



Памяти Е. Г. Антонович.

УДК 577.113.6 : 577.152.31*27'14

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ВКЛЮЧЕНИЕ В ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДЫ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ

Женодарова С. М., Клягина В. И., Седелникова Э. А.,
Смолянинова О. А., Соболева Н. А., Хабарова М. И.,
Гуляева В. И.*, Фролова Н. М.**

Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино Московской обл.

Суммированы результаты изучения поведения модифицированных нуклеозидов — компонентов тРНК — и их производных в реакциях образования межнуклеотидной связи, катализируемых рибонуклеазами различной специфичности, полинуклеотидфосфорилазами и РНК-лигазой. Псевдоуридин, дигидроуридин, риботимидин, 5-метилцитидин, инозин, 6-метиладенозин могут участвовать в образовании межнуклеотидной связи в присутствии большинства исследованных в работе рибонуклеаз: P_{b2}, P_{c12}, P_{b1}, P_{ch1}, C₂, T₁, панкреатической. 3-Метилцитидин и 4-ацетилцитидин образуют межнуклеотидную связь (как акцепторы фосфата) главным образом с помощью гуанилрибонуклеаз, 7-метилгуанозин и 1-метилгуанозин (как доноры фосфата в виде соответствующих производных) — при участии малоспецифичной рибонуклеазы P_{b2}, а 1-метиладенозин (акцептор фосфата) — с рибонуклеазой P_{c12}. 6-Изопентениладенозин — малоэффективный акцептор фосфата в реакции, катализируемой P_{b2}.

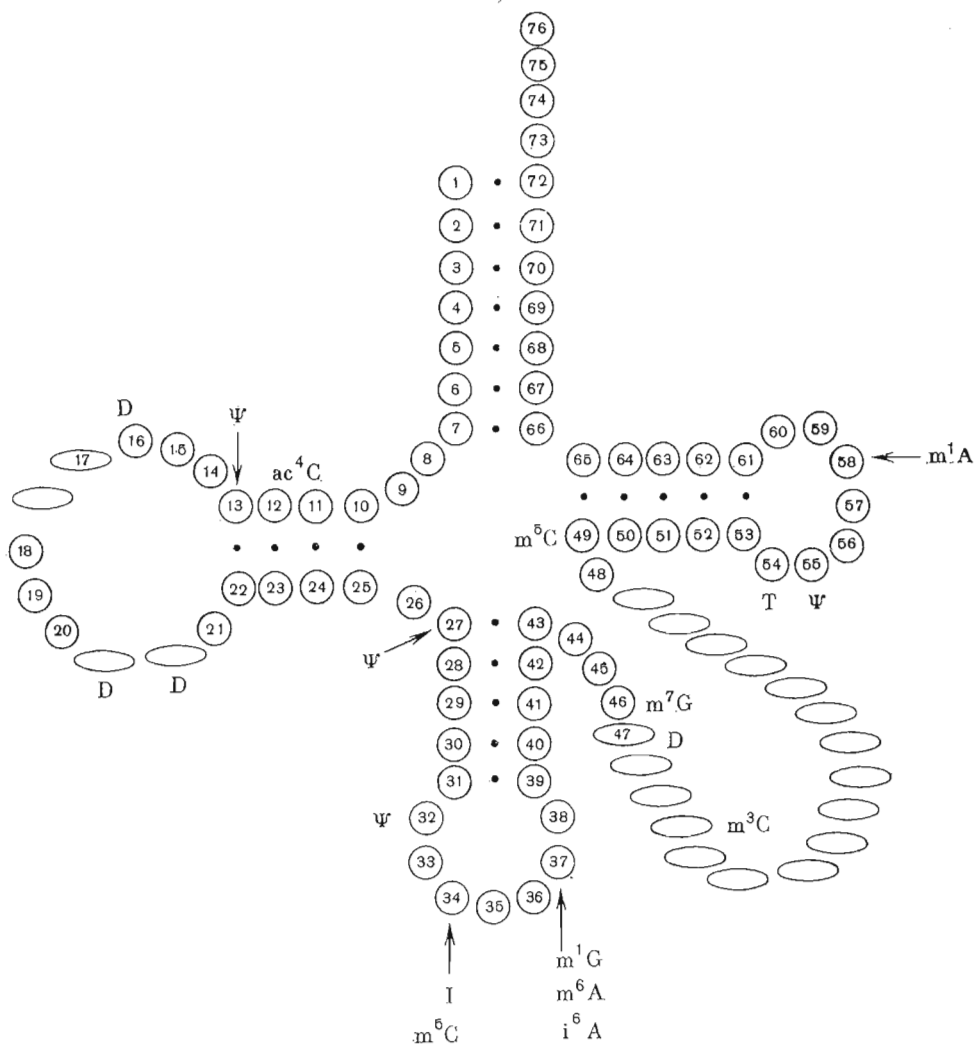
Модифицированные (ранее их называли минорными) нуклеозиды — одна из основных особенностей транспортных РНК. Роль этих компонентов в функционировании тРНК изучается давно, но интерес к этой проблеме не угасает (см., например, [1, 2]), так как молекулярные механизмы процессов, в которых они участвуют, до сих пор остаются невыясненными [3]. Для моделирования различных взаимодействий тРНК с другими компонентами системы биосинтеза белка нужны олигорибонуклеотиды, содержащие модифицированные нуклеозиды. Химический синтез таких олигорибонуклеотидов связан с большими трудностями, так как многие «миноры» неустойчивы в условиях введения и удаления защитных групп и реакции конденсации. Именно это послужило причиной того, что формилметиониновая тРНК *E. coli* была синтезирована без «миноров» (и без биологической активности) [4]. Мы считали, что более подходящими для введения модифицированных нуклеозидов в олигонуклеотид являются ферментативные методы, работающие в мягких условиях [5].

