



УДК 577.217.33 : 577.113.6

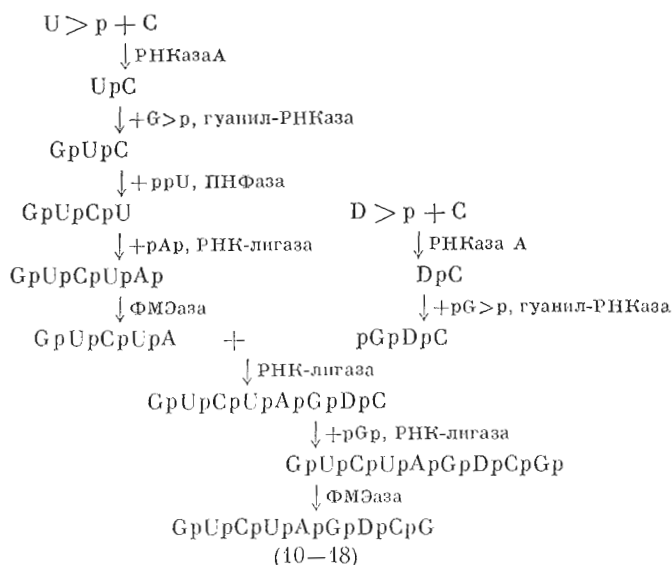
СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ *D*-ВЕТВИ ДРОЖЖЕВОЙ ВАЛИНОВОЙ тРНК_i И ИХ АНАЛОГОВ

**Женодарова С. М., Елягина В. П., Седельникова Э. А.,
Смолянинова О. А.**

*Институт биологической физики Академии наук СССР,
г. Пущино Московской обл.*

Синтезирован нонануклеотид GpUpCpUpApGpDpCpGr, соответствующий фрагменту 10–18 *D*-ветви (с заменой остатка псевдоуридина-13 уридином) дрожжевой валиновой тРНК_i. Изучено поведение производных дигидроуридина как субстратов рибонуклеаз различной специфичности и РНК-лигазы.

Продолжая исследования ферментативного синтеза олигорибонуклеотидов, соответствующих фрагментам дрожжевой валиновой тРНК_i или их аналогам [1], мы предлагаем схему синтеза фрагмента *D*-ветви этой тРНК, в которой на разных стадиях используются такие ферменты нуклеинового обмена, как рибонуклеазы различной специфичности, полинуклеотидфосфорилазы, фосфомоноэстераза, полинуклеотидкиназа и РНК-лигаза (схема).



Характерная особенность этого фрагмента — наличие в его составе остатков дигидроуридина. Неустойчивость дигидроурацильного цикла, превращающегося в щелочной среде в β-уреидопропионовую кислоту, осложняет синтез олигонуклеотидов, содержащих дигидроуридин, и, по-видимому, является одной из главных причин, сдерживающих его развитие. С тех пор, как появились первые работы по химическому синтезу динуклеотидов, включающих дигидроуридин [2, 3], прошло более 10 лет, однако ситуация практически не изменилась. Недавно было опубликова-

Сокращения: ПНФаза — полинуклеотидфосфорилаза; остальные сокращения соответствуют общепринятым.

УрС в тех же условиях, и значительно медленнее, чем с панкреатической рибонуклеазой. Поэтому для препаративного получения ДрС разумнее использовать панкреатическую рибонуклеазу.

При более детальном изучении поведения дигидроуридин-2',3'-циклофосфата в реакциях с участием панкреатической рибонуклеазы мы нашли, что выход ДрС сильно колеблется в различных опытах и может

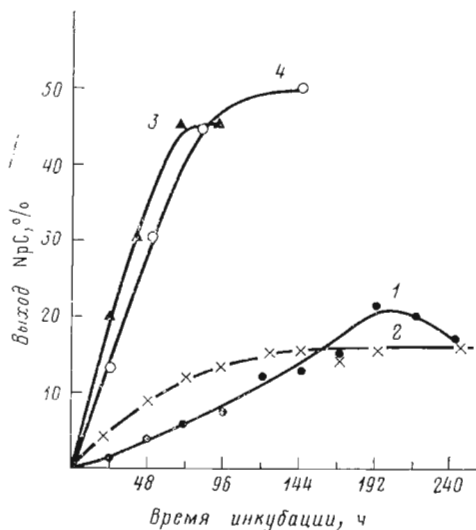


Рис. 2. Синтез ДрС (1, 3) и УрС (2, 4), катализируемый рибонуклеазами Рb₂ при 0°С (1, 2) и панкреатической при -18°С (3, 4)

