнуклеотидного атома фосфора

Для активации межнуклеотидного фосфата были использованы дифенилхлорфосфат, TPS-Cl и CDI (схема 3) [23, 34, 35].



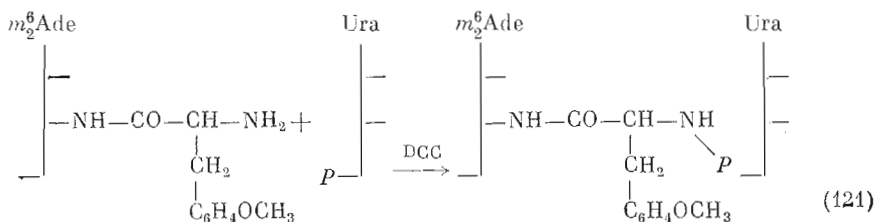
- (113) R=CH(CH₂C₆H₅), N = dT
 (114) R=CH(CH₂OH), N = dT
 (115) R=CH(CH₂OH), N = dC
 (116) R=CH[(CH₂)₄NH₂], N = dT
 (117) R=(CH₂)₄CH(NH₂), N = dT
 (118) R=CH(CH₂C₆H₅), N = dA

Лучшим методом, позволяющим получать олигонуклеотидил (P→N) аминокислоты указанного строения с выходами до 70%, является имидазольный метод.

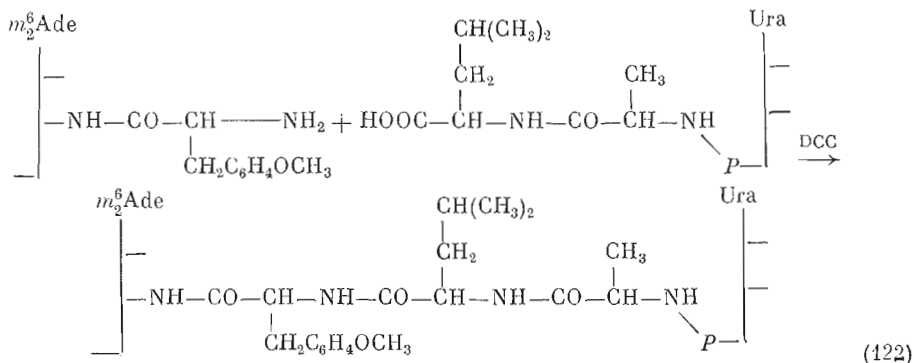
Вышеуказанными методами были синтезированы dThd-3'-P(-Phe-OEt)-(-5'-dThd) (113), dThd-3'-P(-Ser-OEt)(5'-dThd) (114), dThd-3'-P(-Ser-OEt)-(-5'-dCyd) (115), dThd-3'-P(-Lys-OEt)-(-5'-dThd) (116), dThd-3'-P(Lys-OEt)-(-5'-dThd) (117) и dThd-3'-P(-Phe-OEt)-(-5'-dAdo) (118). dThd-3'-P(-Phe)-(-5'-dThd) (119) и dThd-3'-P(-Phe)-(-5'-dAdo) (120) получены омылением сложнэфирных производных [36].

1.5. Моделирование белковых мостиков в нуклеиновых кислотах

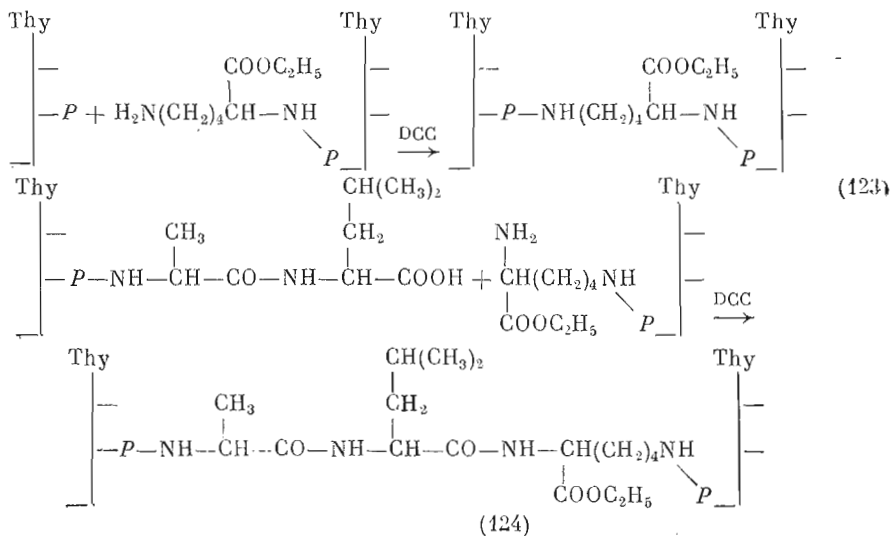
Недавно показано (см. обзор [1], а также работы [37–41]), что белки с помощью ковалентных связей могут сшивать отдельные фрагменты нуклеиновых кислот. Тип химических связей в таких смешанных биополимерах неизвестен. Для моделирования белковых мостиков использован пуromицин [23]. При инкубации его с UMP в смеси *tert*-бутилового спирта и воды в присутствии DCC с 75% выходом образуется уридил (5'→N) пуromицин (121).



Аналогично из пуromицина и Urd-5'-*P*-Ala-Leu с выходом 32% синтезировано соединение (122), в котором сшивающий пептид состоит из трех аминокислот.



Известно [37], что ДНК с белковыми мостиками устойчивы в щелочной среде. Не исключено, что к 3'- и 5'-концам фрагментов ДНК белки присоединяются фосфамидной связью. Недавно синтезированы простейшие модели такого типа (неопубликованные данные автора).



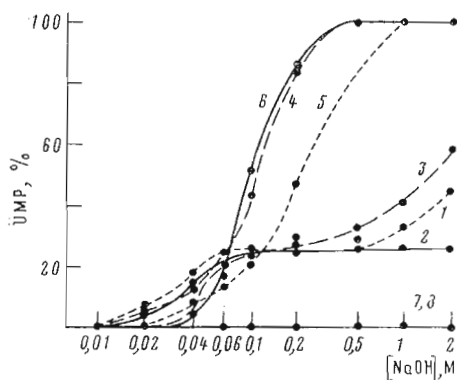


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость степени расщепления фосфоэфирной связи в эфирах Z-Ser(-P-5'-Urd)-OMe (1), Z-Thr(-P-5'-Urd)-OMe (2), Z-Ala-Ser(-P-5'-Urd)-OMe (3), Z-Ser(-P-5'-Urd)-Gly-OEt (4), Z-Thr(-P-5'-Urd)-Gly-OEt (5), Z-Ala-Ser(-P-5'-Urd)-Gly-OEt (6), Z-Hyp(-P-5'-Urd)-OMe (7), Vz-Tyr(-P-5'-Urd)-OMe (8) от концентрации кислоты и щелочи

