



УДК 547.963.3

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И НУКЛЕОТИДОПЕПТИДЫ

XXXI. НАРАЩИВАНИЕ ПЕПТИДНОГО И ОЛИГОНУКЛЕОТИДНОГО
ФРАГМЕНТОВ В НУКЛЕОТИДИЛ-(P→N)-ПЕПТИДАХ.
ВЛИЯНИЕ УСЛОЖНЕНИЯ ЭТИХ ФРАГМЕНТОВ НА ХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА НУКЛЕОТИДОПЕПТИДОВ *

*Юодка В. А., Лиоранчайте Л. Э., Кирвялене В. А.,
Ференцайте Р. С.*

Вильнюсский государственный университет им. В. Капсукаса

Путем соединения сложных эфиров аминокислот (пептидов) с нуклеотидами (олигонуклеотидами) и удлинения пептидного или олигонуклеотидного фрагментов в готовой нуклеотидил-(P→N)-аминокислоте синтезировали ряд сложных эфиров нуклеотидил(олигонуклеотидил)-(P→N)-аминокислот (пептидов) — моделей природных нуклеотидопептидов. Установлено, что удлинение пептидных и частично олигонуклеотидных цепей в нуклеотидил-(P→N)-аминокислотах стабилизирует фосфоамидную связь по отношению к кислоте и гидросиламину. Показано, что стабильность фосфоамидной связи зависит не только от длины пептидных и олигонуклеотидных цепей, но и от их аминокислотного и нуклеотидного состава. Исследовано действие проназы, карбоксипептидазы, панкреатической рибонуклеазы и фосфодиэстераз — наиболее часто используемых ферментов для определения структуры природных нуклеотидопептидов, на модели и установлены продукты их действия.

Почти все нуклеиновые кислоты свои функции проявляют в виде нуклеопротеидов. В большинстве случаев связь между нуклеиновыми кислотами и белками в нуклеопротеидах нековалентная. Однако в последнее время накапливаются данные, указывающие, что при структурировании и функционировании некоторых нуклеиновых кислот и белков образуются нуклеиново-белковые комплексы, в которых нуклеиновые кислоты и белки или их составные части соединены между собой ковалентными связями. Такие соединения называют природными нуклеотидопептидами.

Нуклеотид-белковые комплексы с ковалентной связью между фрагментами образуются при функционировании ДНК-лигазы [2, 3], РНК-лигазы [1, 4], глутаминсинтетазы [5, 6], UMP-галактозо-1-фосфат-уридилтрансферазы [7], AMP-аспартаткиназы [8], аминоксил-тРНК-синтетазы [9], РНК-полимеразы [10]. В настоящее время выделен ряд ДНК-[11—21] и РНК-белковых комплексов [22—27], в которых белок ковалентно присоединен к 3'- или 5'-концам нуклеиновых кислот.

В литературе встречается предположение [16, 18, 28], что в случае ДНК из аденовирусов, из вирусов SV 40 и других объектов белки присоединяются к нуклеиновым кислотам ковалентно с помощью фосфоамидной связи. Это предположение основывается на том, что комплексы белков с нуклеиновыми кислотами устойчивы в щелочи, гидролизуются кисло-

* Сообщение XXXI — см. [1].

Соединение	Выход, %	R_f в системе				U_{pN} pH 7,5	Соотношение основание — фосфор — амино- кислота
		А	Б	В	Г		
(EtO-Ala)-pU (I)	100	0,48	0,71	0,59	—	0,54	1:1,06:1,08
(EtO-Phe)-pU (II)	100	0,54	0,78	—	—	0,55	1:0,94:1,21
(EtO-Ala-Ala)-pU (III)	97	0,48	0,73	0,59	—	0,52	1:1,11:2,07
(EtO-Leu-Ala)-pU (IV)	99	0,58	0,81	0,65	—	0,55	1:1,02:0,80:0,80
(EtO-Gly)-pT (V)	100	0,54	0,73	0,58	—	0,52	1:1,08:1,14
(EtO-Phe)-pT (VI)	90	0,72	0,76	—	—	0,50	
(EtO-Gly-Gly)-pT (VII)	100	0,61	0,79	0,62	—	0,52	1:1,12:1,91
(EtO-Phe-Gly)-pT (VIII)	91	0,66	0,82	0,83	—	0,49	1:1,03:1,17:1
(EtO-Phe)-pdTpdT (IX)	60	0,64	0,69	—	0,71	0,44	2,09:1:1
(EtO-Phe)-pdTpdTpdT (X)	44	0,56	—	—	0,61	0,53	2,85:1*:1:2,08 2*
dAp-(α -Lys) (XIII)	27	—	0,18	—	0,20	0,25	1:1,06:1,25
dAp-(ϵ -Lys) (XIV)	47	—	0,18	—	0,15	0,45	1:1,10:1,10
d(ApApAp)-(α -Lys) (XV)	12	—	—	—	0,11	0,80	0,9:2 3*
d(ApApAp)-(ϵ -Lys) (XVI)	40	—	—	—	0,17	0,90	0,93:2 3*
(EtO-Phe)-pUpC (XVII)	27	0,40	—	—	—	0,90	1:1,15 4*
(EtO-Ala-Phe)-pU (XVIII)	35	0,58	0,85	0,69	—	0,52	1:1,02:0,88:1,03
(EtO-Ala-Ala-Ala-Ala)-pU (XIX)	38	0,53	0,76	—	—	0,49	1:1,10:4,26
(EtO-Val-Ala-Leu-Ala)-pU (XX)	76	0,72	0,87	0,76	—	0,53	1:1,19:1,12:1,12:2,12
(EtO-Phe-Gly-Gly)-pdT (XXI)	36	0,68	0,83	0,83	—	0,50	1:1,05:1,19:1,93

* Соотношение основание — аминокислота.

