



УДК 577.113.6 : 577.152.31*.217'135

МОДЕЛЬНЫЕ СУБСТРАТЫ ФЕРМЕНТОВ МОДИФИКАЦИИ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. СИНТЕЗ ДЕКА- И УНДЕКАНУКЛЕОТИДА — ФРАГМЕНТОВ 21-ЧЛЕННОГО ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДА, МОДЕЛИРУЮЩЕГО ТΨС-ВЕТВЬ ДРОЖЖЕВОЙ ВАЛИНОВОЙ тРНК₁

Хабарова М. И., Женодарова С. М.

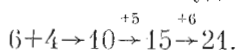
*Институт биологической физики Академии наук СССР,
Пушино Московской обл.*

Синтезирован декануклеотид (Ap)₆GpTpUpC и ундекануклеотид GpApUpCpCp-(Up)₅U — фрагменты 21-членного олигорибонуклеотида (Ap)₆GpTpUpCpGpApUpCpCp-(Up)₅U, моделирующего ТΨС-ветвь тРНК₁^{val} из дрожжей и предлагаемого в качестве субстрата m¹A-метилазы и псевдоуридинсинтетазы. Исходные блоки TpUpC, ApUpCpC, pCpTpUpC и GpApUpCpC были получены ферментативным синтезом с использованием рибонуклеаз различной специфичности и полинуклеотидфосфорилаз, а гексауридилат и гексааденилат — гидролизом полиуридилевой и полиадениловой кислоты эндонуклеазой *Serratia marcescens*. Для сшивки блоков применяли РНК-лигазу.

Ферменты, ответственные за посттранскрипционную модификацию рибонуклеиновых кислот, давно привлекают внимание исследователей, однако достаточно широкое их изучение сдерживает отсутствие субстратов, в качестве которых обычно используют немодифицированные или «маломодифицированные» пре-РНК [1]. В последние годы среди ферментов модификации рибонуклеиновых кислот были обнаружены ферменты, субстратами которых *in vitro* служат как РНК-предшественники, так и синтетические поли-, олиго- и даже мононуклеотиды [2–4].

Принимая во внимание успешное использование модельных субстратов, конструируемых из нативных и синтетических фрагментов рибонуклеиновых кислот при исследовании различных этапов механизма белкового синтеза [5–9], а также результаты более ранних работ, свидетельствующие о ферментативном переносе метильной [10] и изопентильной [11] групп на фрагменты тРНК, мы предложили [12] для изучения действия m¹A-метилазы (КФ 2.1.1.36) и псевдоуридинсинтетазы использовать олигорибонуклеотид (Ap)₆GpTpUpCpGpApUpCpCp-(Up)₅U, моделирующий ТΨС-ветвь дрожжевой валиновой тРНК, в котором место псевдоуридина-55* и N¹-метиладенозина-58 занимают уридин и аденозин соответственно. Наличие на концах 21-членного олигорибонуклеотида комплементарных последовательностей при определенных условиях должно обеспечить образование вторичной структуры [14], конформация которой, вероятно, будет меняться в зависимости от условий среды (температуры, рН, ионной силы и т. п.).

Ранее нами был предложен способ синтеза 21-членного олигонуклеотида [12], который предусматривал сборку 21-членника из блоков путем постепенного удлинения олигонуклеотидной цепи от 5'- к 3'-концу:



Сокращения: ПНФаза — полинуклеотидфосфорилаза; ПН-киназа — полинуклеотидкиназа; ФМЭ — фосфомоноэстераза; ФДЭ — фосфодиэстераза; СМ-РНКаза — рибонуклеаза, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой; РНКаза А, РНКаза Рb₂, РНКаза В₁, РНКаза С₂ — рибонуклеазы панкреатическая, *Penicillium brevicompactum* (неспецифичная) и гуанилспецифичные рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 7Р и *Aspergillus clavatus*.

* Нумерация нуклеозидных остатков соответствует унифицированной [13].