быть значительно выше приводимого нами ранее [7]. Мы полагаем, что эти колебания скорее всего связаны с различной чистотой D>р, получаемого из неодинаковых по составу коммерческих образцов дигидроуридиловой кислоты, вероятно, разлагающейся при хранении с разрушением гетероцикла. Действительно, если нанести на бумагу различные препараты дигидроуридиловой кислоты и обработать их *n*-диметиламинобензальдегидом [8], то желтое окрашивание различной степени интенсивности развивается в месте локализации дигидроуридиловой кислоты без предварительной обработки ее щелочью. Из-за нестабильности дигидроурацильного кольца пока не удалось найти условия для разделения дигидроуридиловой кислоты и рибозилфосфата β-уреидопропионовой

кислоты. Поэтому выход ДрС в реакции с участием панкреатической рибонуклеазы может служить косвенным критерием чистоты препарата D>р. Принимая во внимание вышесказанное и предварительные результаты [7], мы провели синтез ДрС из одного и того же препарата D>р, варьируя начальную концентрацию цитидина и температуру (табл. 1). С повышением концентрации цитидина выход ДрС растет, при проведении синтеза в замороженном состоянии выход продукта достигает 47%. Исследование зависимости выхода ДрС от времени (рис. 2, 3) показало, что при -18°С «равновесная» концентрация ДрС, соответствующая выходу 47% (для данного препарата D>р), в реакционной смеси устанавливается примерно через 3 сут. Поэтому ДрС в препаративном масштабе получали при 8–10-кратном избытке цитидина, оставляя смесь субстратов и фермента в замороженном состоянии на 64–72 ч. При выделении ДрС из реакционной смеси следует помнить о нестабильности дигидроурацильного кольца и проводить все операции при нейтральном значении pH.

Тринуклеозиддифосфаты, содержащие дигидроуридин, были синтезированы ранее в присутствии рибонуклеазы T₁ [2, 6], но выходы GrDpU, GrUpD и GrDpD составляли 1–2% [2], а выход GrDpC ~5% [7]. В настоящей работе для синтеза тринуклеозиддифосфата GrDpC, соответствующего фрагменту 15–17 в структуре tPНК^{Val}₁, и его аналога GrUpC (фрагмент 10–12) были использованы гуанилспецифичные рибонуклеазы *Aspergillus clavatus* (C₂) и *Bacillus intermedius* (Bi), как пассивные, так и ковалентно связанные с полимерными подложками (табл. 2). Во всех случаях удалось получить значительно более высокие выходы тринуклеотидов. Наиболее эффективным оказался препарат рибонуклеазы Bi, связанной с СМ-целлюлозой [9].

Таким образом, рибонуклеазы различной специфичности (панкреатическая, C₂, Bi) являются достаточно эффективными катализаторами для получения ди- и тринуклеотидных блоков, включающих дигидроуридин.

Таблица 1

Синтез ДрС, катализируемый панкреатической рибонуклеазой
 $[D > p] = 0,08 \text{ M}$; $[PНКаза] = 200 \text{ мкг/мл}$

$\frac{[C]}{[D > p]}$	Температура, °C	Время, ч	Выход ДрС, %
3	0	18	16
8	0	18	29
8	-18	64	47

Таблица 2

Синтез GrUpC, GrDpC и pGrDpC, катализируемый гуанилсфифичными рибонуклеазами

Донор	Концентрация донора, M	[Акцептор]/[донор]	Фермент *	[E]	Время, ч	Выход, %
GrUpC	0,02	5	C ₂	6 ед. акт./мл	5	20
	0,1	8	Sil-C ₂	75 мг/мл	22	34
	0,08	10	CM-Bi	7,5 »	24	53
	0,02	10	CM-T ₁	10 »	22	25
GrDpC	0,04	5	C ₂	6 ед. акт./мл	18	14
	0,1	7	CM-Bi	10 мг/мл	24	30
pGrDpC	0,02	5	C ₂	6 ед. акт./мл	9	12
	0,1	8	CM-Bi	10 мг/мл	24	26

* C₂ — гуанилрибонуклеаза *Asp. clavatus*; единица активности соответствует количеству фермента, способному расщепить 1 мкмоль G>p за 30 мин при 37° C и pH 7,5. Sil-C₂—C₂, ковалентно связанная с неорганическим сорбентом типа силихром, CM-Bi, CM-T₁ — гуанилрибонуклеазы *Vac. intermedius* и T₁, ковалентно связанные с CM-целлюлозой соответственно.

