



УДК 547.963.32.07

**СИНТЕЗ ДЕКАНУКЛЕОТИДА И ГЕКСАНУКