



УДК 547.963.32'466.07

ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И НУКЛЕОТИДОПЕПТИДЫ.

XXXVIII.* СИНТЕЗ И СВОЙСТВА

НУКЛЕОТИДИЛ($P \rightarrow O$)АМИНОКИСЛОТ
(ПЕПТИДОВ) И ИХ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ

Юодка Б. А., Гирвялене В. А., Повиленис П. П.

*Вильнюсский государственный университет,
кафедра биохимии и биофизики*

Дициклогексилкарбодимидным и пирофосфатным методами синтезирован ряд сложных эфиров нуклеотидил($5' \rightarrow O$)оксиаминокислот (дипептидов). Исследование гидролитической устойчивости синтезированных соединений позволило установить, что фосфоэфирная связь устойчива в кислой и нейтральной среде и расщепляется в щелочной среде. Показано, что степень и механизм ее расщепления зависит от природы аминокислоты, содержащей гидроксильную группу, и от состояния ее карбоксильной группы. Химическими и ферментативными методами установлено, что сложные эфиры нуклеотидил($5' \rightarrow O$)оксиаминокислот (пептидов) в щелочной среде расщепляются по механизму β -элиминирования. Полученные данные могут быть полезны при исследовании структуры нуклеопротеидов и нуклеотид-белковых комплексов с ковалентной связью между компонентами.

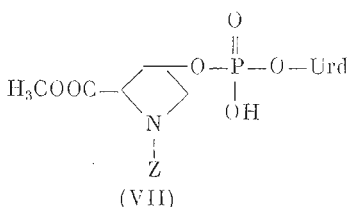
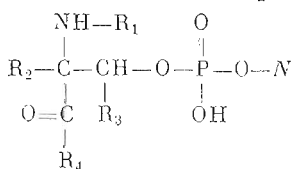
В последнее время из различных источников выделены РНК- и ДНК-белковые комплексы, в которых связь между компонентами ковалентная [2]. Для установления биологических функций таких смешанных биополимеров необходимо знать их тонкую структуру, в том числе природу связи между отдельными фрагментами. В настоящее время природа связи выяснена лишь в нескольких случаях [2]. Для решения этих проблем большую роль играет исследование свойств синтетических модельных соединений — нуклеотидопептидов, в которых нуклеотид или олигонуклеотид присоединены к аминокислоте (пептиду) с помощью ковалентной связи. В настоящее время довольно подробно изучены нуклеотидопептиды с фосфоамидной связью между компонентами [1, 3–5]. Показано, что гидролитическая устойчивость фосфоамидной связи зависит от природы аминокислоты и нуклеотида [5], от длины пептидной и нуклеотидной составов олигонуклеотидной цепей [3, 4], от функционального окружения фосфора [1, 5]. Разработан метод специфического расщепления фосфоамидной связи в нуклеотидопептидах [3], который нашел применение для установления структуры смешанных биополимеров [6, 7]. Свойства нуклеотидопептидов с фосфоэфирной связью между компонентами изучены очень мало [8, 9]. Интересно, что именно фосфоэфирная связь обнаружена в некоторых нуклеопротеидах и нуклеотид-белковых комплексах [2].

Целью настоящей работы явился синтез нуклеотидил($5' \rightarrow O$)оксиаминокислот (пептидов) и их сложных эфиров и исследование влияния природы аминокислоты, содержащей гидроксильную группу, состояния карбоксильной группы и длины пептидной цепи на эффективность и механизм расщепления фосфоэфирной связи. Предварительные данные части этой работы опубликованы ранее [9].

Синтез сложных эфиров, нуклеотидил($5' \rightarrow O$)аминокислот (дипептидов) осуществляли пирофосфатным [8] и дициклогексилкарбодимидным [9] методами путем непосредственного присоединения сложных эфиров аминокислот (дипептидов) к нуклеотиду. Более простым, дающим более высокие выходы, оказался дициклогексилкарбодимидный метод, который мы и использовали для препаративных целей. Нуклеотид и соответствующую

* Сообщение XXXVII см. [1].