Схема комплексного использования ферментов нуклеинового обмена для олигорибонуклеотидного синтеза предусматривает последовательное применение различных ферментов: рибонуклеаз с различной специфичностью, полинуклеотидфосфорилаз и РНК-лигазы. В настоящей работе суммированы результаты исследования «взаимоотношений» этих ферментов с модифицированными нуклеозидами и их производными. На рис. 1 приведена обобщенная структура тРНК [6] и отмечены модифицированные нуклеозиды, поведение которых в ферментативных реакциях было нами изучено: производные аденозина (m¹A, m⁶A, i⁶A) и инозин, произ-

Сокращения: ферменты — РНКазы A, T₁, C₂, P_{b1}, P_{ch1}, B₁, P_{b2}, P_{c12} — рибонуклеазы панкреатическая, гуанилспецифичные *Aspergillus oryzae*, *Asp. clavatus*, *Penicillium brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *Bacillus intemedius* TP и малоспецифичные *P. brevicompactum*, *P. claviforme*, ПНФаза — полинуклеотидфосфорилаза. Приставка СМ к сокращенному названию фермента означает, что речь идет об иммобилизованном на СМ-целлюлозе препарате фермента.

* Настоящий адрес: Институт биохимии АН СССР, Москва.

** Настоящий адрес: Отдел генетики растений АН МССР, Кишинев.



Обобщенная структура тРНК [6] и локализация модифицированных нуклеозидов

водные гуанозина (m^1G , m^7G), производные цитидина (m^5C , m^3C , ac^4C), производные уридина (Ψ , D , T).