2* Соотношение (EtO-Phe)-pdT — pdT после действия фосфодиэстеразы из аминокислотного яда.

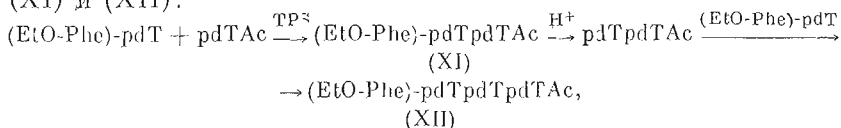
3* Соотношение dAp-(Lys) — dAp после действия фосфодиэстеразы из селенита.

4* Соотношение (EtO-Phe)-pUpC — C после действия панкреатической рибонуклеазы.

той. Отмечено, что в некоторых случаях обсуждаемые природные нуклеотидопептиды устойчивы по отношению к специфическому агенту фосфоамидной связи — гидроксилламину. Мы предполагаем, что эффективность действия химических агентов на нуклеотидопептиды должна зависеть от сложности и структурной организации молекулы. Ранее проведенные исследования показали, что фосфоамидная связь в синтетических нуклеотидопептидах устойчива в щелочной среде, стабилизируется при усложнении пептидного фрагмента [29, 30]. Однако систематических исследований по этим вопросам мало, а статистически достоверных данных в литературе нет.

В настоящей работе описывается синтез сложных модельных нуклеотидил(олигонуклеотидил)-(P \rightarrow N)-аминокислот (пептидов) и исследование их взаимодействия с кислотой, щелочью, гидроксилламином, проназой, карбоксипептидазой, некоторыми фосфодиэстеразами, нуклеазой, наиболее часто используемыми при установлении структуры природных нуклеотидопептидов. Установлено влияние усложнения пептидных и нуклеотидных фрагментов на устойчивость фосфоамидной связи по отношению к вышеуказанным агентам. Предварительные данные этой работы опубликованы в работах [31, 32].

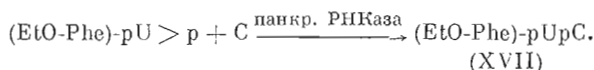
Синтез сложных эфиров нуклеотидил(олигонуклеотидил)-(P \rightarrow N)-аминокислот (пептидов) осуществляли путем непосредственного соединения отдельных фрагментов между собой или наращиванием пептидных или олигонуклеотидных цепей в готовой нуклеотидил-(P \rightarrow N)-аминокислоте (пептиде). Первым способом, используя ДСС, синтезировали нуклеотидные и олигонуклеотидные аналоги аминокислот и пептидов (I) — (X) (см. табл. 1) [32]. Нарачивая олигонуклеотидную цепь в готовом аминокислотном производном тимидиловой кислоты, синтезировали соединения (XI) и (XII):



что исключает стадию синтеза pdTpdT и pdTpdTpdT.

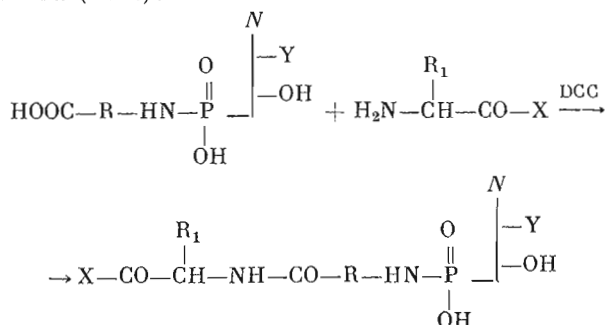
Лизинные нуклеотидные и олигонуклеотидные производные (XIII)–(XVI) (см. табл. 1) синтезировали методом смешанных ангидридов [33]. В реакции со смешанными ангидридами нуклеотидов (олигонуклеотидов) принимали участие как α -, так и ϵ -аминогруппы лизина. При pH 10 и температуре 37° С преимущественно получали N^ε-аналоги.

Этиловый эфир цитидил- (5'→3')-уридил- (5'→N)-фенилаланина (XVII) синтезировали с помощью панкреатической рибонуклеазы из этилового эфира 2',3'-циклофосфоуридил- (5'→N)-D,L-фенилаланина и цитидина. Ранее для подобных целей была использована рибонуклеаза T₁ [34].



Действие панкреатической рибонуклеазы на соединение (XVII) приводит к (EtO-Phe)-pUp и C в соотношении 1:1,15. После обработки (EtO-Phe)-pUp щелочной фосфатазой получили (EtO-Phe)-pU.

Для синтеза нуклеотид- (5'→N)-пептидов с более длинной пептидной цепочкой мы разработали метод постепенного наращивания пептидной цепи. Реакцию нуклеотид- (5'→N)-аминокислот (пептидов) со сложными эфирами аминокислот (пептидов) проводили в пиридине или диметилформамиде с помощью DCC. Таким образом синтезировали этиловые эфиры уридил- (5'→N)-D,L-фенилаланил-D,L-аланина (XVIII), -D,L-аланил-D,L-аланил-D,L-аланил-D,L-аланина (XIX), -D,L-аланил-D,L-лейцил-D,L-аланил-D,L-валина (XX), дезокситимидил- (5'→N)-глицил-глицил-D,L-фенилаланина (XXI).



(XVIII) N = -U, R = -CH(CH₂C₆H₅)-, R₁ = -CH₃, X = -OC₂H₅, Y = -OH;

(XIX) N = -U, R = -CH(CH₃)CONHCH(CH₃)-, R₁ = -CH₃, X = -NHCH(CH₃)COOC₂H₅, Y = -OH;

(XX) N = -U, R = -CH(CH₃)CONHCH(C₄H₉)-, R₁ = -CH₃, X = -NHCH(C₃H₇)COOC₂H₅, Y = -OH;

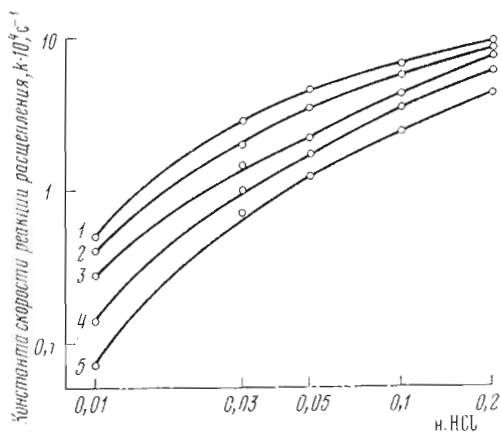
(XXI) N = -T, R = -CH₂CONHCH₂-, R₁ = -CH₂C₆H₅, X = -OC₂H₅, Y = -H.

Необходимо отметить, что исходным соединением в данной реакции целесообразно использовать нуклеотид- (5'→N)-дипептиды, так как в случае нуклеотид- (5'→N)-аминокислот из-за внутримолекулярного катализа α -карбоксильной группы в реакционной смеси образуется нуклеозид [35].

Таблица 2

Периоды полураспада этиловых эфиров нуклеотид- (5'→N)-пептидов
0,05 н. HCl, 37° С

Соединение	$\tau_{1/2}$, мин	Соединение	$\tau_{1/2}$, мин
(EtO-Ala)-pU	25±7	(EtO-Val-Ala-Leu-Ala)-pU	92±8
(EtO-Ala-Ala)-pU	33±6	(EtO-Gly)-pdT	8±0,5
(EtO-Ala-Ala-Ala-Ala)-pU	66±6	(EtO-Phe-Gly)-pdT	18±1
(EtO-Leu-Ala)-pU	52±9	(EtO-Phe-Gly-Gly)-pdT	22±2



Гидролитическая устойчивость этиловых эфиров уридил- $(5' \rightarrow N)$ -пептидов в зависимости от pH (37°C , 1 ч): 1 — (EtO-Ala)-pU; 2 — (EtO-Ala-Ala)-pU; 3 — (EtO-Leu-Ala)-pU; 4 — (EtO-Ala-Ala-Ala)-pU; 5 — (EtO-Val-Ala-Leu-Ala)-pU

стабилизирует фосфоамидную связь во всем кислотном интервале (рис. 1). Еще нагляднее эта тенденция наблюдается при сравнении периодов полураспада этиловых эфиров нуклеотидил- $(5' \rightarrow N)$ -пептидов, которые приведены в табл. 2. Интересно, что на устойчивость фосфоамидной связи оказывает влияние не только удлинение пептида, но и его аминокислотный состав. Мы предполагаем, что все эти стабилизирующие влияния связаны со стерическим эффектом пептидов.

Для выяснения влияния усложнения олигонуклеотидной цепи в олигонуклеотидил- $(P \rightarrow N)$ -аминокислотах мы исследовали гидролитическую устойчивость (EtO-Phe)-pdT, (EtO-Phe)-pdTpdT, (EtO-Phe)-d(pTpTpT), (EtO-Phe)-pU, (EtO-Phe)-pUpC, dAp-(α -Lys), d(ApApAp)-(α -Lys), dAp-(ϵ -Lys) и d(ApApAp)-(ϵ -Lys). Периоды полураспада этих соединений в кислой среде приведены в табл. 3.

Нетрудно заметить, что удлинение олигонуклеотидной цепи в олигонуклеотидил- $(P \rightarrow N)$ -аминокислотах лишь незначительно стабилизирует фосфоамидную связь. Исключение составляет (EtO-Phe)-pUpC, который почти в 3 раза стабильнее, чем (EtO-Phe)-pU. Интересно, что в кислотных гидролизатах dAp-(α -Lys) и d(ApApAp)-(α -Lys) кроме dAp и d(ApApAp) обнаружили dA и d(ApApA) соответственно. Такой путь расщепления фосфоамидного центра обусловлен свободной карбоксильной группой лизина [35].