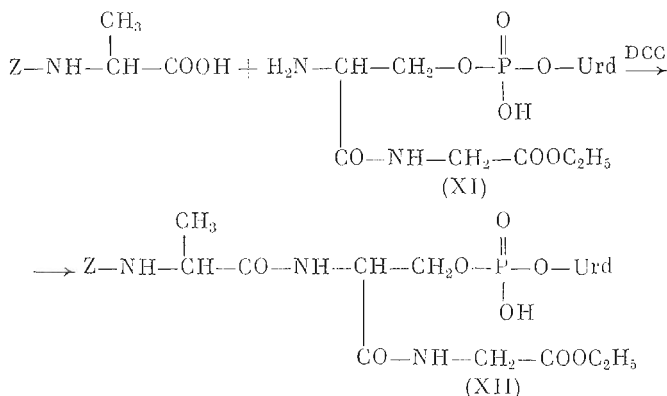
щим образом блокированные аминокислоты (пептиды) кипятят в абсолютном пиридине в присутствии дициклогексилкарбодимиды. Таким образом синтезированы *N*-бензилоксикарбонильные производные сложных эфиров уридиллил(5'→O)-*DL*-серина (I), -*DL*-треонина (II), -*DL*-2-метилсерина (III), -*DL*-серилглицина (IV), -*DL*-треонилглицина (V), -*DL*-аланил-*DL*-серина (VI), -*L*-оксипролина (VII), дезоксиаденилил(5'→O)-*DL*-серина (VIII), дезокситимидилил(5'→O)-*DL*-серина (IX), дезоксицитидилил(5'→O)-*DL*-серина (X).



- (I) $N = \text{Urd}; \text{R}_1 = \text{Z}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H}; \text{R}_4 = \text{OCH}_3;$
 (II) $N = \text{Urd}; \text{R}_1 = \text{Z}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{CH}_3;$
 $\text{R}_4 = \text{OCH}_3;$
 (III) $N = \text{Urd}; \text{R}_1 = \text{Z}; \text{R}_2 = \text{CH}_3; \text{R}_3 = \text{H};$
 $\text{R}_4 = \text{OCH}_3;$
 (IV) $N = \text{Urd}; \text{R}_1 = \text{Z}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H};$
 $\text{R}_4 = \text{NHCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5;$
 (V) $N = \text{Urd}; \text{R}_1 = \text{Z}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{CH}_3;$
 $\text{R}_4 = \text{NHCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5;$
 (VI) $N = \text{Urd}; \text{R}_1 = \text{COCH}(\text{CH}_3)\text{NH}-\text{Z}; \text{R}_2 = \text{H};$
 $\text{R}_3 = \text{H}; \text{R}_4 = \text{OCH}_3;$
 (VIII) $N = \text{dAdo}; \text{R}_1 = \text{Z}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H}; \text{R}_4 = \text{OCH}_3;$
 (IX) $N = \text{dTld}; \text{R}_1 = \text{Z}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H}; \text{R}_4 = \text{OCH}_3;$
 (X) $N = \text{dCyd}; \text{R}_1 = \text{Z}; \text{R}_2 = \text{H}; \text{R}_3 = \text{H}; \text{R}_4 = \text{OCH}_3.$

Исследование кинетики синтеза показало, что оптимальная продолжительность реакции — 30 мин в случае всех соединений. Выходы продуктов реакции 40–80% и зависят от природы как аминокислотного (пептидного), так и нуклеотидного компонента (табл. 1).

Трипептидное производное — этиловый эфир (*Z*-*DL*-аланил-*DL*-серил-уридиллил(5'→O)]-глицина (XII) синтезировали путем наращивания пептидной цепи в готовом дипептидном производном (XI) с помощью DCC. Такой подход был успешно нами применен ранее для синтеза нуклеотидил(*P*→*N*) пептидов [4].



Нуклеотидил(5'→O)-*N*-*Z*-оксиаминокислоты (пептиды) получали путем щелочного гидролиза их сложных эфиров. Имея в виду, что омыление сложноэфирной связи сопровождается расщеплением фосфоэфирной связи, концентрацию щелочи подбирали в каждом отдельном случае, исходя из поведения сложноэфирных аналогов в щелочной среде. Для всех исследованных соединений оптимальная концентрация щелочи не превышала 0,04–0,1 н. NaOH при продолжительности реакции 0,5–1 ч (37° С).

Выходы и некоторые характеристики синтезированных соединений приведены в табл. 1.