Наиболее распространенным среди модифицированных нуклеозидов является псевдоуридин: в 377 тРНК, первичная структура которых установлена [6], в положении 55 он встречается 321 раз, в положении 39—140, в положении 27—99 и т. д. Мы изучили поведение псевдоуридина и его 2',3'-циклофосфата в реакциях образования межнуклеотидной связи с участием РНКаз: пиримидинспецифичной А, гуанилспецифичной T_1 и малоспецифичной Rb_2 (табл. 1). 2',3'-Циклофосфат псевдоуридина оказался весьма эффективным донором фосфата при использовании РНКазы А, а сам псевдоуридин как акцептор фосфата более активен в случае РНКазы T_1 и практически неактивен в случае РНКазы Rb_2 . Наличие псевдоуридина на 3'-конце динуклеотидмонофосфата не мешает удлинению последнего с 5'-конца с помощью гуанил-РНКазы, а присутствие псевдоуридина на 5'-конце димера не влияет на удлинение последнего с помощью полинуклеотидфосфорилазы в противоположном направлении. Низкие выходы соответствующих триплеклеотидов связаны с неэффективным использованием полинуклеотидфосфорилазой *M. luteus* пуриновых 5'-дифосфатов [7]. В РНК-лигазных сшивках до сих пор не были использованы субстраты, в которых псевдоуридин участвовал бы в образовании новой межнуклеотидной связи, но РНК-лигаза «нормально» работает, если псевдоуридин занимает третье положение акцептора, т. е. положение, еще важное для

Псевдоуридин в реакциях образования межнуклеотидной связи

Субстрат	Фермент	Синтезированный олигонуклеотид	Время синтеза, ч	Выход, %
ψ>р ψ	A	ψрС	22	32
	Pb ₂	Арψ	2	3
	A	Срψ	0,5	2
ψрС	ПНФаза <i>M. luteus</i>	Urψ	8	10
		Gрψ	6	18
		ψрСрА	2	3-5
		ψрСрG	2	4
		ψрСрU	2	11
Urψ ψрСрU	T ₁ РНК-лигаза	GрUrψ	5	10
		ψрСрUrСрС	4	10

Таблица 2

Дигидроуридин в реакциях образования межнуклеотидной связи

Субстрат	Фермент	Синтезируемый олигонуклеотид	Время синтеза, ч	Выход, %	
D>р	A; Pb ₂ A	DрС	64 *; 192	47; 20	
		DрU	64 *	20	
D	T ₁	СрD	48	15	
		GрD	24	30	
GрD	ПНФаза <i>M. luteus</i> T ₁ ; C ₂ ; CM-Bi C ₂ ; CM-Bi CM-Bi	GрDрС	Не образуется		
DрС		1; 18; 24	5; 14; 30		
DрU		РНК-лигаза	рGрDрС	9; 24	12; 26
			СрDрU	16	12
GрDрС		»	GрDрСрGр	4	15
рGрDрС	»	GрUrСрUrGрDрС	4	25 [9]	

* Синтез проводили при -18° С.

взаимодействия с ферментом [8]. Итак, псевдоуридин и его производные — достаточно эффективные субстраты ферментов, применяемых в олигорибонуклеотидном синтезе.

Дигидроуридин локализован главным образом в одной из петель тРНК, называемой в связи с этим дигидроуридиловой петлей, но встречается также в дополнительной петле (рис. 1). Наиболее часто дигидроуридин занимает положение 20 (193 случая) и 16 (145). Поведение производных уридина как субстратов РНКаз различной специфичности и РНК-лигазы было детально изучено нами в работе [9]. Как следует из табл. 2, дигидроуридин и его производные могут быть субстратами (как донорами, так и акцепторами фосфата) всех интересовавших нас ферментов. Исключение составляет полинуклеотидфосфорилаза *M. luteus*, не присоединявшая следующий нуклеотидный остаток к акцептору, имеющему на 3'-конце дигидроуридин. Однако тринуклеотид GрDрС можно получать ферментативно, удлиняя DрС с 5'-конца с помощью гуанил-РНКазы.