Таблица 3

Синтез фрагментов 10–14, 15–18, 10–17, 10–18 и их аналогов в присутствии РНК-лигазы
Начальная концентрация донора фосфата ~1 mM

Акцептор фосфата	Донор фосфата	$\frac{\text{Акцептор}}{\text{Донор}}$	РНК-лигаза, ед. акт./мл	Выход		Возврат акцептора, %
				мкмоль	%	
GrUpC	pGr	$\frac{1}{2,5}$	1000	0,52	30	25
GrDpC	pGr	$\frac{1}{3}$	1000	0,01	10	64
GrDpC	pGr	$\frac{1}{3}$	3000	0,07	15	57
GrUpCpU	pAr	$\frac{1}{3}$	500	2,30	59	30
GrUpCpUpA	pGrDpC	$\frac{2}{1}$	500	0,30	25	60
GrUpCpUpArGrDpC	pGr	$\frac{1}{5}$	500	0,02	10	64

Чтобы проверить влияние дигидроуридинового остатка на эффективность межмолекулярного лигирования при участии РНК-лигазы, мы провели синтез GrDpCpGr из GrDpC и pGr, моделируя тем самым предпоследнюю стадию получения фрагмента 10–18 (схема). Тетрануклеотид GrDpCpGr был выделен с выходом ~15% (табл. 3). «Сшивка» GrUpC и pGr проходит с более высоким выходом (30%). Таким образом, дигидроуридин, заменивший уридин в акцепторе фосфата, снижает эффективность последнего в РНК-лигазной реакции; ранее приводившиеся данные [1] были получены на менее очищенном препарате РНК-лигазы.

В соответствии со схемой мы синтезировали аналог фрагмента 10–13: GrUpCpU, заменив остаток псевдоуридина-13 уридином. Синтез проводили, используя GrUpC и pU в качестве субстратов полинуклеотидфосфорилазы *Micrococcus luteus*, в стандартных условиях [10]. Выход тетра-нуклеозидтрифосфата составлял 12–13%. Реакционная смесь, как правило, содержала пентануклеотид (~4%) и практически не содержала