Исследование гидролитической устойчивости синтезированных соединений (I)–(X), (XII) с блокированной аминогруппой показало, что фосфоэфирная связь в сложных эфирах нуклеотидил(5'→O)аминокислот (пептидов) устойчива в кислой среде (1 н. HCl, 37° С, 1 ч) и расщепляется щелочью. Устойчивость к кислотам в некоторой степени противоречит

Некоторые характеристики синтезированных соединений

Соединение *	Выход ^{2*} , %	R _f в системах				E ^{3*} _{pN}	Соотношение ос- нование — фос- фор — амино- кислота
		А	Б	В	Г		
Z-Ser(pU)-OMe (I)	64	0,78	0,73	0,60	0,61	0,52	1:1,03:0,92
Z-Thr(pU)-OMe (II)	37	0,80	0,72	0,60	0,62	0,52	1:1,05:0,93
Z-MeSer(pU)-OMe (III)	37	0,83	0,73	0,64	0,69	0,51	1:0,98 ^{4*}
Z-Ser(pU)-Gly-OEt (IV)	75	0,81	0,74	0,64	0,57	0,49	1:1,02:0,80:0,99
Z-Thr(pU)-Gly-OEt (V)	48	0,82	0,70	0,63	0,60	0,52	1:1,05:0,85:1,02
Z-Ala-Ser(pU)-OMe (VI)	76	0,83	0,74	0,62	0,63	0,50	1:1,03:0,88:1,02
Z-Hyp(pU)-OMe (VII)	60	0,82	0,59	0,51	0,69	0,52	1:1,03 ^{4*}
Z-Ser(pdA)-OMe (VIII)	63	0,80	0,73	0,68	0,65	0,50	1:0,98:0,95
Z-Ser(pdT)-OMe (IX)	68	0,87	0,78	0,72	0,72	0,50	1:1,05:0,86
Z-Ser(pdC)-OMe (X)	36	0,78	0,75	0,60	0,61	0,49	1:1,03:0,78
H-Ser(pU)-Gly-OEt (XI)	90	0,57	0,35	0,35	—	0,33	1:0,97:0,85:0,95
Z-Ala-Ser(pU)-Gly-OEt (XII)	82	0,84	0,65	0,58	0,60	0,53	1:1,04:0,82:0,89: :0,96
Z-Ser(pU)-OH (XIII)	74 ^{5*}	0,57	0,27	0,52	0,46	0,92	1:0,92:0,89
Z-Thr(pU)-OH (XIV)	74 ^{5*}	0,60	0,36	0,57	0,42	0,89	1:1,09:0,96
Z-Ala-Ser(pU)-OH (XV)	77 ^{5*}	0,60	0,36	0,53	0,52	0,88	1:0,95:0,95:0,98
Z-Ser(pU)-Gly-OH (XVI)	88 ^{5*}	0,60	0,30	0,51	0,46	0,88	1:1,07:0,80:0,94

* Аминокислоты DL-конфигурации. ^{2*} Выходы определены спектрофотометрически. ^{3*} E_{pN} — электрофоретическая подвижность относительно нуклеозид-5'-фосфата. ^{4*} Определено соотношение оснований — фосфор. Аминокислота определена качественно. ^{5*} Приведены степени гидролиза сложноэфирной связи в оптимальных условиях.

результатам, опубликованным ранее [8], но хорошо согласуется с общими свойствами диэфиров фосфорной кислоты [10, 11]. Скорость щелочного гидролиза существенно зависит от природы содержащей гидроксильную группу аминокислоты, принимающей непосредственное участие в образовании фосфоэфирной связи: соединение (VII) и ранее [9] нами описанный Vz-Tyr(pU)-OMe расщепляются лишь в сравнительно жестких условиях (~30%, 1 н. NaOH, 100°С, 1 ч), в то время как β-оксиаминокислотные аналоги гораздо более лабильны в щелочной среде (рис. 1).