Наконец, третье производное уридина — 5-метилуридин (риботимидин) всегда занимает положение 54 и встречается в 228 из известных 377 тРНК. Мы показали, что риботимидин и его 2',3'-циклофосфат достаточно активно участвуют в реакциях образования межнуклеотидной связи, катализируемых РНКазами различной специфичности (табл. 3). Присутствие риботимидина на 3'-конце или в другом положении акцептора не мешает присоединению следующего нуклеотидного остатка с помощью полинуклеотидфосфорилазы *M. luteus*. Как и в случае с псевдоуридином, поведение риботимидина в РНК-лигазных реакциях пока подробно не изучалось, но присутствие этого нуклеозида в одном из субстратов в положении, еще важном для связывания с ферментом, не мешает сшивке.

Следующую группу модифицированных нуклеозидов, с которыми мы работали, составляют производные цитидина (табл. 4). Наиболее часто

Риботимидин в реакциях образования межнуклеотидной связи

Субстрат	Фермент	Синтезированный олигонуклеотид	Время синтеза, ч	Выход, %
T > p	A	TrU	120	17
T	T ₁ : Pb ₂	Trψ	12	6
		GpT	22; 72	30; 9
		ApT	72	9
GpT	A	CpT	6	12
		GpTrU	2	10
		GpTrUpC	2	10
GpTrUpC	РНК-лигаза	GpTrUpCpGpApUpCpC	4	23

Таблица 4

Производные цитидина в реакциях образования межнуклеотидной связи

Акцептор фосфата	Рибонуклеаза	Синтезированный динуклеозидмонофосфат	Время синтеза, ч	Выход, %	
dm ⁵ C *	A	Cpdm ⁵ C	5	26	
	T ₁	Gpdm ⁵ C	48	46	
	Pb ₂	Apdm ⁵ C	12	26	
m ³ C	C ₂ : Pb ₁ ; T ₁	A	Cpm ³ C	2	2
		Pb ₂	Gpm ³ C	120; 96; 24	19; 26; 20
		Ap ³ C	Не образуется		
ac ⁴ C	C ₂ : Pb ₁ ; T ₁	A	Cpac ⁴ C	То же	
		Pb ₂	Gpac ⁴ C	72; 24; 24	17; 21; 23
		Apac ⁴ C	6	5	

* Использовали дезоксицуклозид; рибонуклеазы неспецифичны относительно 2',3'-диольной группы [19].

из них встречается 5-метилцитидин. Оказалось, что этот нуклеозид — весьма эффективный акцептор фосфата в реакциях с участием рибонуклеаз, причем наиболее высокий выход был получен с РНКазой T₁. 3-Метилцитидин также активно участвует в образовании межнуклеотидной связи в присутствии гуанил-РНКаз, однако мало эффективен как акцептор фосфата с панкреатической рибонуклеазой и совсем не включается в олигонуклеотид в присутствии РНКазы Pb₂. Напротив, 4-ацетилцитидин, будучи эффективным акцептором для гуанил-РНКаз, слабо участвует в образовании динуклеотида в присутствии РНКазы Pb₂ и совсем не образует межнуклеотидной связи при участии РНКазы A.

Из производных гуанозина нас интересовали 1-метилгуанозин и 7-метилгуанозин [10]. Изучение поведения 2',3'-циклофосфатов этих нуклеозидов в реакциях с участием гуанилспецифичных РНКаз, а также РНКазы Pb₂ показало, что 7-метилгуанозин можно включить в олигонуклеотид, применяя малоспецифичную РНКазу Pb₂, а 1-метилгуанозин — с помощью одной из гуанил-РНКаз (табл. 5).

Значительно более эффективным субстратом для исследуемых рибонуклеаз оказался 2',3'-циклофосфат инозина (табл. 6). Правда, сам инозин мало эффективен как акцептор фосфата в реакциях, катализируемых неспецифичной РНКазой Pcl₂, но в присутствии РНКазы A акцептирование фосфата инозиновым остатком происходит с более высоким выходом. Низкий выход в РНК-лигазной реакции, когда инозиновый остаток участвует в образовании новой межнуклеотидной связи со стороны донора, обусловлен скорее малой эффективностью акцептора.