Все эти результаты позволяют сделать вывод, что гидролитическая устойчивость фосфоамидной связи в природных нуклеотидопептидах будет зависеть от длины и состава пептидного и нуклеотидного фрагментов. Фосфоамидная связь должна гидролизоваться лишь в довольно жестких кислотных условиях и быть стабильной в щелочной среде. Однако последнее утверждение не является правилом. Ранее было показано [29], что фосфоамидный центр, в образовании которого принимают участие оксиаминокислоты, лабилен и в щелочной среде. Таким образом, лабильность природных нуклеотидопептидов в щелочной среде не исключает возможность фосфоамидной связи между белковым и нуклеиновым фрагментами.

Известно [36, 37], что гидроксилламин в определенных условиях специфически расщепляет фосфоамидную связь в нуклеотидил- $(5' \rightarrow N)$ -аминокислотах. Этот метод нашел применение для установления структуры ДНК-лигазного-аденилатного комплекса [2]. Предполагают [16, 18, 28], что в случае ДНК из аденовирусов, из вирусов SV40 белки присоединены к ДНК с помощью фосфоамидной связи. Однако гидроксилламин не рас-

Структуру большинства полученных соединений устанавливали, определив соотношение основание — фосфор — аминокислота после полного их кислотного гидролиза (6 н. HCl, 105°C , 24 ч), а в случае олигонуклеотидил- $(P \rightarrow N)$ -аминокислот — и по соотношению нуклеотид — нуклеотидил- $(P \rightarrow N)$ -аминокислота после гидролиза фосфодиэстеразой из змеиного яда или селезенки. Данные анализа структуры синтезированных соединений и некоторые другие их характеристики приведены в табл. 1.

Мы исследовали некоторые свойства синтезированных соединений. Фосфоамидная связь стабильна в щелочной среде, а удлинение пептидного фрагмента ста-

Периоды полураспада нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(P→N)-аминокислот
0,1 н. HCl, 37° С

Соединение	$\tau_{1/2}$, мин	Соединение	$\tau_{1/2}$, мин
(EtO-Phe)-pdT (EtO-Phe)-pdTpdT (EtO-Phe)-pdTpdTpdT (EtO-Phe)-pU* (EtO-Phe)-pUpC* dAp-(ϵ -Lys)	36±6 до pdT 38±6 до pdTpdT 50±6 до pdTpdTpdT 44±5 до pU 123±10 до pUpC 102±5 до dAp	d(ApApAp)-(ϵ -Lys) dAp-(α -Lys) d(ApApAp)-(α -Lys)	111±9 до d(ApApAp) 44±4 до dAp 47±4 до dA 61±10 до d(ApApAp) 61±10 до d(ApApA)

* Определены в 0,05 н. HCl, 37° С.

Т а б л и ц а 4

Периоды полураспада нуклеотидил(олигонуклеотидил)-(P→N)-аминокислот
(пептидов) под действием
2 М NH₂OH, pH 4,75 (37° С)

Соединение	$\tau_{1/2}$, мин	Соединение	$\tau_{1/2}$, мин
(EtO-Ala)-pU (EtO-Ala-Ala)-pU (EtO-Leu-Ala)-pU (EtO-Val-Ala-Leu-Ala)-pU (EtO-Phe)-pdT*	11±1,5 32±6 59±9 78±6 135±15	(EtO-Phe)-pdTpdTpdT* d(ApApAp)-(α -Lys)* dAp-(α -Lys)* (α -Lys)-pdT*	184±27 256±54 181±24 199±23

* Определены в 4 М NH₂OH, pH 4,75 (50° С).

щепляет эту связь. Мы исследовали влияние усложнения пептидного и олигонуклеотидного фрагментов в олигонуклеотидил-(P→N)-пептидах на эффективность действия гидроксилamina. Полученные результаты приведены в табл. 4.

Из полученных данных видно, что усложнение пептидного фрагмента в уридилил-(P→N)-пептидах стабилизирует фосфоамидную связь и к действию гидроксилamina. Удлинение олигонуклеотидной цепи практически не влияет на эффективность действия гидроксилamina. Необходимо отметить, что особенно стабильна фосфоамидная связь в случае олигодезоксинуклеотидил-(P→N)-аминокислот. Все это говорит о том, что для расщепления фосфоамидной связи в природных нуклеотидопептидах требуются более жесткие условия, чем те, которые применяли многие авторы [16, 18, 28].