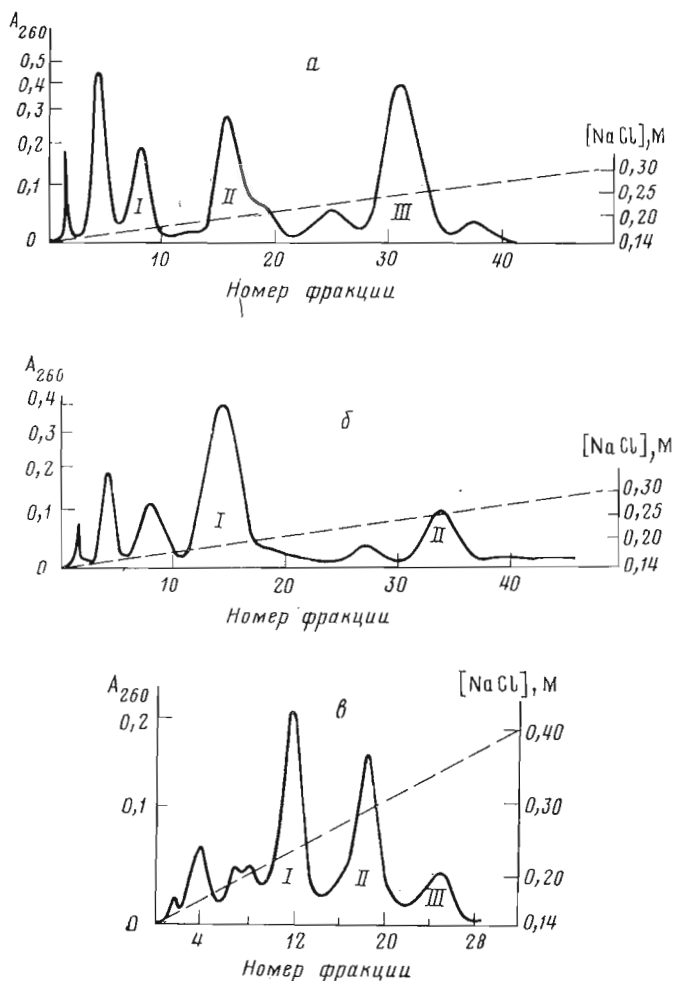


Рис. 3. Разделение реакционных смесей, полученных в синтезе нонануклеотида в присутствии РНК-лигазы на DEAE-сефадексе в системе Томлинсона — Тенера (для *a* и *б* колонка $0,9 \times 22$ см, скорость элюции 17 мл/ч, время элюции 24 ч; для *в* — колонка $0,9 \times 8$ см, скорость элюции 22 мл/ч, время 8 ч). *a* — GrUpCrU+rAr: I — GrUpCrU; II — rAr; III — GrUpCrUrAr; *б* — GrUpCrUrA+rGrDpC: I — GrUpCrUrA; II — GrUpCrUrArGrDpC; *в* — GrUpCrUrArGrDpC+rGr: I — rGr; II — GrUpCrUrArGrDpC; III — GrUpCrUrArGrDpCGr

более длинных олигонуклеотидов. Около 50% исходного GrUpC удалось регенерировать.

Присоединение следующего нуклеотида — остатка адениловой кислоты — проводили с помощью РНК-лигазы (табл. 3). В литературе описано присоединение rAr к олигоуридилатам, начиная с тримера и кончая пентамером, но если в работе [11] выход продукта составлял 13–19%, то в работе [12] сообщалось, что продукт присоединения rAr к тетрауридилату обнаружен не был. Известно также, что rAr присоединяется к тринуклеозиддифосфатам с уридином на 3'-конце с различной степенью эффективности [13]. В нашем случае сшивка rAr с тетрануклеотидным акцептором, имеющим уридин на 3'-конце, проходила с выходом 59%.

Результат хроматографического разделения реакционной смеси после проведения сшивки GrUpCrU и rAr представлен на рис. 3а. Для идентификации соединений, содержащихся в пиках, соответствующие пробы были обработаны щелочной фосфатазой из *E. coli* и продукты дефосфорилирования исследовали методом микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе с последующим гидролизом неспецифичной рибонуклеазой Pb₂ и анализом гидролизатов на дауэксе 1. Полученные результаты показали, что основной продукт реакции — GrUpCrUrAr — содер-

Определение нуклеотидного состава синтезируемых олигорибонуклеотидов

Олигонуклеотид	Фермент	Продукты гидролиза
DpC	Панкреатическая РНКаза	Dp : C=1 : 1
UpC	То же	Up : C=1 : 1
GpUpC	»	GpUp : C=1 : 1,1
GpDpC	РНКаза Pb ₂	Gp : C=1 : 1
pGpDpC	»	pGp : Dp : C=1 : 1 : 1,1
GpUpCpUpAp	Щелочная фосфатаза <i>E. coli</i>	GpUpCpUpA
GpUpCpUpA	РНКаза Pb ₂	Gp : Up : Cp : A=1 : 2 : 1,1 : 1
GpUpCpUpApGpDpC	Панкреатическая РНКаза	GpUp : ApGpDp=1,2 : 1 *
		Up : Cp : C=1 : 1,1 : 1,1 **
GpUpCpUpApGpDpC	Панкреатическая РНКаза + щелочная фосфатаза <i>E. coli</i>	GpU : ApGpD=1,1 : 1

* Гидролизат анализировали на микроколонке с DEAE-целлюлозой в системе Томлинсона — Тенера.

** Гидролизат анализировали на дауексе 1 (см. «Экспер. часть»).

жится в пике III, а исходные субстраты GpUpCpU и pAp — в пиках I и II соответственно. Таким образом, в нашем случае лигирование протекает с довольно высоким выходом, почти вдвое превышающим выход, который удалось получить при сшивке pAp с тринуклеозиддифосфатом UpCpU [14]. Следовательно, переход от тринуклеотидного акцептора к тетра-нуклеотидному, в котором три нуклеотидных остатка с 3'-конца совпадают с последовательностью тринуклеотида, сопровождается увеличением выхода в РНК-лигазной реакции. Этот результат не согласуется с данными, которые были получены нами и другими авторами при значительном увеличении размера акцептора, в частности при переходе от три- к гексануклеотиду [15], от гекса- к нонануклеотиду [15], от гекса- к ундекануклеотиду [16], когда выход уменьшался [15, 16] или оставался на том же уровне [15]. По-видимому, не исключено, что для РНК-лигазы существует некоторое оптимальное отношение размеров сшиваемых субстратов, однако экспериментальных данных пока слишком мало даже для этого предположения.