Из производных аденозина мы изучали поведение 1-метил-6-метил- и 6-изопентиладенозина (табл. 7). Малоспецифичная РНКаза Pb₂ не катализирует реакций с участием 1-метиладенозин-2',3'-циклофосфата, хотя этот фермент с высоким выходом синтезирует немодифицированный аденилил-(3'-5')-цитидин. Сам 1-метиладенозин может быть акцептором фос-

Производные гуадозина в реакциях образования межнуклеотидной связи

Донор фосфата	Рибонуклеаза	Синтезированный динуклеозидмонофосфат	Время синтеза, ч	Выход, %
m ¹ G>p	Pb ₂	m ¹ GpC	168	4
	CM-Pb ₂		364	3
	Pb ₁		144	23
m ⁷ G>p	C ₂	m ⁷ GpC	Не образуется	
	Pb ₂		264	21
	CM-Pb ₂		264	11
	Pb ₁ ; Pch ₁ ; C ₂		Не образуется	

Таблица 6

Производные инозина в реакциях образования межнуклеотидной связи

Субстрат	Фермент	Синтезированный олигонуклеотид	Время синтеза, ч	Выход, %
I>p	Pb ₂ Pb ₁ ; C ₂ ; Pch ₁ Pch ₁ ; C ₂	IpC	134	47
		IpCp	72	27
		IpC	120; 144; 48	45; 50; 53
pI>p	C ₂ Pcl ₂	IpApC	6; 6	6; 16
		pIpApC	5	9
I	A	ApI	1	4
IpApC	РНК-лигаза	pUpIpApC	6	12
pIpApC		GpCpUpUpIpApC	4	6

Таблица 7

Производные аденозина в реакциях образования межнуклеотидной связи

Субстрат	Фермент	Синтезированный олигонуклеотид	Время синтеза, ч	Выход, %
m ¹ A>p	Pb ₂ Pcl ₂ Pb ₂ CM-Pb ₂	m ¹ ApC	Не образуется	
m ² A		Arm ¹ A	1	14
m ⁶ A>p		m ⁶ ApC	133	8
m ⁶ A	Pcl ₂ Pb ₂	Arm ⁶ A	288	18
			1	3
i ⁶ A	ПНФаза <i>E. coli</i>	Api ⁶ A	11	1,5
ppi ⁶ A		ApCpi ⁶ A	0,5	<1
		(Ar) ₄ Api ⁶ A	Получили (Ar) ₄ ArA	

фата в присутствии другой малоспецифичной РНКазы Pcl₂ [11]. РНКазы Pb₂ образует межнуклеотидную связь, используя 6-метиладенозин-2',3'-дифосфат, причем более высокий выход получается с иммобилизованным ферментом. 6-Изопентениладенозин — менее эффективный акцептор фосфата, чем 6-метиладенозин, а в условиях ограниченного присоединения нуклеотидных остатков с помощью полинуклеотидфосфорилазы может происходить отщепление изопентенильной группы.

Итак, изучение «взаимоотношений» различных ферментов, используемых для синтеза, с модифицированными нуклеозидами и их производными показало, что во многих случаях метод комплексного использования ферментов нуклеинового обмена может быть успешно применен для получения фрагментов тРНК, содержащих модифицированные нуклеозидные остатки. Однако ряд факторов, и прежде всего субстратная специфичность ферментов, накладывает на этот метод определенные ограничения. В частности, как было видно из вышеизложенного, возникли трудности при работе с изопентениладенозином и некоторыми метилированными производными. Мы полагаем, что одним из путей преодоления этих трудностей будет включение в комплекс ферментов, применяемых для олигорибонуклеотидного синтеза, ферментов модификации рибонуклеиновых кислот.