Установить природу химической связи, соединяющей нуклеиновую кислоту с белком, в сложных природных нуклеотидопептидах трудно. Поэтому их необходимо расщепить до более простых структур, не затрагивая связь, соединяющую отдельные фрагменты. Для такой цели используются нуклеазы и протеазы. Однако неясно, как будет влиять нуклеотидный фрагмент на действие протеаз и полипептидный фрагмент на действие нуклеаз. Мы исследовали гидролитическую активность проназы В, карбоксипептидазы А, панкреатической нуклеазы и фосфодиэстераз по отношению к некоторым нуклеотидил(олигонуклеотидил)-(5'→N)-пептидам и их этиловым эфирам. Оказалось, что фосфодиэстераза из селезенки полностью гидролизует d(ApApAp)-лизина (XV, XVI) до dAp и dAp-лизинов, а фосфодиэстеразы из змеиного яда — (EtO-Phe)-pdTpdTpdT (X) до pdT и (EtO-Phe)-pdT (см. табл. 1). Фосфодиэстеразы использовались для определения структуры других олигонуклеотидаминокислот и ранее [30]. Панкреатическая рибонуклеаза расщепляет (EtO-Phe)-pUpC (XVII)

до (EtO-Phe)-pUp и С (см. табл. 1). Это говорит о том, что присоединение аминокислот к 3'- или 5'-концу олигонуклеотидной цепи не влияет на эффективность действия указанных ферментов и они могут быть применены для установления структуры природных нуклеотидопептидов. Недавно это было показано на НК-белковом комплексе из полиовируса [24–26]. Инкубация (EtO-Val-Ala-Leu-Ala)-pU с проназой В (24 ч, 37°С) привела к 34% (HO-Val-Ala-Leu-Ala)-pU и 11% (HO-Ala)-pU. Дипептидный аналог (EtO-Leu-Ala)-pU в подобных условиях расщепляется на 25% до (HO-Leu-Ala)-pU и на 12% до (HO-Ala)-pU, а (EtO-Phe-Gly-Gly)-pdT — на 7% до (HO-Phe-Gly-Gly)-pdT и на 43% до (HO-Gly-Gly)-pdT.

Все эти данные говорят о том, что проназа В имеет эстеразную активность, не имеет фосфоамидазной активности и что ее действие на НК-белковые комплексы приведет к смеси НК-пептидов, различающихся длиной пептидной цепи. Разделение НК-пептидов неизбежно приведет к потере и «размазыванию» вещества, которого обычно и так очень мало. Нам казалось, что последующее действие карбоксипептидазы на НК-пептиды должно привести к НК-аминокислоте. Мы исследовали действие карбоксипептидазы А (24 ч, 37°С) и обнаружили, что (HO-Phe-Gly)-pdT расщепляется до (HO-Gly)-pdT на 51%, (HO-Leu-Ala)-pU до (HO-Ala)-pU на 32% и (HO-Val-Ala-Leu-Ala)-pU до (HO-Ala)-pU на 20%. Известно, что карбоксипептидаза отщепляет лишь *L*-аминокислоту с С-конца пептида. Неполное расщепление нуклеотидил-(5'→N)-пептидов с помощью карбоксипептидазы А обусловлено, по-видимому, тем, что были использованы *D*, *L*-пептиды.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что присоединение нуклеотида к пептиду не предотвращает действия вышеуказанных протеаз и они могут быть успешно использованы для установления структуры природных нуклеотидопептидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезокситимидин, триизопробилбензосульфохлорид (TPS) (Merck, ФРГ), дезоксиаденозин, анизоилдифенилхлорметан (Sigma, США), уридин, цитидин, динатриевую соль уридин-5'-монофосфата, панкреатическую рибонуклеазу, карбоксипептидазу А, *D*, *L*-аланил-*D*, *L*-аланин, глицил-глицин, глицил-*D*, *L*-фенилаланин, *D*, *L*-аланил-*D*, *L*-валин, *D*, *L*-аланил-*D*, *L*-лейцин (Reanal, Венгрия), *N*, *N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC) (Ferk Berlin, ФРГ), фосфодиэстеразу из змеиного яда, фосфодиэстеразу из селезенки, щелочную фосфатазу (Worthington, США), проназу В (Calbiochem, США), гидроксиламин солянокислый (Chemapol, Чехословакия). Дезокситимидил-5'-монофосфорная кислота, дезоксиаденозин-5'-монофосфорная кислота и аминокислоты были отечественного производства. Соединения (I)–(X) синтезировали по методикам работ [32, 38]. Нуклеотидил-(5'→N)-аминокислоты (пептиды) со свободной карбоксильной группой получали из сложноэфирных аналогов с помощью щелочного гидролиза [31]. По описанным методикам синтезировали дезоксиаденозин-3'-монофосфат [39], ангидрид дезоксиаденозин-3'-монофосфата и мезитилкарбоновой кислоты [33], уридин-3',5'-дифосфат [40], 3'-О-ацетилдезокситимидил-5'-фосфат [41], этиловый эфир 2',3'-циклофосфоуридил-5'→N)-фенилаланина [42], d(ApApA) [43], d(ApApAp) [39], сложные эфиры аминокислот и пептидов [44]. Гидролиз сложных эфиров нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(P→N)-аминокислот (пептидов) при различных значениях pH проводили согласно [35], реакцию с гидроксиламином — согласно [37]. Периоды полураспада соединений при определенных pH и температуре определяли по формуле: $\tau_{1/2} = \ln 2/k$, где k — константа скорости реакции первого порядка. Выходы синтезированных соединений (I) — (XXI) определяли спектрофотометрически. Структуру нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(P→N)-аминокислот (пептидов) дока-