После обработки GpUpCpUpAp щелочной фосфатазой *E. coli* получили GpUpCpUpA, который в качестве акцептора фосфата использовали в синтезе октануклеозидгептафосфата GpUpCpUpApGpDpC (табл. 3). Сшивку GpUpCpUpA и pGpDpC РНК-лигазой проводили при 2-кратном избытке акцептора. Октануклеотид образуется с выходом ~20–25%, при этом 60–64% акцептора удается регенерировать. В литературе нет примеров, с которыми можно было бы сравнивать полученный результат. Присоединение остатка гуаниловой кислоты к 3'-концевому аденозину акцептора описано лишь в работе [12], где с выходом 30% проведено лигирование pGr и триаденилата. Принимая во внимание существенные различия в размерах и составе субстратов, можно предположить, что последние мало влияют на результат лигирования в рассматриваемом нами случае, однако этот вывод следует считать весьма предварительным.

Таким образом, тринуклеотид, содержащий остаток дигидроуридина в среднем положении, может быть как акцептором, так и донором фосфата в РНК-лигазной реакции (табл. 3), т. е. присутствие дигидроуридина вблизи 3'-конца акцептора или 5'-конца донора не мешает ферменту.

Наконец, синтез аналога фрагмента 10–18 был завершен присоединением остатка гуаниловой кислоты к октануклеотиду GpUpCpUpApGpDpC с помощью РНК-лигазы с последующим дефосфорилированием продукта лигирования. Значительное увеличение размера акцептора по сравнению с модельной реакцией GpDpC+pGr при одинаковой структуре 3'-конца участвующего в реакции акцептора несколько уменьшает выход продукта, что совпадает с ранее упоминавшимися наблюдениями [15, 16], но не исключено, что при оптимизации условий последнего лигирования удастся получить и более высокий выход нонануклеотида.