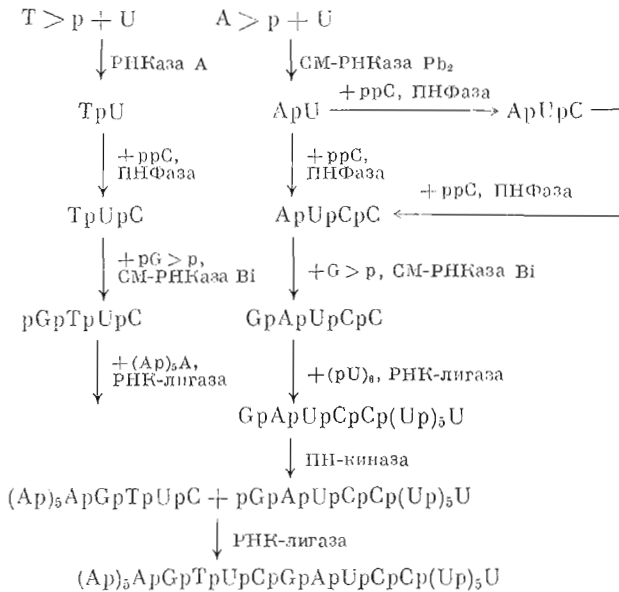
Синтез TrU, катализируемый РНКазой А (а также СМ-РНКазой А),
в зависимости от начальной концентрации субстратов и температуры

[T>p]	[U]	[РНКаза А], мг/мл	Время, ч	Температура, °С	Выход, %	Возврат T>p, %
М						
0,065	0,65	0,16	14	0	13 (8) **	49 (31)
0,065	0,65	0,04	256	-15	11	46
0,25	1,25	0,38	100	0	19 (14) **	41 (27)
0,25	0,75	13 *	96	0	11	41

* Данные для СМ-РНКазы А.

** В скобках указан выход, полученный в препаративном опыте после разделения реакционной смеси на колонке с ДЕАЕ-сефадексом.

В настоящей работе мы исследовали несколько иной вариант: получение дека- и ундекануклеотида и «сшивание» их в 21-членный олигонуклеотид:



Исходные олигонуклеотидные блоки синтезировали, используя рибонуклеазы различной специфичности наряду с полинуклеотидфосфорилазами и учитывая результаты, полученные нами ранее при синтезе аналога ТΨС-петли и его фрагментов [15, 16]. Отметим, что по сравнению с сообщением [12] в настоящей работе при получении тетра- и пентануклеотида рGrTrUpC была изменена стратегия синтеза, т. е. последовательность ферментативных реакций, а при получении пентануклеотида GrApUpCpC применяли, как правило, новые, более эффективные ферментные препараты.

Препаративный синтез ApU проводили с иммобилизованной рибонуклеазой Pb₂, как описано в работе [17]. Препаративному получению TrU предшествовали синтезы, в которых мы варьировали начальные концентрации субстратов и фермента, а также температуру. Оказалось (табл. 1), что наиболее высокий выход получается при максимальной концентрации субстратов. Проведение реакции в замороженном состоянии не дает преимуществ в выходе. Выход TrU, полученный с иммобилизованным препаратом, ниже, чем при использовании нативного фермента, однако возможность быстро и полностью удалять иммобилизованную РНКазу из реакционной смеси исключает потери TrU при выделении за счет расщепления динуклеозидмонофосфата, имевшие место в препаративных опытах с применением нативной РНКазы (табл. 1).

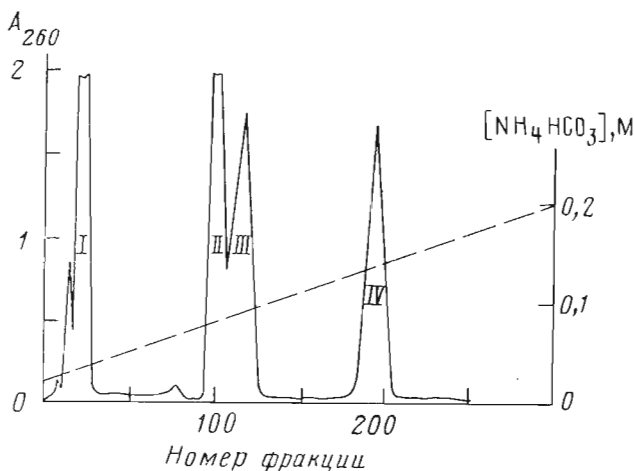


Рис. 1. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе TrU , на DEAE-сефадексе A-25: I - U, II - $\text{T} > \text{p}$, III - TrU , IV - Tr

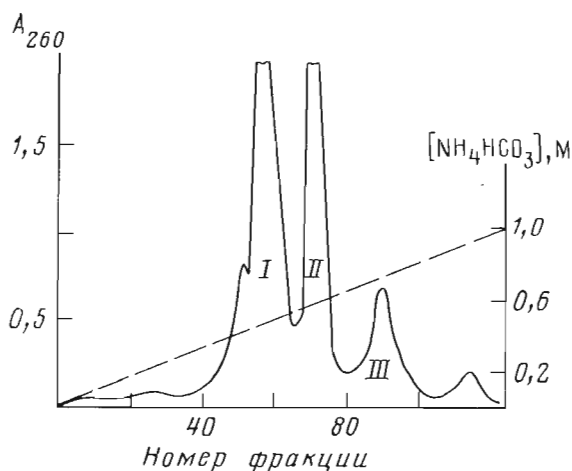


Рис. 2. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе GrArUpCrC , на DEAE-сефадексе A-25: I - $\text{Gr} + \text{G} > \text{p}$, II - ArUpCrC , III - GrArUpCrC

ше начальной концентрации акцептора фосфата TrU . Выход TrUpC составил $\sim 15\%$ на израсходованный TrU , что практически совпадает с результатами, полученными для UpUpC [18] и GrTrUpC из GrTrU [16]. $65\text{--}70\%$ TrU возвращается из реакции.

Удлинение другого динуклеозидмонофосфата (ArU) с помощью полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus* проводили при эквимольном отношении субстратов, уменьшив вдвое начальную концентрацию фермента и увеличив время инкубации. Эти меры должны были обеспечить более высокое содержание в реакционной смеси продукта присоединения к ArU двух остатков 5'-цитидиловой кислоты. Действительно, выход ArUpCrC увеличился по сравнению с описанным ранее [16] до 30% (вместо 15%). Еще $\sim 30\%$ израсходованного ArU превращается в ArUpC , а $65\text{--}70\%$ ArU может быть регенерировано. В соответствии с ранее полученными результатами [16] ArUpC превращали в ArUpCrC инкубированием с pC в присутствии полинуклеотидфосфорилазы *E. coli* при обычном для однократного присоединения отношении [акцептор]/[донор]=2. При этом 15% ArUpC превращается в ArUpCrC , а 70% возвращается из реакции в неизменном виде.

Тетрануклеотид pGrTrUpC и пентануклеозидтетрафосфат GrArUpCrC получали, наращивая TrUpC и ArUpCrC соответственно с 5'-конца. Начальные концентрации субстратов и другие условия были выбраны нами

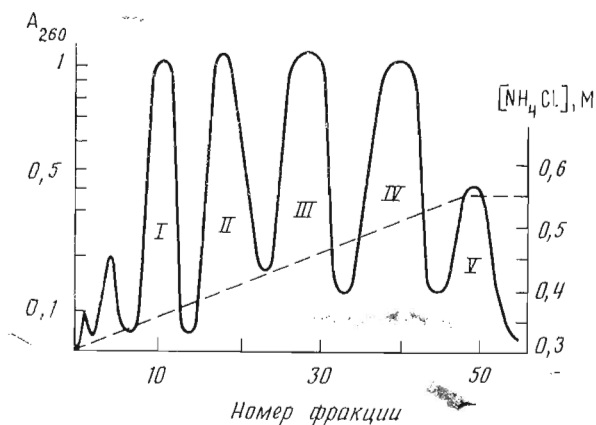


Рис. 3. Разделение гидролизата poly(A) на колонке (0,9××60 см) с дауэксом 1×2 (Cl⁻-форма) в градиенте (0,3–0,55 M) NH₄Cl, pH 8,0, с 40% этанолом (скорость элюции 30 мл/ч, объем фракций 10 мл): I – (pA)₂, II – (pA)₃, III – (pA)₄, IV – (pA)₅, V – (pA)₆