Ранее [3, 4] было установлено, что удлинение пептидной цепи в нуклеотидопептидах фосфоамидного типа стабилизирует связь между нуклеотидом и пептидом. Результаты гидролиза производных нуклеотидил-(5'→O) пептидов (рис. 1, 2) показывают, что в случае нуклеотидопептидов фосфоэфирного типа эта тенденция не соблюдается. Удлинение пептидной цепи с N-конца оксиаминокислоты (соединение (VI)) не влияет на устойчивость фосфоэфирной связи, а удлинение пептидной цепи с C-конца оксиаминокислоты (соединения (IV), (V), (XII)) даже сильно лабильзует ее. Это позволило предположить, что C-конец оксиаминокислот особенно важен в механизме расщепления нуклеотидил(5'→O) оксиаминокислот (пептидов). Зависимость скорости расщепления фосфоэфирной связи от состояния карбоксильной группы β-оксиаминокислоты отчетливо выражается при сравнении щелочного гидролиза сложных эфиров уридиллил(5'→O)-аминокислот (пептидов) (рис. 1) и их аналогов со свободной карбоксильной группой (рис. 2). Производные (XIII), (XIV) и (XV) гораздо стабильнее своих сложноэфирных аналогов (I), (II) и (VI), в то время как скорость гидролиза соединений (XVI) и (IV) одинакова. Все это позволяет сделать вывод, что свободная карбоксильная группа β-оксиаминокислот стабилизирует фосфоэфирную связь в уридиллил(5'→O)-β-оксиаминокислотах (пептидах). Удаленная от фосфоэфирной связи карбоксильная группа не оказывает влияния на ее гидролитическую устойчивость. Этим и можно объяснить большую лабильность фосфоэфирной связи в пептидных производных (IV) и (XVI).

Все полученные экспериментальные факты позволяют предположить, что механизм расщепления фосфоэфирной связи в нуклеотидил(5'→O)-аминокислотах (пептидах) зависит от структуры аминокислотного (пеп-

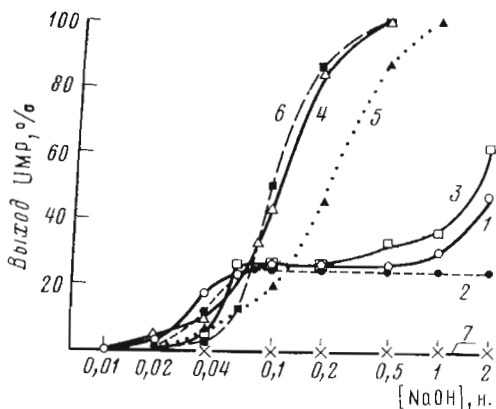


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость от концентрации щелочи степени расщепления фосфоэфирной связи в эфирах Z-Ser(pU)-OMe (I) — 1, Z-Thr(pU)-OMe (II) — 2, Z-Ala-Ser(pU)-OMe (VI) — 3, Z-Ser(pU)-Gly-OEt (IV) — 4, Z-Thr(pU)-Gly-OEt (V) — 5, Z-Ala-Ser(pU)-Gly-OEt (XII) — 6, Z-Hyp(pU)-OMe (VII) — 7 (37° С, 1 ч)

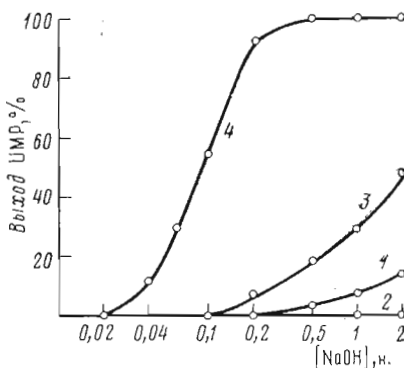


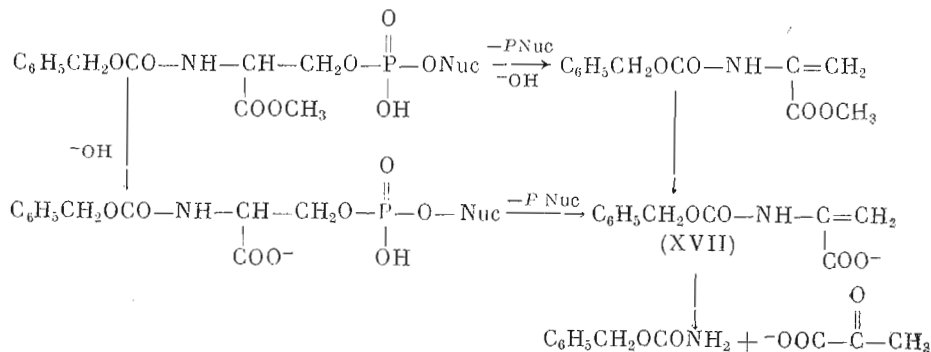
Рис. 2

Рис. 2. Зависимость от концентрации щелочи степени расщепления фосфоэфирной связи в Z-Ser(pU)-OH (XIII) — 1, Z-Thr(pU)-OH (XIV) — 2, Z-Ala-Ser(pU)-OH (XV) — 3, Z-Ser(pU)-Gly (XVI) — 4