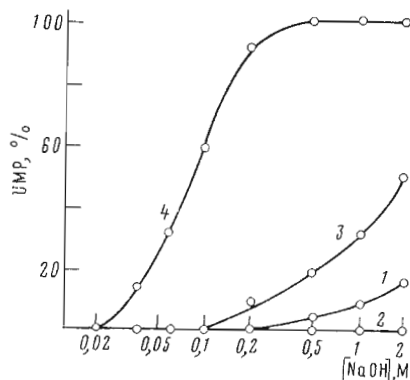


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость степени расщепления фосфоэфирной связи в Z-Ser(-P-5'-Urd) (1), Z-Thr(-P-5'-Urd) (2), Z-Ala-Ser(-P-5'-Urd) (3), Z-Ser(-P-5'-Urd)-Gly (4) от концентрации щелочи

Активация фосфатного остатка в случае синтеза соединений (123) и карбоксильной группы в случае синтеза (124) проводилась с помощью ДСС. Выход соединений достигает 50–70%.

2. Исследование реакционной способности нуклеотидопептидов

2.1. Гидролитическая устойчивость нуклеотидил(P → O)аминокислот (пептидов)

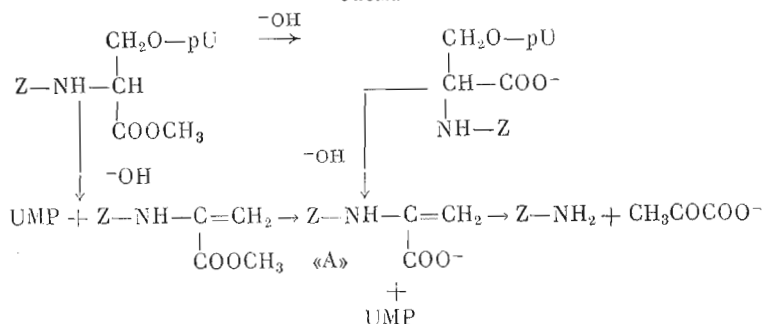
Нуклеотидопептиды фосфоэфирного типа практически не были изучены. Этот вопрос стал особенно актуальным в связи с обнаружением фосфодиэфирной связи в некоторых природных нуклеотид- и НК-белковых структурах (см. обзоры [1, 2]). Гидролитическая устойчивость некоторых сложных эфиров уридиллил(5' → O)-N-ациламинокислот (пептидов) в зависимости от pH среды приведена на рис. 1 [12–14].

Из рис. 1 следует, что фосфодиэфирная связь в сложных эфирах нуклеотидил(P → O)-N-ациламинокислот (пептидов) устойчива в кислой среде. Поведение этой связи в щелочной среде сильно зависит от природы аминокислот, содержащих оксигруппу. Оксипролиновое (10) и тирозиновое (11) производные уридиловой кислоты устойчивы даже в 2 н. NaOH. Сериновые (1), (4), (6), (24) и треониновые (2), (5) аналоги хорошо расщепляются в щелочной среде. Однако эффективность их расщепления сильно зависит от состояния карбоксильной группы у серина и треонина (рис. 2).

Различие в поведении тирозинового и оксипролинового производных уридиловой кислоты в щелочной среде по сравнению с сериновыми и треониновыми аналогами обусловлено разными механизмами расщепления фосфодиэфирной связи [12–14]. Было установлено, что в случае первых двух соединений в жестких щелочных условиях (2 н. NaOH, 100° C, 1 ч) имеет место расщепление фосфодиэфирной связи по механизму нуклеофильного замещения у тетраэдрического атома фосфора с участием гидроксил-аниона, а сериновые и треониновые производные нуклеотидов расщепляются по механизму β-элиминирования (схема 4).

Доказательство такого механизма получено обнаружением промежуточного соединения «А» (λ_{max} 241 нм), а также конечного продукта расщепления — пировиноградной кислоты. Суммарное количество этих соединений всегда было равно количеству уридиловой кислоты. Это говорит о том, что β-элиминирование является единственным механизмом расщепле-

Схема 4



ния сложных эфиров нуклеотидил(5'→O)-N-Z-β-оксиаминокислот (пептидов) в щелочной среде. Появление свободной карбоксильной группы у оксиаминокислот сильно затрудняет β-элиминирование (см. рис. 1 и 2). Интересно, что треониновые производные стабильнее сериновых аналогов. Недавно установлено [13, 14], что природа нуклеотида не влияет на эффективность β-элиминирования.

Дополнительное доказательство механизма β-элиминирования в сериновых и треониновых фосфоэфирах нуклеотида получено при исследовании метилового эфира уридил(5'→O)-N-Z-2-метилсерина (3), в котором отсутствует атом водорода у α-углеродного атома серина. Это соединение устойчиво в щелочной среде и ведет себя аналогично тирозиновому и оксипролиновому аналогам [13, 14].

Обязательным условием β-элиминирования нуклеотида в нуклеотидил(5'→O)-N-ациламинокислотах (пептидах) является наличие блокированной аминогруппы оксиаминокислот. Если она свободна, в щелочной среде имеет место O→N-миграция нуклеотидного остатка [10].

Исследование свойств модельных нуклеотидопептидов фосфодиэфирного типа позволяет утверждать, что если в нуклеотид- или НК-белковых структурах по соседству с фосфодиэфирной связью окажутся функциональные группы (COOH, NH₂ и др.), то будут иметь место превращения, которые могут затруднять идентификацию типа связи.

2.2. Гидролитическая устойчивость нуклеотидил(олигонуклеотидил)-(P→N)аминокислот (пептидов) и их сложных эфиров

Ранее было показано (см. обзор [8]), что нуклеотидил(P→N)аминокислоты устойчивы в нейтральной и щелочной среде и расщепляются в кислой среде. Это общее свойство многих амидов фосфорной кислоты. Изотопный эффект и линейная зависимость константы скорости гидролиза нуклеотидил(5'→N)аминокислот от концентрации кислоты позволяют утверждать, что в кислой среде имеет место протонирование фосфамидного центра [21]. Предполагается, что протонируется фосфамидный атом азота и образуется готовая к уходу аминогруппа аминокислоты. Установлено [21], что реакция гидролиза фосфамидной связи в нуклеотидопептидах является бимолекулярной реакцией первого порядка.