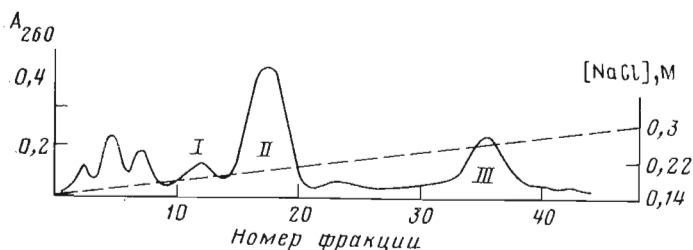


Рис. 4. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе (Ap)₆GpTpUpC, на колонке (0,9×30 см) с DEAE-сефадексом А-25 в системе Томлинсона – Тенера (скорость элюции 18 мл/ч, объем фракций 9 мл): I – pGpTpUpC, II – (Ap)₅A, III – (Ap)₆GpTpUpC

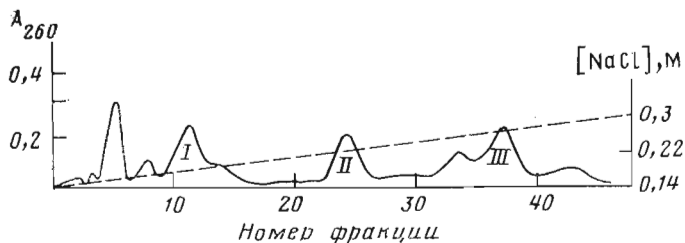


Рис. 5. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе GpApUpCpCp(Ur)₆U, на колонке (0,9×30 см) с DEAE-сефадексом А-25 в системе Томлинсона – Тенера (скорость элюции 18 мл/ч, объем фракций 9 мл): I – GpApUpCpC, II – (pU)₆, III – GpApUpCpCp(Ur)₆U

с учетом данных работ [16, 19]. СМ-РНКаза Vi оказалась более эффективной в синтезе pGpTpUpC по сравнению с нативной РНКазой С₂ (табл. 2). GpApUpCpC также получали с помощью СМ-РНКазы Vi, обеспечивающей более высокий выход, чем нативные РНКазы С₂ и Т₁ [16]. Для более эффективного использования олигонуклеотидного акцептора фосфата синтеза проводили при 4-кратном избытке донора фосфата. В этом случае pG>p как донор фосфата имеет значительное преимущество перед G>p, так как наличие заместителя в 5'-положении препятствует образованию олигоуацилатов, приводит к более высокому выходу целевого олигонуклеотида и упрощает его выделение из реакционной смеси. Действительно, выход pGpApUpCpC оказался почти вдвое выше выхода GpApUpCpC в одних и тех же условиях (табл. 2).

Синтезированные олигонуклеотидные блоки выделяли из реакционных смесей хроматографией на колонках с ДЕАЕ-сефадексом в градиенте концентрации бикарбоната аммония (ArU, TrU, GrArUrCrC; рис. 1, 2) или хроматографией на бумаге в системе А при дополнительной очистке электрофорезом на бумаге и рехроматографией в системе Б (TrUrC, ArUrC, ArUrCrC, pGrTrUrC). Гомогенность синтезированных олигонуклеотидов контролировалась микрохроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе, а нуклеотидный состав — как описано в работе [16]. Характеристики этих соединений приведены в табл. 3.

Гексааденилат и гексауридилат получали гидролизом соответствующих полинуклеотидов эндонуклеазой *Serratia marcescens*, как описано в работе [19], применяя для выделения хроматографию на дауэксе 1 (рис. 3).