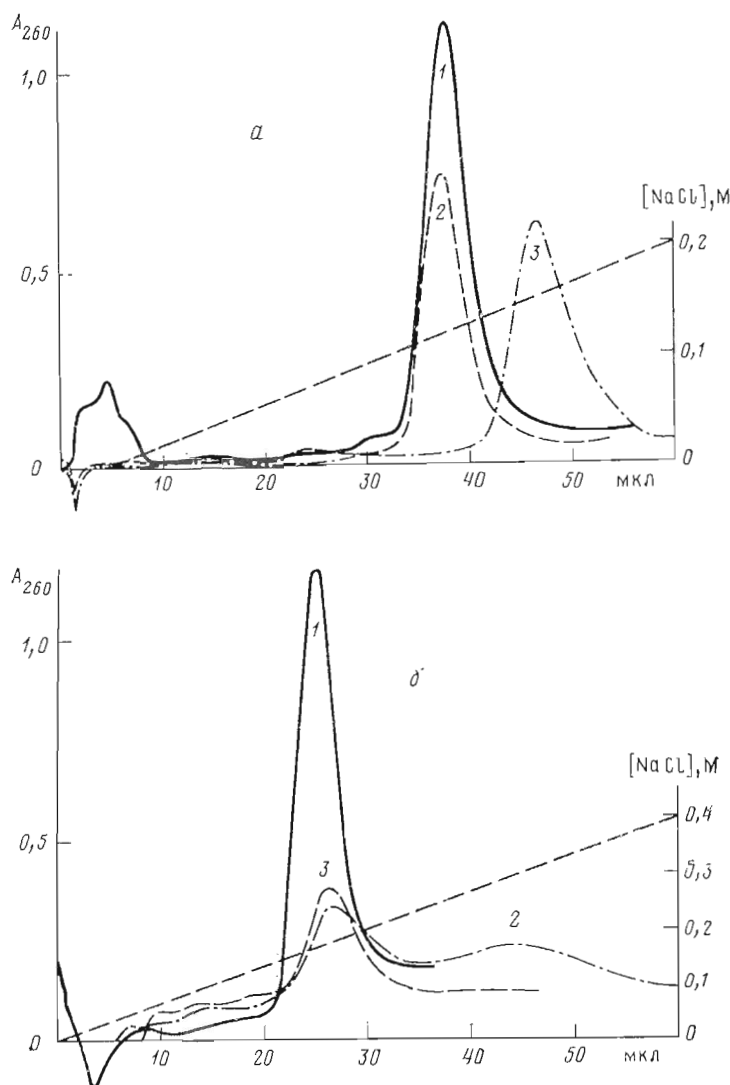


Рис. 4. Микроколоночная хроматография олигонуклеотидов на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочеvine (колонка 1,2×50 мм, скорость элюции 600 мкл/ч, запись на МСФП-1): а — GpUpCpUpA (1), pGpDpC (2), GpUpCpUpApGpDpC (3); б — GpUpCpUpApGpDpC (1), GpUpCpUpApGpDpCpGp+GpUpCpUpApGpDpCpC (2), GpUpCpUpApGpDpCpC (3)

Идентификацию продуктов олигонуклеотидного синтеза проводили после проверки их гомогенности (рис. 4) стандартными способами. Олигонуклеотиды расщепляли рибонуклеазами разной специфичности. Продукты гидролиза в случае коротких олигонуклеотидов разделяли хроматографией на бумаге с последующим УФ-спектрофотометрированием. В случае пента- и октануклеотидов гидролизаты анализировали на микроколонках с DEAE-целлюлозой в системе Томлинсона — Тенера и с дауэксом 1 в градиенте (0–0,25 М) NH_4Cl (pH 10) с 20% спиртом. Полученные результаты соответствовали расчетным данным (табл. 4).

Экспериментальная часть

В работе использовали цитидин, уридин, натриевые соли 2'(3')-фосфата уридина, UDP и ATP, панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), циклогексилгуанидинные соли U>p и G>p, калиевую соль дигидроуридин-2'(3')-фосфата, полинуклеотидфосфорилазу *M. luteus* (Cal-

biochem, США), мета-*n*-толуолсульфонат N-циклогексил-N'-(2-морфолин-этил)-карбодимид (ЦГМК), дитиоэритрит (Serva, ФРГ), сефадексы G-10, G-15; DEAE-сефадекс A-25 (Pharmacia, Швеция).

2'(3'),5'-Дифосфаты аденозина и гуанозина и соответствующие 5'-фосфорилнуклеозид-2',3'-циклофосфаты синтезировали как описано в работе [17]. 2',3'-Циклофосфат дигидроуридина был получен с выходом ~90% циклизацией дигидроуридиловой кислоты в присутствии ЦГМК при автоматическом контроле pH реакционной смеси (5,0–5,5). Циклогексилгуанидиниевые соли $U > p$ и $G > p$ превращали в аммониевые обработкой дауэксом 50W (NH_4^+ -форма).

Гуанилспецифичная рибонуклеаза *Vac. intermedius* (КФ 3.1.27.3) была выделена Ф. Р. Шариповой (Казанский университет) и иммобилизована, как описано в работе [9]. Гуанилспецифичная рибонуклеаза *Asp. clavatus* (C_2) (КФ 3.1.27.3) и неспецифичная рибонуклеаза *Pen. brevicompactum* (КФ 3.1.27.1) получены от С. И. Безбородовой (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва), РНК-лигаза T4 (КФ 6.5.1.3) — от П. М. Пустошиловой (НИКТИ БАН, г. Бердск) и М. И. Болезнича, а щелочная фосфатаза *E. coli* (КФ 3.1.3.1) — от Р. Ф. Ренхоф (ИОС АН ЛатвССР, Рига). Препарат РНКазы C_2 , ковалентно связанной с неорганическим сорбентом типа «Силохром», был приготовлен Л. А. Орна (НПО «Биохимреактив», г. Олайнс) [18].