2.2.1. Влияние природы аминокислоты и нуклеотида на гидролитическую устойчивость фосфамидной связи в сложных эфирах нуклеотидил(P→N)аминокислот

Исследование метиловых эфиров уридил(5'→N)аминокислот, отличающихся природой аминокислоты, показало, что самым лабильным является метиловый эфир уридил(5'→N^{im})-N^α-Z-гистидина (71) [23]. Даже при элюции водой из хроматограммы он полностью расщепляется до нуклеотида и симметричного ему пиррофосфата. Это говорит о том, что если нуклеотид или НК присоединены к белку с помощью такой фосфамидной

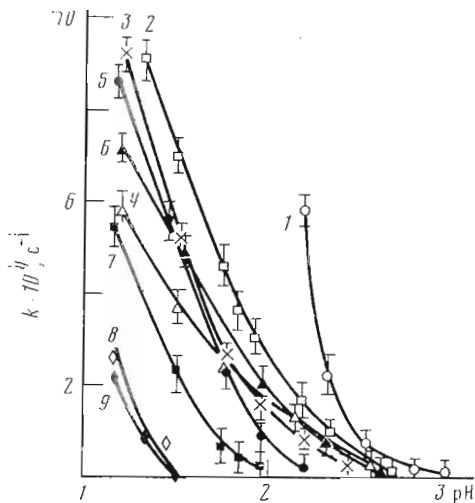


Рис. 3

Рис. 3. Гидролитическая устойчивость уридных фосфамидов метиловых эфиров глицина (1), аланина (2), валина (3), лейцина (4), фенилаланина (5), тирозина (6), гистидина (7), аргинина (8) и лизина (9) в зависимости от pH (1 ч, 37° С)

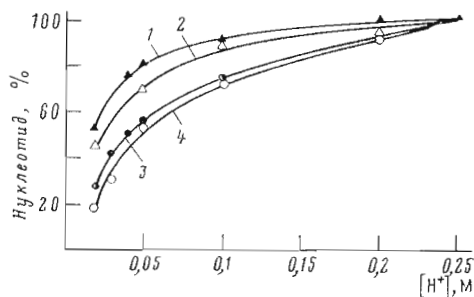


Рис. 4

Рис. 4. Гидролитическая устойчивость метиловых эфиров фенилаланиновых производных гуаниловой (1), уридной (2), адениловой (3) и цитидиловой (4) кислот при различных концентрациях HCl (1 ч, 37° С)

связи, то соединения этого типа должны быть неустойчивы. Более подробно изучены нуклеотидопептиды, в которых уридная кислота присоединена к α -аминогруппе различных аминокислот (рис. 3) [21].

Из приведенных данных следует, что имеется зависимость скорости расщепления фосфамидной связи в нуклеотидопептидах от структуры радикала аминокислот. Самым лабильным является глициновое производное уридной кислоты, среднюю группу составляет аланиновое, валиновое, лейциновое, фенилаланиновое, тирозиновое производные уридной кислоты и самыми стабильными оказались N^{α} -гистидиновое, N^{α} -лизиновоe и N^{α} -аргининовое производные. Предполагается [21], что эффективность расщепления фосфамидной связи обуславливают индукционные и стерические эффекты радикалов аминокислот. Интересно, что самыми стабильными оказались те соединения, в радикалах аминокислот которых содержатся способные протонироваться функциональные группы (имидазольное кольцо гистидина, ϵ -аминогруппа лизина и гуанидиновая группа аргинина). Возможно, что в данном случае кроме индукционного и стерического влияния радикалов аминокислот имеет место конкуренция за протоны среды, в которой участвуют вышеуказанные функциональные группы, а также электростатическое отталкивание протонов от фосфамидного центра.

В природных нуклеотид- или НК-белковых структурах в образовании связи с белком может принимать участие любой из четырех основных нуклеотидов. Исследовано влияние природы гетероциклического основания на эффективность гидролиза фосфамидной связи в метиловых эфирах нуклеотидил ($5' \rightarrow N$) фенилаланина (рис. 4) (см. обзор [8], а также работу [21]).

Из приведенных данных следует, что при $pH < 1$ (0,5–0,1 н. HCl) все изученные соединения имеют одинаковую гидролитическую устойчивость. При $pH > 1,5$ (0,05–0,005 н. HCl) наблюдаются некоторые различия. Наиболее лабильны гуаниловое и уридиловое производные. Исследовано влияние извне прибавленных нуклеозидов на эффективность расщепления фосфамидной связи [21]. Предполагается [21], что влияние гетероциклических оснований на гидролитическую устойчивость соединений в слабокислой среде проявляется, как и в случае некоторых аминокислот (Lys, Arg, His), через конкуренцию за протоны среды, в которой принимают участие фосфамидный атом азота и гетероциклические основания.

2.2.2. Влияние удлинения пептидного и олигонуклеотидного фрагментов на эффективность расщепления фосфамидной связи в нуклеотидопептидах

Ковалентные НК-белковые структуры — сложные смешанные биополимеры. Было интересно выяснить, как влияет на гидролитическую устойчивость фосфамидной связи в модельных нуклеотидопептидах удлинение пептидной и олигонуклеотидной цепей. Для этого была исследована гидролитическая устойчивость ряда модельных соединений (см. обзор [8]), а также работы [26, 42]). В табл. 2 приведены данные о влиянии длины и аминокислотного состава пептидной цепи на эффективность расщепления фосфамидной связи в сложных эфирах некоторых нуклеотидил ($5' \rightarrow N$) аминокислот (пептидов).

Из табл. 2 следует, что удлинение пептидной цепи стабилизирует фосфамидную связь. Устойчивость фосфамидной связи зависит не только от длины пептидной цепи, но и от ее аминокислотного состава. Предполагается [26, 42], что стабилизирующее влияние обуславливает стереический эффект пептидной цепи.

Исследование гидролитической устойчивости аденилил ($5' \rightarrow N^e$) лизина и аденилат-ДНК- и РНК-лигазных комплексов [23, 43], в которых адениловая кислота присоединена к белку через ϵ -аминогруппу лизина, в кислой среде показало, что белковая молекула в нуклеотид-лигазных комплексах стабилизирует фосфамидную связь по отношению к аденилил ($5' \rightarrow N^e$) лизину лишь в 1,5 раза. Это говорит о том, что удлинение пептидной цепи в нуклеотидопептидах оказывает стабилизирующее влияние лишь до определенной длины пептидной цепи. Установлено, что АМР-лигазные комплексы расщепляются и в нейтральной среде, тогда как аденилил ($5' \rightarrow N^e$) лизин в этих условиях устойчив. Возможно, что расщепление фосфамидного центра в нейтральной среде обуславливают функциональные группы активных центров ферментов.