Декануклеотид (Ar)₅ArGrTrUrC и ундекануклеотид GrArUrCr-Cr(Ur)₅U получали, сшивая соответствующие блоки (см. схему) РНК-лигазой (табл. 4, рис. 4, 5). Условия проведения лигирования соответствовали применявшимся нами ранее [19].

В литературе описан единственный случай образования межнуклеотидной связи типа ...ArG... с помощью Т4-РНК-лигазы — между триаденилатом и рСр (выход 30%) [20]. Результат, полученный нами в синтезе декануклеотида (табл. 4), по-видимому, соответствует тому, что «позволяет» субстратная специфичность РНК-лигазы, в том числе и «требования» к размерам субстратов. Реакционная смесь не содержала, по крайней мере в заметных количествах, продуктов самоконденсации донора, 30% которого (как и 48% акцептора) было регенерировано.

Использование гексауридилата как донора фосфата при образовании межнуклеотидной связи типа ...CrU... описано в работе [21]. Акцепторами фосфата служили олигонуклеотиды ArArC и ArArArC. Выходы в реакции лигирования, определенные по включению в продукт реакции радиоактивного фосфора, составили 48 и 46% соответственно. Самоконденсация гексауридилата при определенных условиях может протекать на 100% [22], однако проведение нами сшивки (pU)₆ и GrArUrCrC в условиях, отличных от предложенных в работе [22], а также присутствие в реакционной смеси акцептора фосфата GrArUrCrC (по-видимому, более активного, чем сам гексауридилат) позволили синтезировать ундекануклеотид с выходом 30%; 40% акцептора и 10% донора было регенерировано.

Экспериментальная часть

В работе использовали уридин, натриевые соли 2',3'-циклофосфата аденозина, АТР, poly(A), poly(U), а также панкреатическую рибонуклеазу (КФ 3.1.27.5; Reanal, Венгрия); риботимидин, литиевую соль CDP, дитиозинитрит, *n*-толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*-[β-(4-метилморфолиний)]этилкарбодимид (Serva, ФРГ); ДЕАЕ-целлюлозу Cellex D (Bio Rad, США); сефадексы G-10, G-15, ДЕАЕ-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция); дициклогексилгуанидиниевую соль гуанозина-2', 3'-циклофосфата, полинуклеотидфосфорилазу *M. luteus* (КФ 2.7.7.8) и рибонуклеазу T₁ (КФ 3.1.27.3) (Calbiochem, США); панкреатическую рибонуклеазу, связанную с СМ-целлюлозой (Fluka, ФРГ); фосфодиэстеразу змеиного яда *Crotalus adamantus* (КФ 3.1.4.1; Koch-Light, Англия); эндонуклеазу *Serratia marcescens* (НИКТИ БАВ, Бердск); РНК-лигазу Т4 (КФ 6.5.1.3; НПО «Фермент», Вильнюс).

Дициклогексилгуанидиниевую соль G>р превращали в аммониевую обработкой дауэксом 50W×1 (NH₄⁺-форма). 2'(3'), 5'-Дифосфат гуанозина получали, фосфорилируя гуанозин пиррофосфорилхлоридом по методу [23]. Риботимидин-2'(3')-фосфат синтезировали по [24], 2',3'-циклофосфаты риботимидина и 5'-фосфорилгуанозина получали в присутствии *n*-толуолсульфоната *N*-циклогексил-*N'*-[β-(4-метилморфолиний)]этилкарбодимид, как описано в работе [25].

РНКаза P_b (КФ 3.1.27.1) выделена В. А. Ежовым с сотр. (ИБФМ АН СССР, г. Пущино). СМ-РНКаза P_b (0,126 ед. акт./мг) и СМ-РНКаза В₁ (0,064 ед. акт./мг) приготовлены в нашей лаборатории [26, 27]. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющее при 37°С 1 мкмоль А>р за 1 мин при рН 7,0 (СМ-РНКаза P_b) или 1 мкмоль G>р за 1 мин при рН 7,5 (СМ-РНКаза В₁).