Хроматографию и электрофорез на бумаге, микроколоночную хроматографию и УФ-спектрофотометрию проводили так, как в работе [19]. Идентификация производных дигидроуридина и измерение концентрации этих производных подробно описаны нами ранее [7]. Гидролиз олигонуклеотидов и анализ гидролизатов осуществляли в соответствии с работой [20]. Нуклеотидный состав $GpUpCpUpA$ после гидролиза пентануклеотида рибонуклеазой Pb_2 определяли по [21]. Октануклеотид $GpUpCpUpApGpDpC$ расщепляли панкреатической рибонуклеазой и анализировали гидролизат, содержащий $GpUp$, Cp , Up , $ApGpDp$ и C , на микроколонках с DEAE-целлюлозой в системе Томлинсона — Тенера и на колонках с дауэксом 1 по [21].

Синтез динуклеозидмонофосфатов DpC и UpC в присутствии рибонуклеаз. а) Рибонуклеаза Pb_2 : нуклеозид-2',3'-циклофосфат ($D > p$ или $U > p$) и цитидин (начальные концентрации 0,25 и 0,75 М соответственно) растворяли в 0,2 М фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 20 ед. акт./мл рибонуклеазы Pb_2 , и инкубировали раствор при $\sim 0^\circ C$. Через определенные промежутки времени отбирали пробы из реакционной смеси и анализировали их с помощью электрофореза на бумаге и УФ-спектрофотометрии (см. рис. 2).

б) Панкреатическая рибонуклеаза: $D > p$ или $U > p$ и цитидин (начальная концентрация 0,08 и 0,64 М соответственно) растворяли в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,5, содержащем 160–200 мкг/мл панкреатической рибонуклеазы. Полученный раствор инкубировали при $\sim 0^\circ C$ или замораживали в смеси «сухой лед» — ацетон и оставляли при $-18^\circ C$. Обычно объем реакционной смеси составлял $\sim 0,3$ мл. Некоторые изменения концентрации цитидина при оптимизации синтеза DpC приведены в табл. 1. Через определенные промежутки времени пробы, взятые из реакционной смеси, или всю смесь (при проведении синтеза в замороженном состоянии) делили методом электрофореза на бумаге, а полученный динуклеозидмонофосфат дополнительно очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-10 (см. табл. 1 и рис. 2).

Препаративный синтез UpC проводили, используя рекомендации работы [6] с некоторыми модификациями. Стандартная реакционная смесь содержала 250 мкмоль $U > p$, 2 ммоль цитидина и 800 мкг панкреатической рибонуклеазы в 4 мл трис-HCl-буфера, pH 7,5. Через 24 ч инкубации в замороженном состоянии и после разделения на дауэксе 50W (H^+ -форма) получили ~ 160 мкмоль UpC (64%).

Тринуклеотиды $GpUpC$, $GpDpC$ и $pGpDpC$ получали, инкубируя раствор $G > p$ или $pG > p$ и динуклеозидмонофосфата (UpC или DpC) с гу-

анилсесифичными рибонуклеазами C₂, Sil-C₂, CM-T, [22] или CM-Bi. Начальные концентрации субстратов и ферментов, продолжительность инкубирования и результаты приведены в табл. 2. Стандартный объем реакционной смеси — 0,1 мл (аналитический вариант) и до 1 мл (препаративный вариант). Буферные растворы: 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,0 (рибонуклеазы Sil-C₂, CM-T₁); 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,5 (рибонуклеаза C₂); 0,1 М трис-HCl-буфер, pH 7,5 (рибонуклеаза CM-Bi). Реакционные смеси делили препаративной хроматографией на бумаге FN-2 в системе этанол — пропанол-2 — конц. аммиак — вода (60:5:10:25) и дополнительно очищали тринуклеотид электрофорезом в 0,05 М растворе бикарбоната триэтиламмония, pH 7,6, обессоливая затем тринуклеотид гель-фильтрацией на сефадексе G-10.

Синтез GrUpCpU из GrUpC и ppU в присутствии ПНФазы *M. luteus* проводили в разработанных нами ранее условиях [10].

Синтезы олигонуклеотидов с участием РНК-лигазы T4 и разделение реакционных смесей осуществляли в условиях, подробно описанных в работе [18] (см. табл. 3 и рис. 3).