звали определением соотношения основание — фосфор — аминокислота после полного кислотного гидролиза [35]. Олигонуклеотидил-(P→N)-аминокислоты расщепляли также фосфодиэстеразами из змеиного яда и селезенки по [45], панкреатической рибонуклеазой по [46] и определяли соотношение нуклеотид — нуклеотидил-(P→N)-аминокислота. Нуклеотидил- и олигонуклеотидил-(P→N)-аминокислоты (пептиды) выделяли с помощью препаративной хроматографии на бумаге марки FN-1, FN-7 (быстрая, Filtrak, ГДР) и в тонком слое силикагеля Silpearl UV 254 (Sklarny Kavalier, Чехословакия). Использовали следующие системы растворителей: изопропиловый спирт — конц. аммиак — вода, 7 : 1 : 2, А; этиловый спирт — 1 М уксуснокислый аммоний, 7 : 3, Б; *трет*-бутиловый спирт — вода, 7 : 3, В; *n*-пропиловый спирт — конц. аммиак — вода, 55 : 10 : 35, Г; этиловый спирт — 0,5 М уксуснокислый аммоний (рН 3,5), 5 : 2, Д. Электрофорез на бумаге марки FN-16 (медленная, Filtrak, ГДР) проводили в 0,05 М триэтиламмонийбикарбонатном буфере, рН 7,5. Использовали вертикальный высоковольтный прибор фирмы Labor (Венгрия).

Дезоксиаденилил-(3'→N)-D,L-лизина (XIII, XIV). Раствор 0,1 ммоль ангидрида дезоксиаденозин-3'-монофосфата и мезитиленкарбоновой кислоты в 2 мл смеси пиридина и воды (1 : 5) с помощью 1 М NaOH доводили до рН 10. В реакционную смесь добавляли 146 мг (1 ммоль) гидрохлорида *D,L*-лизина и инкубировали 48 ч при 37° С. Продукты реакции выделяли с помощью препаративной бумажной хроматографии в системе В. Выходы этиловых эфиров дезоксиаденилил-(3'→N^α)-*D,L*-лизина и дезоксиаденилил-(3'→N^ε)-*D,L*-лизина составляют 27 и 47% соответственно. Гидролиз этих соединений 6 н. HCl (5 ч при 105° С) привел к аденину и лизину в соотношении 1 : 1,25 для дезоксиаденилил-(3'→N^α)-*D,L*-лизина и 1 : 1,1 для N^ε-аналога.

Дезоксиаденилил-(3'→5')-дезоксиаденилил-(3'→5')-дезоксиаденилил-(3'→N)-лизина (XV, XVI) получали аналогично соединениям (XIII) и (XIV). Некоторые их характеристики и доказательство структур приведены в табл. 1.

Этиловый эфир цитидилл-(5'→3')-уридилл-(5'→N)-D,L-фенилаланина (XVII). К 50 ОЕ₂₆₀ этилового эфира 2',3'-циклофосфоуридилл-(5'→N)-*D,L*-фенилаланина и 5 мг (20 мкмоль) цитидина прибавляли 0,06 мл раствора панкреатической рибонуклеазы (0,16 мг/мл) в 0,05 М трис-HCl-буфере, рН 7,5, и инкубировали 20 ч при 0° С. Продукт реакции выделяли с помощью БХ в системе растворителей А. Зону с *R_f* 0,4 элюировали водой. Действие панкреатической рибонуклеазы на (EtO-Phe)-pUpC привело к (EtO-Phe)-pUp и С в соотношении 1 : 1,15. Инкубация (EtO-Phe)-pUp с щелочной фосфатазой привела к (EtO-Phe)-pU.

Этиловый эфир 3'-О-ацетилдезокситимидилл-(5'→3')-дезокситимидилл-(5'→N)-D,L-фенилаланина (XI). К раствору 0,05 ммоль триоктиламмониевой соли этилового эфира дезокситимидилл-(5'→N)-*D,L*-фенилаланина в 1 мл абс. пиридина добавляли 0,1 ммоль пиридиниевой соли 3'-О-ацетилдезокситимидин-5'-монофосфата и упаривали с абс. пиридином (5×5 мл). Остаток растворяли в 8 мл абс. пиридина, добавляли 0,25 ммоль триизопропилбензолсульфохлорида, упаривали до масла и оставляли на 5 ч при 20° С. Далее реакционную смесь хорошо охлаждали, прибавляли 1 мл 2 М диизопропилэтиламина в абс. пиридине и 3 мл воды и оставляли на 15 ч при 20° С. Реакционную смесь концентрировали до масла, добавляли 10 мл этилового спирта и упаривали (3×10 мл). Остаток растворяли в 0,5 мл смеси этиловый спирт — вода (1 : 1), наносили на пластинку с силикагелем (10×15 см, толщина слоя 3 мм) и хроматографировали в системе А. Вещество с *R_f* 0,45 элюировали 200 мл смеси этиловый спирт — вода (1 : 1). Получали 0,032 ммоль (EtO-Phe)-pdTpdTAc. Выход 65%. Некоторые характеристики соединения приведены в табл. 1.

5'-Фосфодезокситимидилл-(3'→5')-3'-О-ацетилдезокситимидин. К раствору 0,031 ммоль (EtO-Phe)-pdTpdTAc (XI) в 0,5 мл воды добавляли

0,5 мл 0,5 н. HCl и инкубировали 2 ч при 37° С. Реакционную смесь нейтрализовали 1М NaOH. Часть ее наносили на хроматографическую бумагу и хроматографировали в системе А. Зону с R_f 0,28 элюировали водой.