Данные о влиянии усложнения олигонуклеотидного фрагмента на эффективность расщепления фосфамидной связи в нуклеотидопептидах [26, 42] (табл. 3) показывают, что удлинение олигонуклеотидной цепи незна-

Таблица 2

Время полупревращения сложных эфиров нуклеотидил ($5' \rightarrow N$) аминокислот (пептидов) (0,05 н. HCl, 37° C)

Соединение	$t/2$, мин	Соединение	$t/2$, мин
Urd-5'-P-Ala-OMe	25±7	Urd-5'-P-Ala-Leu-Ala-Val-OMe	92±8
Urd-5'-P-Ala ₂ -OMe	33±6	dThd-5'-P-Gly-OEt	8±0,5
Urd-5'-P-Ala ₄ -OMe	66±6	dThd-5'-P-Gly-Phe-OEt	18±1
Urd-5'-P-Ala-Leu-OMe	55±9	dThd-5'-P-Gly ₂ -Phe-OEt	22±2

Таблица 3

Влияние удлинения олигонуклеотидной цепи на гидролитическую устойчивость нуклеотидил- (олигонуклеотидил) - (P → N) аминокислот (pH 1,6; 1 ч, 37° C)

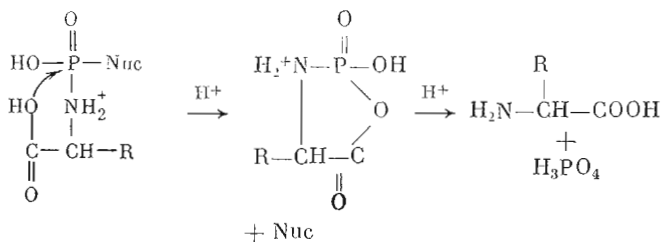
Соединение	$k \cdot 10^{-4}$, с ⁻¹
dThd-5'-P-Phe-OEt	1,41±0,03
dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-Phe-OEt	1,3±0,25
dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-Phe-OEt	1,15±0,02
dAdo-3'-P $\left\{ \begin{array}{l} \\ \text{Lys} \end{array} \right.$	0,58±0,15
dAdo-3'-P-5'-dAdo-3'-P-5'-dAdo-3'-P $\left\{ \begin{array}{l} \\ \text{Lys} \end{array} \right.$	0,51±0,2
Urd-5'-P-Phe-OEt	2,6±0,4
Cyd-5'-P-3'-Urd-5'-P-Phe-OEt	0,94±0,03

чительно стабилизирует фосфамидную связь. Исключение составляет лишь Cуд-5'-P-3'-Urd-5'-P-Phe-OEt, который устойчивее мононуклеотидного аналога более чем в 2 раза. Возможно [26, 42], что его повышенную стабильность обуславливают те же факторы, что и в случае сложных эфиров нуклеотидил (5' → N) аминокислот (см. гл. 2. 2. 1).

2.2.3. Влияние карбоксильной группы аминокислот на механизм расщепления фосфамидного центра в нуклеотидопептидах

В гл. 2. 2. 1 и 2.2.2 было показано, что сложные эфиры нуклеотидил (5' → N) аминокислот расщепляются в кислой среде до нуклеотидов и сложных эфиров аминокислот. Исследование аналогов со свободной карбоксильной группой показало [28–30, 44], что в их кислотных гидролизатах кроме нуклеотидов и аминокислот присутствуют нуклеозиды и неорганический фосфат. Таким образом, нуклеотидил (5' → N) аминокислоты в кислой среде расщепляются по двум направлениям. Первое направление — расщепление фосфамидной связи по $S_N2(P)$ -механизму, которое имело место и в случае сложноэфирных аналогов. Второе направление, приводящее к появлению нуклеозидов, аминокислот и фосфорной кислоты, обусловлено участием свободной α -карбоксильной группы аминокислот. Исследование кинетики реакции, проведение экспериментов расщепления фосфамидного центра в смеси воды и этилового спирта, а также в $H_2^{18}O$ позволило заключить [29, 30], что влияние карбоксильной группы на механизм расщепления нуклеотидил (5' → N) аминокислот проявляется через внутримолекулярный нуклеофильный катализ (схема 5).

Схема 5



Необходимо отметить, что α -карбоксильная группа глицина, пролина, оксипролина, а также удаленные карбоксильные группы β -аланина и пептидных аналогов не оказывают влияния на механизм расщепления соответствующих нуклеотидопептидов. Исключение составляют нуклеотидил (5' → N^c) лизины, в кислотных гидролизатах которых обнаружены небольшие количества нуклеозидов [27]. Все эти данные говорят о том, что расположение карбоксильной группы относительно фосфамидного центра в нуклеотидил (P → N) пептидах оказывает существенное влияние на внутримолекулярный катализ с ее участием.

Установлено [29, 30], что эффективность внутримолекулярного нуклеофильного катализа с участием карбоксильной группы аминокислот зависит от природы аминокислот (табл. 4) и гетероциклических оснований (табл. 5).

Возможно, что влияние радикалов аминокислот на эффективность внутримолекулярного нуклеофильного катализа проявляется через эффект Торпа — Ингольда.

Обнаружено [27], что эффективность внутримолекулярного катализа с участием карбоксильной группы аминокислот сильно зависит от расположения аминокислотного остатка. Согласно работе [27], дезокситимидил (5' → N) фенилаланин в кислой среде расщепляется в 2 раза легче, чем 3'-аналог. Исследование конформации 3'- и 5'-фенилаланиновых производных дезокситимидиловой кислоты с помощью ЯМР-спектроскопии выявило [23], что в случае dThd-5'-P-Phe имеет место взаимодействие между плоскостями тимина и радикала фенилаланина. Возможно, это обуславливает удобное расположение карбоксильной группы у атома фосфора.

Расщепление уридил(5' → N)аминокислот в 0,05 н. HCl (1 ч, 37° С)

Соединение	Выход продукта расщепления, %		Соединение	Выход продукта расщепления, %	
	UMP	Уридин		UMP	Уридин
Urd-5'-P-Ala	73	27	Urd-5'-P-Phe	32	62
Urd-5'-P-Val	32	68	Urd-5'-P-Tyr	42	58
Urd-5'-P-Leu	58	42	Urd-5'-P-His	36	61

Таблица 5

Суммарное расщепление фосфамидной и фосфоэфирной связей в нуклеотид(5' → N)фенилаланинах при различных концентрациях HCl (1 ч, 37° С)

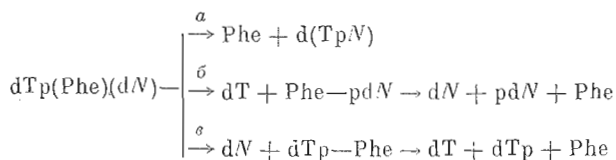
Соединение	Расщепление (%) при концентрации HCl (н.)						
	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08
Urd-5'-P-Phe	11	67	78	84	92	93	100
Guo-5'-P-Phe	30	74	80	87	92	94	95
Ado-5'-P-Phe	34	70	82	92	92	98	94
Cyd-5'-P-Phe	—	27	50	65	78	78	90