тидного) компонента. В случае оксипролинового (VII) и ранее нами описанного тирозинового [9] производных имеет место нуклеофильное замещение у атома фосфора с участием гидроксиланиона, и они ведут себя так, как свойственно диэфирам фосфорной кислоты [10, 11]. Расщепление фосфоэфирной связи в гораздо более лабильных сериновых и треониновых производных протекает по механизму β-элиминирования [12]. Обязательным условием β-элиминирования является N-ацилирование аминогруппы, так как ранее нами показано [8], что уридиллил (5'→O)-β-оксиаминокислоты (пептиды) со свободной аминогруппой в щелочной среде претерпевают O→N-миграцию нуклеотидного остатка.

Исходя из β-элиминирования можно объяснить ряд экспериментальных фактов. Известно [13], что свободная карбоксильная группа в β-положении меньше способствует β-элиминированию, чем блокированная. Этим можно объяснить относительную стабильность соединений (XIII), (XIV) и (XV) в сравнении с их сложноэфирными [(I), (II), (VI)] и пептидными [(IV), (V), (VII)] аналогами.

Индукционный эффект метильной группы треонина несколько затрудняет β-элиминирование, поэтому соединение (II) немного стабильнее производного (I). Все это косвенно подтверждает механизм β-элиминирования, который можно представить схемой.



Прямым доказательством такого механизма служит тот факт, что в разностном спектре поглощения щелочного гидролизата соединения (I) нами был обнаружен максимум при 241 нм, так как известно [14, 15], что продукт элиминирования O-производных Z-серина, N-Z-аминоакриловая кислота (XVII), поглощает УФ-свет (λ_{max} 241 нм, ε 5300). Появление

Зависимость расщепления фосфоэфирной связи (%) в сложных эфирах нуклеотидил(5' → O)-N-Z-серина от концентрации щелочи *

Соединение	Концентрация NaOH, н.				
	0,02	0,06	0,1	1	2
Z-Ser(pdA)-OMe (VIII)	10,4±4,3	29,7±3,1	27,4±2,0	29,9±2,8	50,9±6,7
Z-Ser(pdT)-OMe (IX)	4,7±5,0	14,9±4,6	25,0±4,7	29,9±5,0	49,2±7,1
Z-Ser(pdC)-OMe (X)	3,9±5,0	29,0±5,0	30,6±1,5	33,3±6,2	46,3±8,1

* Гидролиз проводили при 37° С 1 ч.

ние в щелочном гидролизате соединения (I) пировиноградной кислоты, обнаруженной с помощью лактатдегидрогеназы, конечного продукта расщепления N-Z-аминоакриловой кислоты (XVII) [14, 15], также свидетельствовало о β-элиминировании. Оказалось, что суммарное количество пировиноградной и N-Z-аминоакриловой кислот близко к количеству образовавшегося UMP. Окончательное доказательство механизма β-элиминирования было получено при исследовании гидролитической устойчивости производного (III). Для протекания β-элиминирования необходимо присутствие протона у α-углеродного атома оксиаминокислоты, что не имеет места в случае соединения (III). Оказалось, что оно устойчиво в интервале от 1 н. HCl до 2 н. NaOH (37° С, 1 ч), т. е. это производное ведет себя так, как соединение (VII) и ранее описанный Vz-Tyr(pU)-OMe [9]. Единственным объяснением устойчивости 2-метилсеринового производного (III) и отличия его свойств от серинового (I) и треонинового (II) производных является неспособность соединения (III) к β-элиминированию.

Исследование гидролиза N-Z-сериновых производных dAMP, dTMP и dCMP показало, что природа гетероциклического основания не влияет на эффективность расщепления фосфоэфирной связи (табл. 2).