Экспериментальная часть

В работе использовали натриевые соли 2',3'-циклофосфатов аденозина, уридина, цитидина, UDP, CDP, ADP, GDP, ATP; цитидин, уридин, аденозин; панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия); дигидроуридин, псевдоуридин, риботимидин, 5-метил-2'-дезоксцитидин, *n*-толуолсульфонат *N*-дикрогексил-*N'*-[β-(4-метилморфолинный)]этилкарбодимида (Serva, ФРГ), натриевую соль 2'(3')-фосфата псевдоуридина, калиевую соль 2'(3')-фосфата дигидроуридина, бариевую соль гуанозин-2',3'-циклофосфата, полинуклеотидфосфорилазу *M. luteus*, рибонуклеазу T₁ (Calbiochem, США), сефадекс G-10, DEAE-сефадекс A-25 (Pharmacia, Швеция), рибонуклеазы P_{b2}, P_{b1}, C₂, Pcl₂, Pch₁* (выделены и любезно предоставлены С. И. Безородовой и сотр. — ИВФМ), полинуклеотидфосфорилазу *E. coli* (НПО «Биолар»), РНК-лигазу фага T4 (НИКТИ БАН, Бердск, и НИО «Фермент», Вильнюс). Имобилизацию на СМ-целлюлозу рибонуклеаз P_{b2} и В₁ проводили как описано ранее [13, 14].

Бариевую соль G>р превращали в аммонийную обработкой дауэксом 50 W × 1 (NH₄⁺-форма); 2'(3')-фосфаты 1-метиладенозина, 6-метиладенозина, 1-метилгуанозина и 7-метилгуанозина получали как описано в работе [10], циклизуют их с помощью водорастворимого карбодимида по методу [15]. Получение 5'-фосфорилированных 2',3'-циклофосфатов описано в работе [16]. 2',3'-Циклофосфат инозина синтезировали по методу [17], 2',3'-циклофосфаты псевдоуридина и дигидроуридина — по [15]. 2',3'-Циклофосфат риботимидина получен фосфорилированием риботимидина с последующей циклизацией по методу [18]. Синтез 3-метилцитидина и 4-ацетилцитидина описан в работе [19], изоэнтенильные производные аденозина и его 5'-дифосфата получали в соответствии с методом [20].

Хроматографию и электрофорез на бумаге, микроколоночную хроматографию и УФ-спектрофотометрию проводили согласно [9, 10, 16, 19, 21]. Системы растворителей для хроматографии на бумаге: этанол — пропанол-2 — 25% аммиак — вода, 60 : 5 : 10 : 25 (А); пропанол-2 — 25% аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б); пропанол-1 — 25% аммиак — вода, 5 : 1 : 4 (В); этанол — 1 М ацетат аммония, 7 : 3 (Г). Гомогенность синтезированных олигонуклеотидов подтверждали хроматографией на бумаге в различных системах и микроколоночной хроматографией. Гидролиз олигонуклеотидов и анализ гидролизатов проводили как описано в [21, 22].

Синтез динуклеозидмонофосфатов, катализируемый рибонуклеазами.

Рибонуклеаза P_{b2}: A>р или другой нуклеозид-2',3'-циклофосфат и нуклеозид (начальная концентрация A>р 0,125–0,25 М при 3-кратном избытке акцептора) растворяли в 0,2 М фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем 20 ед. акт./мл** рибонуклеазы P_{b2}, и инкубировали раствор при ~0° С. В случае СМ-P_{b2} концентрация фермента составляла в среднем 15–20 мг/мл.

Рибонуклеаза Pcl₂: A>р и нуклеозид (начальная концентрация 0,125 и 0,375 М соответственно) растворяли в 0,01 М фосфатном буфере, рН 5,5, содержащем рибонуклеазу Pcl₂ (14 ед. акт./мл), и инкубировали при 0° С.

Рибонуклеаза А: U>р или C>р и нуклеозид (начальная концентрация N>р 0,05–0,25 М при 3–8-кратном избытке нуклеозида) растворяли в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,5, содержащем 160–400 мкг/мл фермента, и инкубировали при 0° С.