2.2.4. Влияние гидроксильной группы моносахарида, основания и оксааминокислот на механизм расщепления нуклеотид(5' → N)аминокислот (пептидов)

Исследование гидролитической устойчивости фенилаланиновых фосфамидов уридин-5'-монофосфата, ксилоуридин-5'-монофосфата и арабиноуридин-5'-монофосфата показало [45], что 3'-гидроксильная группа ксилозы внутримолекулярно влияет на механизм расщепления фосфамидного центра в кислой среде. В реакционной смеси кроме метилового эфира фенилаланина и ксилоуридин-5'-монофосфата обнаружен и нуклеозид-3',5'-циклофосфат. Аналогичное внутримолекулярное влияние в кислой среде оказывает и 2'-гидроксильная группа рибозы в метиловом эфире 2'-тетрагидропиранцитидил(3' → N)фенилаланина [46]. В слабокислой среде удаляется защитная группа в 2'-положении и образуется цитидин-2',3'-циклофосфат с одновременным уходом фенилаланина. Интересно, что аналогичные продукты расщепления обнаружены при инкубации 2',5'-О-ди-ацетилуридил(3' → N)фенилаланина (метилового эфира) в щелочной среде [47]. В примененных условиях гидролиза (рН 10; 37° С) защитные апетильные группы удаляются медленно, что позволило проследить кинетику накопления в реакционной смеси уридин-2',3'-циклофосфата и аминокислоты. Такой путь расщепления обуславливает расположенная близко к фосфамидному центру 2'-гидроксильная группа рибозы. 5'-Ацетил-2'-тетрагидропиранцитидил(3' → N)фенилаланин, в котором 2'-гидроксильная группа блокирована щелочустойчивой группой, а также дезокситимидил(3' → N)фенилаланин, в котором 2'-гидроксильная группа отсутствует, в щелочной среде устойчивы [46].

В МГУ был осуществлен синтез и исследованы некоторые свойства метилового эфира 5-оксиуридил(5' → N)фенилаланина [48]. Оказалось, что мягкая обработка его щелочью приводит к образованию 5-оксиуридин-5,5'-циклофосфата и фенилаланина. По-видимому, участие гидроксильной группы основания моделирует первую стадию внутримолекулярного катализа и обуславливает расщепление фосфамидной связи в щелочной среде. Механизм данной реакции детально не изучен.

Более подробно исследовано влияние гидроксильной группы β-оксааминокислот на механизм расщепления фосфамидного центра в нуклеотидопептидах [49—51]. Если сложные эфиры нуклеотид(5' → N)аминокислот (пептидов), не содержащих в аминокислотном фрагменте функциональных групп, в кислой среде гидролизировались только по фосфамидной связи,



ных связей (пути *b* и *c*). В результате этих реакций образуются дезоксирибонуклеозиды и дезоксирибонуклеотидил ($5' \rightarrow N$)- и ($3' \rightarrow N$) фенилаланины, которые далее расщепляются до нуклеозидов и нуклеотидов. Расщепление $\text{dThd-3'-P(-Phe)(-5'-Nuc)}$ по направлениям *b* и *c* обуславливает свободная карбоксильная группа фенилаланина. Предполагается [35, 52], что имеет место внутримолекулярный катализ, как это было доказано в случае мононуклеотидил ($P \rightarrow N$) аминокислот [29, 30].

Установлено [35], что внутримолекулярное влияние оказывает и гидроксильная группа серина $\text{dThd-3'-P(-Ser-OEt)(-5'-dNuc)}$ ($\text{Nuc} = \text{dThd, dCyd}$). Оказалось, что в кислой среде имеет место $N \rightarrow O$ -миграция олигонуклеотидного остатка и из исходного фосфамида образуется $\text{dThd-3'-P(Ser-OEt)(-5'-dNuc)}$. Гидроксильная группа серина обуславливает также расщепление фосфамидного центра в щелочной среде. В щелочных гидролизатах $\text{dThd-3'-P(-Ser-OEt)(-5'-dNuc)}$ обнаружены $\text{dThd-3'-P(-Ser)(-5'-dNuc)}$, dThd-3'-P-5'-dNuc , $\text{dThd, dNuc-5'-P-Ser}$, аммиак и пировиноградная кислота. Основным процессом, протекающим в щелочной среде, является расщепление фосфамидной связи. Это очень редкий случай в химии фосфамидов. Предполагается [35], что в щелочной среде имеет место β -элиминирование. Лабильность фосфамидной связи в щелочной среде обуславливает и $2'$ -гидроксильная группа рибозы [54]. Инкубация $\text{dUrd-3'-P(-Phe-OMe)(-5'-dUrd)}$ в щелочной среде приводит к олигонуклеотиду с ($2' \rightarrow 5'$)- и ($3' \rightarrow 5'$)-межнуклеотидными связями и фенилаланину.

Полученные данные по гидролитической устойчивости нуклеотидопептидов фосфамидного типа свидетельствуют о том, что поведение такой связи в природных нуклеотид- или НК-белковых комплексах будет зависеть от природы N -концевой аминокислоты, нуклеотида, длины и состава пептидной и олигонуклеотидной части молекулы, расположения белковой части комплекса (концевой или межнуклеотидный фосфат НК) и функционального окружения фосфамидного центра.

Исследование гидролитической устойчивости модельных нуклеотидопептидов всех типов позволяет сделать вывод, что при решении структурных вопросов смешанных биополимеров нельзя применять только химическую их обработку и тем более нельзя судить о типе связи между компонентами только по продуктам химического расщепления. Из проведенных исследований вытекает, что необходимо мягкими ферментативными методами расщепить полимерные части комплекса, выделить нуклеотидопептидный узел и уже в нем устанавливать тип связи. На этом уровне чрезвычайно полезными могут быть данные о реакционной способности модельных нуклеотидопептидов. Особенно важную роль могут сыграть методы специфического расщепления конкретных нуклеотидопептидных связей.

3. Расщепление нуклеотидопептидов ферментами

Расщепление природных нуклеотид- и НК-белковых комплексов может быть проведено с помощью нуклеаз и протеиназ. Встает вопрос: как будут влиять пептидный фрагмент на действие нуклеаз и нуклеотидный фрагмент на действие протеиназ. Недавно [26, 42] была исследована гидролитическая активность проназы В, карбоксипептидазы А, панкреатической рибонуклеазы и фосфодиэстераз по отношению к некоторым нуклеотидил-(олигонуклеотидил)-($P \rightarrow N$) пептидам и их сложным эфирам. Установлено, что присоединение аминокислот к $3'$ - или $5'$ -концевым остаткам фос-

форной кислоты олигонуклеотидов не влияет на эффективность действия нуклеаз и фосфодиэстераз. Присоединение нуклеотида к аминогруппе N-концевой аминокислоты пептида не влияет на эффективность действия проназы В, но затрудняет действие карбоксипептидазы. Полученные данные позволяют утверждать, что обработка ковалентных нуклеотид- и НК-белковых комплексов нуклеазами и протеиназами является мягким методом расщепления полимерных фрагментов комплекса и используется для выделения нуклеотидопептидного узла.