Полинуклеотидфосфорилаза *E. coli* (КФ 2.7.7.8; 19 ед. акт./мг·ч) и ФМЭ *E. coli* (КФ 3.1.3.1; 1 мг расщепляет 92,5 мкмоль *n*-нитрофенилфосфата за 10 мин при 37°С) любезно предоставлены Р. Ф. Ренхоф (ИОС АН ЛатвССР).

Хроматография и электрофорез проводили на бумагах FN-1, FN-2, FN-3, FN-15 (Filtrak, ГДР). Для нисходящей хроматографии использовали следующие системы

растворителей: этанол — пропанол-2 — конц. аммиак — вода, 60 : 5 : 10 : 25 (А); этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (Б); пропанол-1 — конц. аммиак — вода, 5 : 1 : 4 (В). Вертикальный электрофорез проводили в течение 2 ч при градиенте потенциала 20 В/см в 0,05 М бикарбонате триэтиламмония, pH 7,5.

Синтез ТрУ. Раствор риботимидин-2',3'-циклофосфата и уридина в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0, инкубировали с РНКазой А. Начальные концентрации субстратов и фермента, а также продолжительность инкубации и температура приведены в табл. 1. Объем реакционной смеси составлял 0,1–1 мл. В аналитических опытах ТрУ выделяли, комбинируя электрофорез и хроматографию на бумаге в системе А. В препаративных опытах реакционную смесь после отделения фермента (иммобилизованный препарат) фильтрованием или инактивации его добавлением 7 М NH_4OH (10% от объема реакционной смеси) наносили на колонку с DEAE-сефадексом А-25 ($1,6 \times 70$ см, HCO_3^-). Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации бикарбоната аммония (0,02–0,2 М, по 1,5 л) со скоростью 108 мл/ч, собирая фракции по 9 мл (рис. 1). Фракции 108–125, содержавшие ТрУ, обессоливали многократным упариванием с 50% этанолом при 50° С.

Синтез олигорибонуклеотидов с помощью полинуклеотидфосфорилазы. Динуклеозидмонофосфат или тринуклеозиддифосфат и рРС инкубировали с ферментом при 37° С в 0,05 М трис-НСI-буфере, pH 9,0, содержащем 0,05 мМ EDTA и 0,01 М MgCl_2 (2 ч, ПНФаза *M. luteus*) или в 0,1 М трис-НСI-буфере, pH 8,0, содержащем 0,05 мМ EDTA и 0,01 М MgCl_2 (1 ч, ПНФаза *E. coli*). Начальные концентрации субстратов и фермента приведены в табл. 2. Объем реакционной смеси составлял 0,5–4 мл. Реакционную смесь делили препаративной хроматографией на бумаге в системе А. Олигонуклеотиды дополнительно освобождали от примесей электрофорезом на бумаге и повторной хроматографией в системе Б.

Синтез олигорибонуклеотидов с помощью СМ-РНКазы Vi. Раствор рG>р или G>р и акцептора фосфата (начальные концентрации 0,08 и 0,02 М соответственно) в 0,1 М трис-НСI-буфере, pH 7,5, инкубировали при 0° С с ферментом (7,6 мг/мл) в течение 24 или 40 ч соответственно. Объем реакционной смеси составлял 0,1–0,2 мл. рGrTrUpC и рGrArUpCrC выделяли хроматографией на бумаге в системе А с последующей очисткой электрофорезом на бумаге. При получении GrArUpCrC реакционную смесь после отделения фермента наносили на колонку ($1,5 \times 17$ см) с DEAE-сефадексом А-25, уравновешенным 0,01 М бикарбонатом аммония. Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации бикарбоната аммония (0,01–1 М, по 500 мл) со скоростью 40 мл/ч, собирая фракции по 8 мл (рис. 2). Фракции 85–99, содержавшие GrArUpCrC, обессоливали, обрабатывая их дауэксом 50W \times 10 (H⁺-форма). После отделения смолы и упаривания фильтрата остаток хроматографировали в системе В.