Гуанил-РНКазы T₁, C₂, P_{b1}, Pch₁: G>р или I>р и нуклеозид (начальная концентрация N>р 0,06–0,25 М при 3-кратном избытке нуклеозида) растворяли в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,0–7,8, содержащем 50–200 ед. акт./мл фермента, и инкубировали при 0° С.

Синтезы с участием псевдоуридина проводили в суспензии, состав которой соответствовал указанным концентрациям. Чтобы повысить растворимость псевдоуридина, синтез Срф проводили в 50% пиридине, добавляя панкреатическую рибонуклеазу, растворенную также в 50% пиридине так, чтобы концентрация фермента составляла 1 мг/мл. По тем же причинам (низкая растворимость i⁶A в водном буфере) Ari⁶A синтезировали с рибонуклеазой P_{b2} в смеси 0,2 М фосфатного буфера и диметилформамида (4 : 1).

Как правило, объем реакционной смеси составлял 0,1 мл; компоненты реакционных смесей обычно разделяли электрофорезом на бумаге, а затем хроматографией в системах А, Б, В или Г. Препаративные синтезы проводили как описано в работах [10, 21, 23].

Синтез тринуклеозиддифосфатов с гуанил-РНКазами проводили в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,0 [23], или 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 8,0 [24], при 0° (кроме двух случаев (табл. 2)) с концентрацией ферментов 4–6 ед. акт./мл при начальной концентрации G>р или I>р 0,02–0,1 М и 5–8-кратном избытке динуклеозидмонофосфата-акцептора (за исключением синтезов с рG>р и рI>р, когда концентрация динуклеозидмонофосфата составляла 0,01 М при 4-кратном избытке донора).

Синтез тринуклеозиддифосфатов с помощью полинуклеотидфосфорилаз проводили в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 9,0, содержащем 0,05 М EDTA, 0,01 М MgCl₂ при 37° С и начальной концентрации акцептора фосфата 0,01 М. Концентрация ррG — 0,01 М, ррА — 0,005 М, а начальную концентрацию ррU и ррC меняли от 0,005 до 0,01 М в зависимости от того, сколько (один или два) нуклеотидных остатков

* В настоящее время рибонуклеазы P_{b2}, P_{b1} и C₂ выпускаются НПО «Биолар» (г. Олайне ЛатвССР) [12].

** За единицу активности фермента принимали количество РНКазы, способное расщеплять при 37° С 1 мкмоль C>р за 1 мин при рН 5,2 (P_{b2}), 1 мкмоль A>р за 1 мин при рН 7,0 (СМ-P_{b2}) или 1 мкмоль G>р за 30 мин при рН 7,8 (гуанил-РНКазы).

требовалось присоединить к праймеру. Концентрация ППФаз в смеси: *M. luteus* — 6 мг/мл, *E. coli* — 30 ед./мл.

Стандартный объем реакционной смеси составлял 0,1–0,5 мл; разделение компонентов реакционной смеси проводили хроматографией на бумаге в системе А с последующим электрофорезом на бумаге и рехроматографией в системе Г.

Олигонуклеотиды, синтезированные в препаративных количествах, на последней стадии обычно очищали геле-фильтрацией на сефадексе G-10 и лиофилизовали. *Синтези РНК-лигазой* олигорибонуклеотидов, содержащих модифицированные нуклеозиды, проводили как описано в работах [9, 21].

Идентификацию продуктов олигонуклеотидного синтеза осуществляли стандартными способами, расщепляя олигонуклеотиды рибонуклеазами различной специфичности и анализируя гидролизаты хроматографией на бумаге и УФ-спектрофотометрией.