4. Специфические методы расщепления нуклеотидопептидов

При установлении типа связи в нуклеотидопептидах, выделенных после обработки нуклеотид- или НК-белковых комплексов ферментами, большую роль могут сыграть методы специфического расщепления конкретных связей. Для расщепления фосфамидной связи ранее предложен гидроксилламин (рН 4,5–5) (см. обзор [8]). Недавно получены данные о влиянии структуры нуклеотидного и пептидного фрагментов на эффективность данной реакции и данные об ее специфичности (табл. 6 и 7) [23].

Приведенные данные свидетельствуют, что из всех трех исследованных гидроксилламинов наиболее эффективен N-метилгидроксилламин. Очевидно также, что удлинение пептидной и олигонуклеотидной цепей в нуклеотидопептидах стабилизирует фосфамидную связь. Необходимо отметить, что гидроксилламин расщепляет и фосфамидную связь, в образовании которой принимает участие межнуклеотидный фосфат, и не расщеп-

Таблица 6

Расщепление нуклеотидопептидов гидроксилламинами
рН 5, 10 мин, 37° С

Соединение	Расщепление, %					
	[NH ₂ OH], М			[СН ₃ NHOH], М		[NH ₂ OСН ₃], М
	1	2	4	1	4	1
Urd-5'-P-Ser-Gly-OEt	44	46	50	54	68	13
Urd-5'-P-Thr-Gly-OEt	37	41	47	60	69	15
Urd-5'-P-Gly-Ser-OEt	28	35	50	35	67	4
Urd-5'-P-Thr-Gly-Phe-OMe	20	—	—	—	52	0
Urd-5'-P-Gly-Ala-OMe	34	40	52	48	74	20
Z-Ser(-P-5'-Urd)-Gly-OEt	0	0	0	0	0	0
Z-Thr(-P-5'-Urd)-Gly-OEt	0	0	0	0	0	0

Таблица 7

Время полупревращения олигонуклеотидиламинокислот под действием гидроксилламина
2 М NH₂OH, рН 4,75; 37° С

Соединение	τ/2, мин
dThd-5'-P-Phe-OEt	135±8
dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-3'-dThd-5'-P-Phe-OEt	184±10
dAdo-3'-P Lys	181±12
dAdo-3'-P-5'-dAdo-3'-P-5'-dAdo-3'-P Lys	256±21
dThd-3'-P(-Phe-OMe) (-5'-dThd)	85±10
dThd-3'-P(-Ser-OMe) (-5'-dThd)	90±14
dThd-3'-P(Ser-OMe) (-5'-dThd)	Не расщепляется

ляет фосфодиэфирной связи в нуклеотидил($P \rightarrow O$)аминокислотах. Показано [8, 9, 13, 14, 23], что специфическими агентами для расщепления фосфоэфирных связей в синтетических нуклеотидопептидах являются фосфодиэстеразы. Фосфодиэстераза змеиного яда расщепляет фосфодиэфирную связь в нуклеотидил($5' \rightarrow O$)аминокислотах, а фосфодиэстераза селезенки расщепляет фосфодиэфирную связь в нуклеотидил($3' \rightarrow O$)аминокислотах. Таким образом, расщепление нуклеотидопептидов со специфическими фосфодиэстеразами говорит не только о типе связи между компонентами, но и о том, к $3'$ - или $5'$ -концу НК присоединен белок. Изучение поведения нуклеотидил($P \rightarrow O$)аминокислот (пептидов) по отношению к химическим агентам позволяет определить далее природу оксиминокислоты, к которой присоединен нуклеотид. Если нуклеотидил($P \rightarrow O$)пептид стабилен в 2 н. NaOH (1 ч, $37^\circ C$), то это будет говорить о том, что нуклеотид присоединен через гидроксильную группу тирозина или оксипролина. Лабильность нуклеотидопептида в щелочной среде свидетельствует о том, что в образовании фосфодиэфирной связи принимает участие оксигруппа серина или треонина. Обнаружение в щелочных гидролизатах пировиноградной кислоты позволяет заключить, что N-концевой аминокислотой является серин.

5. Определение типа связи в аденилат-РНК-лигазном комплексе

Для апробации применимости всех рекомендаций о путях установления природы межбиополимерной связи в природных нуклеотид- и НК-белковых структурах и использования данных о свойствах синтетических нуклеотидопептидов была установлена природа нуклеотидопептидной связи в интермедиате РНК-лигазной реакции [55]. На первой стадии РНК-лигаза реагирует с АТР и образуется аденилат-РНК-лигазный комплекс с ковалентной связью между компонентами (см. обзоры [56, 57]). Были установлены оптимальные условия образования комплекса [43, 56]. Меченый [^{14}C] АМР-лигазный комплекс был выделен с помощью гель-фильтрации, расщеплен протеиназой К и выделен аденилилпептид. Он был устойчив по отношению к фосфодиэстеразе змеиного яда, но хорошо расщеплялся гидроксиламином. Все эти результаты говорили о том, что адениловая кислота присоединяется к РНК-лигазе с помощью фосфамидной связи. Применение метода модификации РНК-лигазы и ее аденилатного комплекса с помощью 2,4-пентандиона позволило предположить [55], что адениловая кислота присоединяется к белку через ϵ -аминогруппу лизина.

6. Применение синтетических нуклеотидопептидов

Некоторые синтетические нуклеотидил($P \rightarrow N$)аминокислоты были применены для моделирования ферментативных реакций. Аденилил($5' \rightarrow N^e$)лизин был использован для моделирования трех стадий ДНК-лигазной реакции [58], а метиловый эфир уридилил($5' \rightarrow N^{im}$)- N^a -Z-гистидина — для моделирования двух стадий галактозо-1-фосфат-уридилилтрансферазной реакции [23]. Полученные результаты позволяют утверждать, что модельные нуклеотидопептиды могут помочь установить природу связи в ковалентных нуклеотид-ферментных комплексах.

Некоторые нуклеотидил- и олигонуклеотидил($P \rightarrow N$)лизины были иммобилизованы на активированной бромцианом сефарозе [59]. Особенно интересна иммобилизация олигонуклеотидов через межнуклеотидный фосфат. Такой тип иммобилизации имеет то преимущество по сравнению с другими методами, что гетероциклические основания и гидроксильные группы моносахарида остаются свободными и могут без стерической затрудненности взаимодействовать с определенными участками белков или НК.