Синтезы с участием РНК-лигазы T4 и разделение реакционных смесей проводили в условиях, описанных в работе [19]. Результаты синтезов представлены в табл. 4 и на рис. 4 и 5.

Определение нуклеотидного состава undекануклеотида и декануклеотида.

а) 1 OE₂₆₀ GrArUpCrCr(Ur)₅U растворяли в 0,05 мл 0,05М трис-НСI-буфера, pH 7,5, и инкубировали с панкреатической рибонуклеазой (0,2 мг/мл) при 37° С. Через 24 ч отобрали пробу по 0,01 мл и анализировали их хроматографией на микроколонке (0,8 \times 60 мм) с DEAE-целлюлозой (скорость элюции 600 мкл/ч, детекция с помощью микроспектрофотометра МСФН-1 при 260 нм) в градиенте концентрации (0–0,26 М) NaCl в 0,01 М трис-НСI-буфере, pH 7,5, с 7 М мочевиной и на микроколонке (0,8 \times 60 мм) с дауэксом 1 (скорость элюции 300 мкл/ч) в градиенте концентрации (0–0,5 М) NH_4Cl , pH 10,0, с 20% этанолом. При анализе РНКазного гидролизата на микроколонках с DEAE-целлюлозой и дауэксом 1 получили в первом случае [GrArUp]: [2Cr+5Ur]: [U]=0,9:1,15:1,0; во втором — [2Cr]: [5Ur]: [U]=1,9:5,3:1,0. По завершении гидролиза в реакционную смесь добавили 3 мкл 0,1 М MgCl_2 , 10 мкл раствора ФМЭ *E. coli* (1 мг/мл) и инкубировали 4 ч при 37° С, затем отобрали пробу (0,02 мл) и анализировали хроматографией на микроколонке с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации (0–0,2 М) NaCl в 0,01 М трис-НСI-буфере, pH 7,5, с 7 М мочевиной. Микроколончатая хроматография обработанного фосфатазой гидролизата на DEAE-целлюлозе показала, что отношение [GrArU]: [2C+6U]=1:1,13.

б) 1 OE₂₆₀ (Ar)₆GrTrUpCr растворяли в 0,03 мл 0,05 М трис-НСI-буфера, pH 8,0, содержащего рибонуклеазу T₁ (200 ед. акт./мл), и инкубировали при 37° С. Через 1 ч отобрали пробу (7,5 мкл), разбавили ее водой до 30 мкл и анализировали микроколончатой хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте концентрации (0–0,26 М) NaCl в 0,01 М трис-НСI-буфере, pH 7,5, содержащем 7 М мочевины. Через 2,5 ч в реакционную смесь добавили 1,2 мкл 0,1 М MgCl_2 , 10 мкл раствора ФМЭ *E. coli* и инкубировали 3 ч при 37° С. Пробу (20 мкл) анализировали хроматографией на микроколонке с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации (0–0,26 М) NaCl в 0,01 М трис-НСI-буфере, pH 7,5, с 7 М мочевиной, получили отношение [(Ar)₆G]: [TrUpC]=1:0,98. Пик, содержащий (Ar)₆G, после обессоливания на сефадексе G-15 и упаривания обработали 0,02 мл раствора рибонуклеазы Pb₂ (4 ед. акт./мл, pH 7,0) при 37° С в течение 5 ч. Гидролизат анализировали на микроколонке с дауэксом 1 как описано выше, обнаружили Ar и G.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kline L. K., Söll D. // The Enzymes. V. XVb. N. Y.: Acad. Press, 1982. P. 557–566.
2. Mizumoto K., Lipmann F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979. V. 76. № 10. P. 4961–4965.
3. Smith R. E., Furuichi Y. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 1. P. 485–494.