Этиловый эфир 3'-О-ацетилдезокситимидилил-(5'→3')-дезокситимидилил-(5'→3')-дезокситимидилил-(5'→N)-D,L-фенилаланина (XII). К раствору 5 мкмоль триоктиламмониевой соли тимидилил-(5'→N)-D,L-фенилаланина в 5 мл абс. пиридина добавляли 10 мкмоль пиридиниевой соли 5'-фосфодезокситимидилил-(3'→5')-3'-О-ацетилдезокситимидина и 35 мкмоль триизопропилбензосульфохлорида. Реакционную смесь концентрировали до масла и оставляли на 4,5 ч при 20° С. Далее поступали, как в случае синтеза соединения (XI). Продукт реакции (табл. 1) выделяли с помощью БХ в системе растворителей А. Зону с R_f 0,56 элюировали водой.

Этиловый эфир уридилил-(5'→N)-D,L-аланил-D,L-лейцил-D,L-аланил-D,L-валина (XX). К раствору 0,1 ммоль триоктиламмониевой соли уридилил-(5'→N)-D,L-аланил-D,L-лейцина и 1,5 ммоль этилового эфира D,L-аланил-D,L-валина в абс. диметилформамиде (3 мл) добавляли 0,4 ммоль (82,4 мг) дициклогексилкарбодимида. Реакцию проводили 24 ч при 37° С. Реакционную смесь хроматографировали на бумаге в системе А. Зону с R_f 0,72, поглощающую УФ-свет, вырезали, элюировали дистиллированной водой и элюат упаривали до концентрации, необходимой для дальнейшей работы. Выход 76%.

Аналогичным образом из уридилил-(5'→N)-D,L-фенилаланина и этилового эфира D,L-аланина получали этиловый эфир уридилил-(5'→N)-D,L-фенилаланил-D,L-аланина (XVIII), из уридилил-(5'→N)-D,L-аланил-уридилил-(5'→N)-D,L-аланил-D,L-аланил-D,L-аланил-D,L-аланина (XIX), из уридилил-(5'→N)-D,L-аланил-D,L-лейцина и этилового эфира D,L-аланил-D,L-валина — этиловый эфир уридилил-(5'→N)-D,L-аланил-D,L-лейцил-D,L-аланил-D,L-валина (XX), из дезокситимидилил-(5'→N)-глицил-глицина и этилового эфира D,L-фенилаланина — этиловый эфир дезокситимидилил-(5'→N)-глицил-глицил-D,L-фенилаланина (XXI) (см. табл. 1).

Расщепление этиловых эфиров нуклеотидил-(5'→N)-пептидов проназой В. Раствор 2 мг проназы В в 0,4 мл 0,02 М трис-HCl-буфера (рН 7,3) инкубировали 2 ч при 37° С. К 0,05 мл 0,006 М раствора исследуемого этилового эфира нуклеотидил-(5'→N)-пептида добавляли 0,05 мл 0,02 М трис-HCl-буфера (рН 7,3) и 0,02 мл раствора фермента. Реакцию проводили 22 ч при 37° С. Реакционную смесь хроматографировали на бумаге в системе А. Зоны, поглощающие УФ-свет, вырезали, элюировали водой и анализировали структуру соединений по [35].

Расщепление нуклеотидил-(5'→N)-пептидов карбоксипептидазой А. К 0,1 мл 0,006 М раствора исследуемого нуклеотидил-(5'→N)-пептида добавляли 0,2 мл 0,2 М NH₄HCO₃ (рН 8) и 0,025 мл суспензии карбоксипептидазы А (0,28 мкг фермента), инкубировали 24 ч при 37° С. Реакционную смесь хроматографировали на бумаге в системе А. Зоны, поглощающие УФ-свет, вырезали, элюировали водой и анализировали структуру соединений по [35].

ЛИТЕРАТУРА

1. Юодка Б. А., Снечук М. А., Янушовите Л. М., Маркуцкас А. Я. (1979) Биохимия, **44**, 599–604.
2. Gumpert I. R., Lehman I. R. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 2559–2563.
3. Soderhall S., Lindahl T. (1976) FEBS Lett., **67**, 1–8.
4. Cranston J. W., Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 7447–7456.
5. Shapiro B. M., Stadtman E. R. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 3769–3771.
6. Brown M. S., Segal A., Stadtman E. R. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **68**, 2949–2953.
7. Wong L. J., Sheu K. F. R., Lee S. L., Frey P. A. (1977) Biochemistry, **16**, 1010–1016.
8. Niles E. G., Westhead E. W. (1973) Biochemistry, **12**, 1732–1739.