Авторы сердечно благодарят С. И. Безбородову за ферментные препараты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Modified nucleosides and cancer/Ed. Nass G. B.: Springer Verlag, 1983.
2. *Starzyk R.* // TIBS. 1984. V. 8. № 9. P. 333–334.
3. *Kersten H.* // In: Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol./Eds Cohn W., Moldave K. Orlando: Acad. Press, 1984. V. 31. P. 59–144.
4. *Ohtsuka E., Tanaka Sh., Tanaka T., Miyake T., Markham A. F., Nakagawa E., Wakabayashi T., Taniyama Y., Nishikawa S., Fukumoto R., Uemura H., Doi T., Tokunaga T., Ikehara M.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 9. P. 5493–5497.
5. *Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Хабарова М. И.* // Молекулярн. биология. 1984. Т. 18. № 5. С. 1181–1193.
6. *Sprinzl M., Moll J., Meissner F., Hartmann T.* // Nucl. Acids Res. 1985. A supplement to v. 13. P. r1–r50.
7. *Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А.* // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1505–1515.
8. *Uhlenbeck O. C., Gumpert R. I.* // The enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.: Acad. Press, 1982. V. 15. Part B. P. 31–58.
9. *Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А.* // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 220–229.
10. *Соболева И. А., Хабарова М. И., Женодарова С. М.* // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 1. С. 36–42.
11. *Гуляева В. И.* Специфичность трансферазного этапа реакции, катализируемой рибонуклеазами грибов, и синтез олигорибонуклеотидов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пушино: ИБФМ АН СССР, 1980. С. 14.
12. *Кнорре Д. Г., Вееньяминова А. Г., Женодарова С. М.* // Молекулярн. биология. 1985. Т. 19. № 6. С. 1703–1706.
13. *Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г.* // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 5. С. 736–742.
14. *Шарилова Ф. Р., Балабан Н. П., Рязанов С. М., Лещинская И. Б., Хабарова М. И., Женодарова С. М.* // Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 505–510.
15. *Naylor R., Gilham P. T.* // Biochemistry. 1966. V. 5. № 8. P. 2722–2727.
16. *Женодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г.* // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1516–1521.
17. *Попомарева В. М., Женодарова С. М.* // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1972. № 11. С. 2632.
18. *Holy A., Bald R.* // Collect. Czech. Chem. Commun. 1971. V. 36. № 8. P. 2809–2823.
19. *Масленникова Т. А., Седелникова Э. А., Клягина В. П., Женодарова С. М.* // Молекулярн. биология. 1973. Т. 7. № 1. С. 36–41.
20. *Grimm W., Leonard N.* // Biochemistry. 1967. V. 6. № 12. P. 3625–3631.
21. *Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М.* // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 4. С. 524–533.
22. *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.
23. *Женодарова С. М., Смолянинова О. А., Соболева И. А., Хабарова М. И.* // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1023–1030.
24. *Женодарова С. М., Гуляева В. И., Безбородова С. И.* // Биоорг. химия. 1977. Т. 3. № 11. С. 1475–1478.

Поступила в редакцию
8.XII.1986

ENZYMATIC INCORPORATION OF MODIFIED NUCLEOSIDES INTO OLIGORIBONUCLEOTIDES

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SEDELNIKOVA E. A.,
SMOLYANINOVA O. A., SOBOLEVA I. A., KHABAROVA M. I.,
GULYAEVA V. I., FROLOVA N. M.

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

Behaviour of modified nucleosides, tRNA components, and their analogues has been studied in the internucleotide bond formation catalysed by ribonucleases of various substrate specificity, polynucleotide phosphorylases, and T4 RNA ligase and the results are summarised in this paper. Pseudouridine, dihydrouridine, ribothymidine, 5-methylcytidine, inosine, and 6-methyladenosine can participate in the reaction of internucleotide bond formation in the presence of most ribonucleases used, viz. Pb₂, Pcl₂, Pb₁, Pch₁, C₂, T₁, pancreatic RNase. 3-Methylcytidine and 4-acetylcytidine form internucleotide bond (as phosphate acceptors) usually by means of guanyl-specific ribonucleases, whereas 4-methyladenosine is incorporated with ribonuclease Pcl₂. 7-Methylguanosine and 4-methylguanosine 2',3'-cyclophosphates can be used as phosphate donors in the presence of ribonuclease Pb₂; in the similar enzymatic reaction 6-isopentenyladenosine is an uneffective acceptor.