Таким образом, результаты, полученные ранее и в данной работе, позволяют сделать вывод, что устойчивость и механизм расщепления фосфоэфирной связи в нуклеотидил(5' → O)аминокислотах (пептидах) зависят от природы аминокислоты, содержащей гидроксильную группу. Если в образовании фосфоэфирной связи принимает участие оксипролин или тирозин, то она устойчива в умеренно кислой и щелочной среде, а в жестких щелочных условиях расщепляется аналогично связям в простых диэфирах фосфорной кислоты. Если в образовании фосфоэфирной связи участвует β-оксиаминокислота, то устойчивость связи сильно зависит от состояния амино- и карбоксильных групп. Если аминогруппа свободна, то в щелочной среде имеет место O → N-миграция. Если аминогруппа оксиаминокислот ацилирована, в щелочной среде имеет место β-элиминирование. Его эффективность зависит от состояния карбоксильной группы β-оксиаминокислот.

Полученные данные по гидролитической устойчивости нуклеотидил(5' → O)аминокислот (пептидов) могут быть полезны для выяснения природы связи между нуклеиновой кислотой (нуклеотидом) и белком в нуклеопротеидах и нуклеотид-белковых комплексах. Стабильность таких комплексов в щелочной среде заставляет предполагать наличие фосфоамидной связи [16–19]. Надо иметь в виду, что нуклеотидил (P → O)аминокислоты, в образовании фосфоэфирной связи которых принимает участие гидроксильная группа тирозина и оксипролина, тоже довольно стабильны в щелочной среде. Для выяснения типа связи особенно важно иметь специфические методы расщепления. Специфическими агентами на фосфоэфирную связь являются фосфодиэстеразы. Все синтезируемые соединения (I)–(XVI) расщеплялись фосфодиэстеразой змеиного яда. Однако использование этого фермента не позволяет сказать, какая именно аминокислота, содержащая гидроксильную группу, участвует в образовании фосфоэфирной связи. Исследование гидролитической устойчивости

нуклеотидил ($P \rightarrow O$) пептидов неизвестной структуры в щелочной среде дает возможность отличить сериновые (треониновые) производные нуклеотидов от тирозиновых (оксипролиновых) аналогов. Обнаружение в щелочных гидролизатах легко определяемой пировиноградной кислоты говорит о том, что в образовании фосфоэфирной связи между нуклеотидом (олигонуклеотидом) и аминокислотой (пептидом) участвует серин. Таким образом, исследование свойств модельных нуклеотидил ($P \rightarrow O$) аминокислот (пептидов) позволило найти методы идентификации некоторых оксиаминокислот, принимающих непосредственное участие в образовании фосфоэфирной связи.

Экспериментальная часть

В работе использовали динатриевую соль UMP, NADH, *DL*-аланил-*DL*-серин, *N*-бензилоксикарбонил-*DL*-аланин, этиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*DL*-серил-глицина, циклогексиламмониевую соль *N*-бензилоксикарбонил-*L*-оксипролина (Reanal, Венгрия), дауэкс-50 (Serva, ФРГ), *N,N'*-дциклогексилкарбодимид (Ferak, Зап. Берлин), фосфодиэстеразу из яда змеи *Crotalus adamanteus* (Koch-Light Laboratories Ltd, Англия), пропаргиловый спирт (VEB Laborchemie Apolda, ГДР), аминокислоты и другие реактивы отечественного производства.

По ранее описанным методикам синтезировали соединения (I)–(XI) [8, 9], карбобензоксихлорид, *N*-бензилоксикарбониламинокислоты, *N*-бензилоксикарбонил-*DL*-аланил-*DL*-серин [20], diazometan, метиловые эфиры *N*-бензилоксикарбониламинокислот, *N*-бензилоксикарбонил-*DL*-аланил-*DL*-серина [21], оксиацетон [22] и проводили гидролиз нуклеотидил ($P \rightarrow O$)-*N*-бензилоксикарбониламинокислот (пептидов) и их сложных эфиров [8]. Выходы синтезированных соединений (I)–(XVI) определяли спектрофотометрически, используя молярные коэффициенты поглощения соответствующих нуклеотидов.