Дефосфорилирование олигонуклеотидов. 100 ОЕ₂₆₀ олигонуклеотида с концевым фосфатом растворяли в 0,85 мл 0,1 М трис-HCl-буфера, pH 8,0, содержащего 0,01 М MgCl₂, добавляли 0,15 мл раствора щелочной фосфатазы *E. coli* (1 мг/мл; 1 мг расщепляет 92,5 мкмоль *p*-нитрофенилфосфата за 10 мин при 37°С) и выдерживали 3–6 ч при 37°С. За ходом реакции следили с помощью электрофореза на бумаге в 0,05 М трис-HCl-буфере, pH 7,6, или микроколоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе в системе Томлинсона — Тенера. В случае неполного дефосфорилирования добавляли свежую порцию фермента. По окончании дефосфорилирования гидролизат хроматографировали на бумаге в системе этанол — пропанол-2 — конц. аммиак — вода, 60 : 5 : 10 : 25 (короткие олигонуклеотиды), или пропанол-1 — конц. аммиак — вода, 5 : 1 : 4 (длинные олигонуклеотиды).

Авторы приносят сердечную благодарность С. И. Безбородовой, Н. М. Пустошиловой, Ф. Р. Шариповой, Р. Ф. Ренхоф и М. И. Болезнину за ферментные препараты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Хабарова М. И. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, № 5, с. 1181–1193.
2. Smrt J. Collect. Czech. Chem. Commun., 1967, v. 32, № 1, p. 198–205.
3. Formoso C., Tinoco I. Biopolymers, 1971, v. 10, № 9, p. 1533–1541.
4. Wang D., Zheng K., Qiu M., Liang Zh., Wu R., Chen Ch., Wang E., Zhu Y., Shen Q., Yu Y., Wang Y., Chen H., Yang Z., Lu Y., Chen Sh., Wang G., Hu M. Scientia Sinica (Ser. B), 1983, v. 26, № 5, p. 464–481.
5. Wang D., Wu R., Zheng K., Yu D., Tang J., Qi G., Chen Ch., Zhu Y., Xie H., Wang Y., Nie H., Chen Sh., Huang J., Chen D., Zhuang J., Wang G., Chen H. Scientia Sinica (Ser. B), 1983, v. 26, № 5, p. 496–503.
6. Кавуценко А. П., Калачева Т. С., Тихомирова-Сидорова Н. С. Биохимия, 1974, т. 39, № 4, с. 839–844.
7. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. Биооргани. химия, 1975, т. 1, № 6, с. 769–773.
8. Fink L. M., Cline R. E., McGanghey C., Fink K. Analyt. Chem., 1956, v. 28, № 1, p. 4–7.
9. Шарипова Ф. Р., Балабан Н. П., Рязанов С. М., Лещинская И. Б., Хабарова М. И., Женодарова С. М. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 505–510.
10. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1505–1515.
11. England T., Uhlenbeck O. Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2069–2076.
12. Kikuchi Y., Hishinuma F., Sakaguchi K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 3, p. 1270–1273.
13. Romaniuk E., McLaughlin L. W., Neilson T., Romaniuk P. J. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 3, p. 639–643.
14. Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Женодарова С. М. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 4, с. 498–505.
15. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Белова Е. Н., Манькин А. С. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1382–1387.

16. Ohtsuka E., Nishikawa S., Markham A. F., Tanaka S., Miyake T., Wakabayashi T., Ikehara M., Sugiura M. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 23, p. 4894-4899.
17. Женодарова С. М., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г. *Биоорг. химия*, 1980, т. 6, № 10, с. 1516-1521.
18. Варламов В. П., Розожин С. В., Орпа Л. А., Безбородова С. П. Тез. докл. 5 Всес. симп. по инженерной энзимологии, 1985, Кобулет, с. 251.
19. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 4, с. 524-533.
20. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г., Прокофьев М. А. *Биоорг. химия*, 1975, т. 1, № 5, с. 604-610.
21. Asteriadis G. T., Armbuster M. A., Gilham P. T. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 70, № 1, p. 64-74.
22. Соболева Н. А., Хабарова М. И., Женодарова С. М. *Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 4, с. 508-515.

Поступила в редакцию
21.VI.1985

THE SYNTHESIS OF THE D-ARM FRAGMENTS OF YEAST tRNA^{Val}₁ AND THEIR ANALOGUES

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SEDELNIKOVA E. A., SMOLYANINOVA O. A.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Pouchchino, Moscow Region*

Nonanucleotide GpUpCpUpApGpDpCpGp corresponding to the fragment 10-18 of the yeast tRNA^{Val}₁ with pseudouridine-13 replaced by uridine has been synthesized. Dihydrouridine derivatives were studied as substrates of ribonucleases with various specificity and of RNA ligase.