Обнаружено [60], что некоторые нуклеотидил($5' \rightarrow N$)аминокислоты и их сложные эфиры обладают ингибиторной активностью по отношению к липоамидгидрогеназе из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. pI_{50} состав-

ляет от 2,5 до 3,5 в зависимости от структуры ингибитора. Создается впечатление, что ингибиторные свойства нуклеотидил (P→N) аминокислот в значительной степени зависят от природы гетероциклического основания и состояния карбоксильной группы аминокислоты. Однако четкая корреляция между структурой и ингибиторной функцией исследованных соединений не установлена. Более подробно исследованы Urd-5'-P-Phe-OMe и Urd-5'-P-β Ala, первый из которых имеет блокированную, а второй — свободную карбоксильные группы. Подробное исследование кинетики ингибирования, его зависимости от концентрации ингибиторов, субстратов, активатора липоамиддегидрогеназой реакции NAD⁺ позволило сделать вывод, что ингибиторное действие Urd-5'-P-Phe-OMe проявляется на уровне формирования комплекса между липоамиддегидрогеназой и NAD⁺, а Urd-5'-P-β Ala — на уровне взаимодействия фермента с субстратом (липоевой кислотой). Интересно, что эти соединения совсем неэффективны по отношению к глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе и алкогольдегидрогеназе. Это позволяет считать, что данные ингибиторы специфичны для липоамиддегидрогеназы.

Недавно было показано [61—65], что аминокислотные производные моно- и олигонуклеотидов чрезвычайно удобные модельные системы для выяснения элементарных процессов нуклеиново-белкового взаимодействия. Получены характеристики взаимодействий всех возможных пар ароматических аминокислот и гетероциклических оснований, являющихся составной частью постепенно усложняющихся структур: мононуклеотидов, олигонуклеотидов, спиралей нуклеиновых кислот. Эти данные успешно использованы для установления локализации остатков тирозина и фенилаланина белка, кодируемого геном 5 бактериофага f1, в его комплексе с олигонуклеотидами [66—68].

Заключение

В обзоре приведены данные о синтезе, реакционной способности и применении нуклеотидопептидов с фосфамидной и фосфодиэфирной связями между компонентами. Исследование их гидролитической устойчивости привело к заключению, что эффективность и механизм расщепления синтетических нуклеотидопептидов зависит от природы аминокислоты и нуклеотида, длины пептидной и олигонуклеотидной цепей, расположения аминокислотного остатка (3', 5' или межнуклеотидный фосфат) и функционального окружения. Представленные данные позволяют утверждать, что нельзя говорить о типе межбиополимерной связи в природных ковалентных нуклеотид- и НК-белковых комплексах только на основании продуктов их химического расщепления, как, к сожалению, еще часто делается. Подробное исследование синтетических нуклеотидопептидов позволило определить стратегию установления типа связи в ковалентных нуклеотид- и НК-белковых комплексах:

1) необходимо ферментативными методами расщепить полимерные части комплекса и выделить нуклеотидопептидный узел;

2) выделенные нуклеотидопептиды можно обработать химическими агентами и сравнить полученные результаты с результатами, описанными для конкретных структур. На данном этапе работы огромную услугу могут оказать методы специфического расщепления нуклеотидопептидов;

3) последний этап работы — установление типа нуклеотида и аминокислоты, непосредственно связанных между собой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юодка Б. А. Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1445—1465.
2. Wimmer E. Cell, 1982, v. 28, № 2, p. 199—201.
3. Champoux J. J. Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 449—479.
4. Wang J. C., Liu L. F. In: Molecular Genetics, Pt. 3. Chromosome structure / Ed. Taylor J. H. Acad Press, Inc., 1979, p. 65—88.
5. Cozzarelli N. R. Cell, 1980, v. 22, № 2, p. 327—328.
6. Gellert M. Ann. Rev. Biochem., 1981, v. 50, p. 879—910.