Структуру производных нуклеотидил ($P \rightarrow O$) аминокислот (пептидов) доказывали расцеплением фосфодиэстеразой из змеиного яда [23] и определением соотношения основание – фосфор – аминокислота после полного кислотного гидролиза [8]. Производные нуклеотидил ($P \rightarrow O$) аминокислот (пептидов) выделяли с помощью препаративной хроматографии на промытой бумаге марки FN-1, FN-7 (быстрая, Filtrak, ГДР) и в тонком слое силикагеля Silpearl UV254 (Sklarny Kavalier, Чехословакия). Использовали следующие системы растворителей: этиловый спирт – 1 М уксуснокислый аммоний, 7 : 3 (А); *tert*-бутиловый спирт – вода, 7 : 3 (Б); *n*-бутиловый спирт – ледяная уксусная кислота – вода, 5 : 2 : 3 (В); изопропиловый спирт – конц. аммиак – вода, 7 : 1 : 2 (Г). Электрофорез на бумаге марки FN-15 (медленная, Filtrak, ГДР) проводили в 0,05 М триэтиламинбикарбонатном буфере, pH 7,5. Использовали вертикальный высоковольтный прибор фирмы «Lavo» (Венгрия).

DL-2-Метилсерин (III) получали нагреванием 55 мл оксиацетона, 45 мл конц. аммиака, 5 г хлористого аммония и 6 г цианистого калия в автоклаве при 50° С в течение 5 ч. Реакционную смесь упаривали досуха на роторном испарителе, добавляли 60 мл конц. HCl и кипятили 2,5 ч в колбе с обратным холодильником. Коричневый остаток, который получали после упаривания реакционной смеси, экстрагировали метиловым спиртом (2×10 мл). Охлажденный экстракт фильтровали, к фильтрату добавляли *n*-трибутилаламин до слабощелочной реакции и оставляли на 12 ч при 8° С. Выпавший осадок дважды перекристаллизовывали из 85% этилового спирта. Выход 1,2 г (12%). Найдено, %: С 40,3; Н 7,8; N 11,1. $C_4H_9O_3N$. Вычислено, %: С 40,3; Н 7,6; N 11,7.

DL-Серил[уридиллил(5'→O)]-глицин, этиловый эфир (XI). К 0,015 ммоль этилового эфира (IV) добавляли 0,3 мл 10% HBr в диоксане и 2 ч перемешивали на магнитной мешалке при 20° С. Полученную смесь упаривали на роторном испарителе при 37° С и сушили азеотропной дистиляцией с абс. бензолом и абс. диоксаном. Остаток растворяли в 0,2 мл системы растворителей (Б) и хроматографировали в той же си-

стеме в тонком слое силикагеля. Зону с R_f 0,5, поглощающую УФ-свет и дающую положительную нингидриновую реакцию, промывали 50% изопропиловым спиртом. Элюат упаривали. Получили 0,014 ммоль этилового эфира (XI). Выход 74%.

N-Бензилоксикарбонил-*DL*-аланил-*DL*-серил[уридиллил(5'→O)] - глицин, этиловый эфир (XII). 0,01 ммоль этилового эфира (XI) растворяли в 1 мл воды, добавляли 0,04 ммоль (0,02 мл) триоктиламина и упаривали. Сушили азеотропной дистилляцией с абс. бензолом и абс. диоксаном. Остаток растворяли в 0,3 мл абс. диметилформамида, добавляли 0,1 ммоль (22 мг) *N*-бензилоксикарбонилаланина, 0,1 ммоль (21 мг) DCC и оставляли на 3 ч при 37° С. Продукт реакции выделяли с помощью бумажной хроматографии в системе растворителей (Б). Зону с R_f 0,65 элюировали водой. Получили 0,0045 ммоль соединения (XII). Выход 45%.

Гидролиз производных нуклеотидил(P→O) аминокислот фосфодиэстеразой из яда змеи Crotalus adamanteus проводили, добавляя к 0,05 мл 0,006 М раствора исследуемого соединения 0,01 мл раствора фосфодиэстеразы (2 мг фермента растворяли в 10 мл 0,05 М трис-НСl-буфера, рН 8,8, содержащего 0,03 М MgCl₂) и инкубируя 2 ч при 37° С. Реакционную смесь хроматографировали на бумаге в системе растворителей (А). Пятна, поглощающие УФ-свет, идентифицировали сравнением с контрольными соединениями.