9. Краевский А. А., Киселев Л. Л., Готтих Б. П. (1973) Молекулярн. биология, 7, 769-775.
10. Chelala C. A., Hirschbein L., Torres H. N. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 152-154.
11. Guiney D. G., Helinski D. R. (1975) J. Biol. Chem., 250, 8796-8803.
12. Novick R. (1976) J. Bacteriol., 127, 1177-1187.
13. Wang J. C. (1971) J. Mol. Biol., 55, 523-533.
14. Champoux J. J., Dulbecco R. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 143-146.
15. Ikeda J. E., Yudelevich A., Hurwitz J. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 2669-2673.
16. Kasamatsu H., Wu M. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 1945-1949.
17. Rekosh D. M. K., Russell W. C., Bellet A. J. D. (1977) Cell, 11, 283-295.
18. Padmanabhan R., Padmanabhan R. V. (1977) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 75, 955-964.
19. Hershey H. V., Werner D. (1976) Nature, 262, 148-150.
20. Дрыгин Ю. Ф., Богданов А. А., Прокофьев М. А. (1966) Химия природн. соедин., 218.
21. Бендик А., Розенкранц Г. (1965) Нуклеиновые кислоты, с. 245-257, «Мир», М.
22. Богданов А. А., Антонович Е. Г., Терганова Г. В., Прокофьев М. А. (1963) Докл. АН СССР, 150, 1373-1374.
23. Lee Y. F., Nomoto A., Wimmer E. (1976) in: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Davidson J. N., Cohn W. E., eds), vol. 19, pp. 89-96, Acad. Press, N. Y.
24. Ambros V., Baltimore D. (1978) J. Biol. Chem., 253, 5263-5266.
25. Rothberg P. G., Harris T. J. R., Nomoto A., Wimmer E. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 4868-4872.
26. Hruby D. E., Roberts W. K. (1978) J. Virology, 25, 413-415.
27. Sangar D. V., Rowlands D. J., Harris T. J. R., Brown F. (1977) Nature, 268, 648-650.
28. Champoux J. J. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 3800-3804.
29. Shabarova Z. A. (1970) in: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (Davidson J. N., Cohn W. E., eds), vol. 10, pp. 145-182, Acad. Press, N. Y.
30. Недбай В. К., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1972) Докл. АН СССР, 205, 1114-1116.
31. Юодка Б., Гульбинайте В. (1975) Научн. тр. вузов ЛитССР, «Химия», 17, 175-178.
32. Juodka B., Kirveliене V., Lioranчаite L. (1978) Nucleic Acids Res., Sp. publ., No. 4, s231-234.
33. Shumyantzeva V. V., Sokolova N. I., Shabarova Z. A. (1976) Nucleic Acids Res., 3, 903-916.
34. Громова Е. С., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1969) Докл. АН СССР, 186, 333-335.
35. Юодка Б., Саснаускене С. (1975) Научн. труды вузов ЛитССР, «Химия», 17, 169-175.
36. Рябова Т. С., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1965) Докл. АН СССР, 150, 1373-1374.
37. Юодка Б. А., Недбай В. К., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. (1969) Биохимия, 34, 849-852.
38. Юодка Б., Лиоранчаите Л., Япушоните Л., Саснаускене С. (1976) Биоорган. химия, 2, 1513-1519.
39. Баканова В. А., Сергеева Н. Ф., Джапаридзе И. Ш., Смирнов В. Д., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1975) Биоорган. химия, 1, 774-777.
40. Tener G. M. (1961) J. Amer. Chem. Soc., 83, 159-168.
41. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6212-6222.
42. Соловьева Л. Б., Преображенская Н. Н., Соколова Н. И., Шабарова З. А. (1967) Ж. общ. химии, 37, 431-437.
43. Caruthers M. H., Van De Sande J. H., Khorana H. G. (1972) J. Mol. Biol., 72, 375-405.
44. Гринштейн Дж., Винц М. (1965) Химия аминокислот и пептидов, с. 425-427, «Мир», М.
45. Razzell W. E., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 1770-1771.
46. Тихомирова-Сидорова Н. С., Устюжанин Г. Е., Коган Э. М. (1968) Ж. общ. химии, 38, 1491-1494.

Поступила в редакцию
25.I.1979

После доработки
14.V.1979

OLIGONUCLEOTIDES AND NUCLEOTIDEPEPTIDES
XXXII. ELONGATION OF THE PEPTIDE AND OLIGONUCLEOTIDE
FRAGMENTS IN NUCLEOTIDYL-(P→N)-PEPTIDES. THE EFFECT
OF THE FRAGMENT COMPLICATION ON THE CHEMICAL
PROPERTIES OF NUCLEOTIDEPEPTIDES

JUODKA B., LIORANČAITĖ L., KIRVELIENE V., FERENCAITE R.

V. Kapsukas State University, Vilnius

By means of adding the amino acid or peptide esters to nucleotides (oligonucleotides) and elongating the peptide and oligonucleotide fragments in the nucleotidyl-(P→N)-amino acid, a number of esters of nucleotidyl (oligonucleotidyl)-(P→N)-amino acids (peptides) were synthesized, which serve as a model of natural nucleotidepeptides. The elongation of the peptide and oligonucleotide chains in nucleotidyl-(P→N)-amino acids was shown to stabilize the phosphoamidate bond against the acid and hydroxylamine action. The stability of the phosphoamidate bond depends not only on the length of the peptide and the nucleotide chains but also on their amino acid and nucleotide composition. The action of pronase, carboxypeptidase, pancreatic ribonuclease and phosphodiesterase — the enzymes used most frequently for structure determination of natural nucleotidepeptides — was studied on the prepared model compounds and the products of their action were determined.