4. Wang D., Shatkin A. J. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 5. P. 2303-2315.
5. Meyhack B., Pace B., Uhlenbeck O. C., Pace N. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 7. P. 3045-3049.
6. Heckler T. G., Chang L. H., Zama Y., Naka T., Hecht S. M. // Tetrahedron. 1984. V. 40. № 1. P. 87-94.
7. Doi T., Morioka H., Matsugi J., Ohtsuka E., Ikehara M. // FEBS Lett. 1985. V. 190. № 1. P. 125-128.
8. Ohyama T., Nishikawa K., Takemura S. // J. Biochem. 1986. V. 97. № 1. P. 29-36.
9. Rose III S. J., Lowary P. I., Uhlenbeck O. C. // J. Mol. Biol. 1983. V. 167. № 1. P. 103-117.
10. Kuchino Y., Seno T., Nishimura S. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1971. V. 43. № 3. P. 476-483.
11. Vickers J. D., Logan D. M. // Biophys. Soc. Abstr. 1970. V. 40. P. 166a. цит. по: Shershneva L. P., Venkstern T. V., Bayev A. A. Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 294. № 2. P. 250-262.
12. Хабарова М. И., Женодарова С. М. // Тез. V Всесоюз. биохим. съезда. Т. 2. М.: Наука, 1986. С. 422.
13. Gauss D. H., Sprinzl M. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 1. P. r1-r53.
14. Haasnoot C. A. G., Hilbers C. W., van der Marel G. A., van Boom J. H., Singh U. C., Pattabiraman N., Kollman P. A. // J. Biomol. Struct. Dynam. 1986. V. 3. № 5. P. 843-858.
15. Zhenodarova S. M., Klyagina V. P., Smolyaninova O. A., Khabarova M. I., Antonovich E. G., Prokof'ev M. A. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 6. P. 2099-2107.
16. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Манькин А. С., Прокофьев М. А., Загребельный С. Н., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезнин М. И., Смолянинов В. В. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 7. С. 1037-1046.
17. Женодарова С. М., Смолянинова О. А., Соболева И. А., Хабарова М. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1023-1030.
18. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1505-1515.
19. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. // Биоорган. химия. 1981. Т. 7. № 4. С. 524-533.
20. Kikuchi Y., Hishinuma F., Sakaguchi K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 3. P. 1270-1273.
21. Walker G. C., Uhlenbeck O. C., Bedows E., Gunport R. I. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 1. P. 122-126.
22. Ямковой В. И. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1808-1812.
23. Barrio J. R., Barrio M. C. G., Leonard N. J., England T. E., Uhlenbeck O. C. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 11. P. 2077-2081.
24. Holy A., Bald R. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1971. V. 36. № 8. P. 2809-2823.
25. Кавуненко А. П., Сухаревич В. П., Тихомирова-Сидорова Н. С. // Журн. общ. химии. 1971. Т. 41. № 3. С. 679-687.
26. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 5. С. 736-742.
27. Шарипова Ф. Р., Балабан Н. П., Рязанов С. М., Лещинская И. Б., Хабарова М. И., Женодарова С. М. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 505-510.

Поступила в редакцию
8.XII.1986
После доработки
6.III.1987

**MODEL SUBSTRATES OF ENZYMES MODIFYING RIBONUCLEIC ACIDS.
SYNTHESIS OF DECA- AND UNDECANUCLEOTIDE FRAGMENTS
OF A 21-MER SIMULATING TΨC-ARM OF THE YEAST tRNA₁^{Val}**

KHABAROVA M. I., ZHENODAROVA S. M.

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

Decanucleotide (Ap)₆GpTpUpC and undecanucleotide GpApUpCpCp(Up)₅U have been synthesised. They constitute 5'-and 3'-parts of a 21-mer which imitates TΨC-arm of yeast tRNA₁^{Val} and is a potential substrate for m¹A-methylases and pseudouridine synthetase. The oligonucleotide blocks, synthesised enzymatically by means of ribonucleases of various substrate specificity and polynucleotide phosphorylases (TpUpC, ApUpCpC, pGpTpUpC, GpApUpCpC) or obtained by hydrolysis of poly(U) and poly(A) with *Serratia marcescens* endonuclease (hexauridilate and hexaadenilate), were joined by T4 RNA ligase.