7. Юодка Б. А., Савельев Е. П., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Биохимия, 1968, т. 33, № 5, с. 907—915.
8. *Shabarova Z. A.* In: Progress in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol. / Eds Davidson J. N., Cohn W. E. N. Y.: Acad. Press, 1970, v. 10, p. 145—182.
9. *Berkowitz W. E., Bendich A.* Biochemistry, 1965, v. 4, № 10, p. 1979—1983.
10. Савельев Е. П., Юодка Б. А., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Вестн. МГУ. Химия, 1967, № 5, с. 128—136.
11. Юодка Б. А., Саснаускене С. И. Ж. общ. химии, 1971, т. 41, № 9, с. 2108.
12. Юодка Б. А., Саснаускене С. И. Химия природн. соедин., 1974, № 2, с. 216—220.
13. Юодка Б. А., Кирвялене В. А., Повиленис П. И. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 3, с. 326—338.
14. *Juodka B., Kirveliene V., Povilionis P.* Nucleosides and Nucleotides, 1982, v. 1, № 2, p. 114—125.
15. *Michelson A. M. J.* Chem. Soc., 1958, p. 1957—1963.
16. Шабарова З. А., Сагарова Л. Г., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1958, т. 123, с. 864—867.
17. Земин С. В., Тяглов Б. В., Сергеев Г. В., Шабарова З. А., Громова Е. С. Докл. АН СССР, 1972, т. 207, № 4, с. 861—864.
18. Юодка Б. А., Саснаускене С. И., Лиоранчайте Л. Э. Ж. орг. химии, 1973, т. 9, № 8, с. 1630—1634.
19. Юодка Б. А. Ж. общ. химии, 1974, т. 44, № 11, с. 2592—2593.
20. Юодка Б., Лиоранчайте Л., Янушоните Л., Саснаускене С. Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 11, с. 1513—1519.
21. *Juodka B., Sasnauskiene S. J.* Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides, 1981, v. 8, № 1, p. 19—39.
22. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886—893.
23. Юодка Б. А. Ковалентные взаимодействия белков и нуклеиновых кислот. Синтетические и природные нуклеотидоцептиды: Автореф. дис. д-ра хим. наук. Вильнюс, ВГУ, 1981, с. 158.
24. Юодка Б. А., Обручников И. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Химия природн. соедин., 1969, № 5, с. 323.
25. Юодка Б., Гульбинайте В. Научн. тр. вузов ЛитССР. Химия и хим. технология, 1975, т. 17, с. 175—178.
26. *Juodka B., Kirveliene V., Liorančaitė L. J.* Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides, 1979, v. 6, № 4, p. 333—357.
27. Юодка Б. А., Лиоранчайте Л. Э., Бальгелас В. Р. Химия природн. соедин., 1982, № 6, с. 740—746.
28. Юодка Б., Саснаускене С. Научн. тр. вузов ЛитССР. Химия и хим. технология, 1975, т. 17, с. 168—175.
29. Юодка Б. А., Саснаускене С. И., Казлаускайте С. А., Кирвялене В. А., Шабарова З. А. Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 240—247.
30. *Juodka B., Sasnauskiene S., Shabarova Z. J.* Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides, 1981, v. 8, № 6, p. 519—536.
31. Смирнов В. Д., Ивановская М. Г., Ильина Е. В., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1972, т. 206, № 5, с. 1133—1136.
32. Смирнов В. Д., Грозовский С. Л., Хайфа-Аль-Азма, Шабарова З. А. Вестн. МГУ. Химия, 1974, № 5, с. 620.
33. Громова Е. С., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1969, т. 186, № 2, с. 333—335.
34. Соколова Н. И., Гурова Г. И., Гатинская Л. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Молекулярн. биология, 1969, т. 3, № 6, с. 837—845.
35. *Liorančaitė L. E., Juodka B. A.* Nucl. Acids. Res., Symp. Ser., 1981, № 9, p. 215—218.
36. *Juodka B. A., Liorančaitė L. E., Sasnauskiene S. J.* In: International symposium on Physical Organic Chemistry. Chem. Inst. of Canada, 1979, p. 18.
37. *Werner D., Krauth W., Hershey H. V.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 608, № 2, p. 243—258.
38. *Capasius J., Krauth W., Werner D.* FEBS Lett., 1980, v. 110, № 2, p. 184—186.
39. *Werner D., Petzelt C. J.* Mol. Biol., 1981, v. 150, № 2, p. 297—302.
40. *Werner D., Hadjiolov D., Neur B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 100, № 3, p. 1047—1054.
41. *Welsh R., Vyska K.* Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 655, № 3, p. 291—306.
42. Юодка Б. А., Лиоранчайте Л. Э., Кирвялене В. А., Ференцайте Р. С. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1623—1632.
43. Юодка Б. А., Снечкуте М. А., Янушоните Л. М., Маркуцкас А. Я. Биохимия, 1979, т. 44, № 4, с. 599—604.
44. Савельев Е. П., Преображенская Н. Н., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Химия природн. соедин., 1967, № 2, с. 121—126.
45. Преображенская Н. Н., Шинский Н. Г., Ивановская М. Г., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1970, т. 192, № 5, с. 1060—1063.
46. Шабарова З. А., Прокофьев М. А. В сб.: Современные проблемы органической химии. Изд. МГУ, 1970, с. 345—390.
47. Воробьев О. Е., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Вестн. МГУ. Химия, 1964, № 6, с. 66—71.
48. Шинский Н. Г., Преображенская Н. Н., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Ж. общ. химии, 1970, т. 40, № 5, с. 1122—1132.

49. Юодка Б. А., Обручников И. В., Недбай В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. *Биохимия*, 1969, т. 34, № 3, с. 647—654.
50. Савельев Е. П., Громова Е. С., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. *Изв. АН СССР. Химия*, 1970, № 8, с. 1817—1822.
51. Юодка Б. А., Мешкенайте В. И. *Научн. тр. вузов ЛитССР. Химия и хим. технология*, 1979, т. 21, с. 79—84.
52. Соколова Н. И., Гурова Г. И., Гатинская Л. Г.; Шабарова З. А., Прокофьев М. А. *Молекулярн. биология*, 1969, т. 3, № 6, с. 837—845.
53. Юодка В. А., *Smrt J. Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1974, v. 39, № 4, p. 963—968.
54. Воробьев О. Е., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. *Докл. АН СССР*, 1970, т. 190, № 4, с. 842—845.
55. Юодка Б. А., Маркуцкас А. Я., Снечкуте М. А., Жилинскене В. Ю., Дрыгин Ю. Ф. *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 11, с. 1733—1734.
56. Вельяминова А. Г., Ямковой В. И. *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 10, с. 1445—1466.
57. Uhlenbeck O. S., Gumpert R. I. *The enzymes*, 3rd Ed. New York—London: Acad. Press, 1982, v. 15, p. 31—58.
58. Юодка Б. А., Саснаускаене С. И., Мешкенайте В. И. *Ж. общ. химии*, 1976, т. 46, № 3, с. 585—590.
59. Юодка Б., Лиоранчайте Л., Леймонгайте Р., Малинаускас А., Кулис Ю., Соколова Н. И., Шабарова З. А. *Химия природн. соедин.*, 1977, № 3, с. 435—436.
60. Gletzha A., Juodka V. *Nucleosides and Nucleotides*, 1983, v. 2, № 1, p. 33—40.
61. Gromova E. S., Tyaglov B. V., Shabarova Z. A. *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 240, № 1, p. 1—11.
62. Smirnov V. D., Gromova E. S., Razjivin A. P., Shabarova Z. A. *FEBS Lett.*, 1975, v. 51, № 1, p. 211—214.
63. Тяглов Б. В., Громова Е. С., Зенин С. В., Сергеев Г. Б., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. *Молекулярн. биология*, 1975, т. 9, № 5, с. 652—666.
64. Тяглов Б. В., Зенин С. В., Громова Е. С., Сергеев Г. Б., Шабарова З. А. *Молекулярн. биология*, 1976, т. 10, № 2, с. 347—359.
65. Долинная Н. Г., Громова Е. С., Разживин А. П., Шабарова З. А. *Докл. АН СССР*, 1978, т. 239, с. 603—606.
66. Смирнов В. Д., Громова Е. С., Нефедьева Н. Н., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. *Молекулярн. биология*, 1978, т. 12, № 2, с. 429—442.
67. Вейко Н. Н., Громова Е. С., Шабарова З. А. *Молекулярн. биология*, 1979, т. 13, № 5, с. 1136—1146.
68. Вейко Н. Н., Громова Е. С., Сигалов А. Б., Шабарова З. А. *Молекулярн. биология*, 1981, т. 15, № 6, с. 1385—1396.

Поступила в редакцию
9.III.1983
После доработки
26.VII.1983

**SYNTHESIS, PROPERTIES AND APPLICATION
OF NUCLEOTIDE-PEPTIDES OF THE PHOSPHOESTER
AND PHOSPHOAMIDE TYPES**

JUODKA B. A.

V. Kapsukas State University, Vilnius

The review deals with the methods of synthesis and reactivity of model nucleotide-peptides with the phosphoester and phosphoamide bonds between the components. Methods of specific cleavage of the phosphoamide and phosphoester bonds in nucleotide-peptides, their behaviour with respect to nucleases and proteinases, as well as their application in molecular biology are discussed.