Определение пировиноградной кислоты проводили, добавляя к 0,05 мл 0,006 М раствора этилового эфира уридиллил(5'→O)-*N*-бензилоксикарбонил-*DL*-серина 0,05 мл 0,1–2 н. NaOH и инкубируя реакционную смесь 1 ч при 37° С. Раствор нейтрализовали с помощью 0,05 мл HCl соответствующей концентрации, добавляли 2,75 мл 0,05 М трис-НСl-буфера (рН 7,2), 0,05 мл 0,006 М NADH и 0,04 мл раствора лактатдегидрогеназы (концентрация 25 мг/мл). За кинетикой реакции следили по изменению поглощения при 340 нм. Количество образовавшейся пировиноградной кислоты равно количеству NADH (в молях).

ЛИТЕРАТУРА

1. Juodka B., Sasnauskiene S., Shabarova Z. J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides, 1981, in press.
2. Юодка Б. А. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1445–1465.
3. Juodka B., Sasnauskiene S. J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides, 1981, v. 8, № 1, p. 19–40.
4. Shabarova Z. A. In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology / Eds Davidson J. N., Cohn W. E. New York: Acad. Press, 1970, v. 10, p. 145–182.
5. Juodka B., Kirveliene V., Liorančaitė L. J. Carbohydr., Nucleosides, Nucleotides. 1979, v. 6, № 4, p. 333–357.
6. Gumpert R. I., Lehman I. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, № 10, p. 2559–2563.
7. Юодка Б. А., Маркуцкас А. Я., Спечкуче М. А., Жилинскас В. П., Дрыгин Ю. Ф. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1733–1734.
8. Юодка Б. А., Савельев Е. П., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Биохимия, 1968, т. 33, № 4, с. 907–915.
9. Юодка Б. А., Саснаускене С. П. Химия природ. соедин., 1974, № 1, с. 216–220.
10. Cox J. R., Ramsay O. B. Chem. Rev., 1964, v. 64, № 2, p. 317–352.
11. Бельский В. Е. Успехи химии, 1977, т. 46, № 10, с. 1578–1603.
12. Samuel D., Silver B. J. Chem. Soc., 1963, № 1, p. 289–296.
13. Crosby J., Stirling C. J. M. J. Chem. Soc., Part B, 1970, № 2, p. 671–679.
14. Riley G., Turnbull J. H., Wilson W. Chem. Ind., 1953, v. 44, № 9, p. 1181.
15. Riley G., Turnbull J. H., Wilson W. J. Chem. Soc., 1957, № 9, p. 1373–1379.
16. Lovett M. A., Helinski D. R. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 10, p. 8790–8795.
17. Padmanabhan R., Padmanabhan V. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1977, v. 75, № 6, p. 955–964.
18. Champoux J. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 10, p. 3800–3804.
19. Kasamatsu H., Wu M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 8, p. 1945–1949.
20. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965, с. 391–397.
21. Органикум, т. 2. М.: Мир, 1979, с. 247–250.
22. Newman M. S. J. Amer. Chem. Soc., 1953, v. 75, № 10, p. 4740–4744.

Поступила в редакцию
18.VI.1981
После доработки
9.IX.1981

OLIGONUCLEOTIDES AND NUCLEOTIDE-PEPTIDES. XXXVIII.
SYNTHESIS AND PROPERTIES OF NUCLEOTIDYL
(*P*→*O*)AMINO ACIDS (PEPTIDES) AND THEIR ESTERS

JUODKA B. A., KIRVELIENE V. A., POVILIONIS P. J.

*Department of Biochemistry and Biophysics,
Vilnius State University, Vilnius*

A number of nucleotidyl(5'→*O*) amino acid (dipeptide) esters have been synthesized by dicyclohexyl carbodiimide and pyrophosphate methods. Their analogs with a free carboxyl group were prepared by saponification with alkali of appropriate concentration. The phosphoester bond in the synthesized compounds is stable in acidic and neutral media and is split in alkaline medium. The degree and mechanism of splitting depend on the nature of hydroxy amino acid and on the state of its carboxyl group. It was found by chemical and enzymatic methods that in an alkaline medium the splitting of nucleotidyl(5'→*O*)hydroxy amino acid (peptide) esters proceeds by the β -elimination mechanism. The data obtained may be of value in studying the structure of nucleic acid- or nucleotide-protein complexes having a covalent bond between the components.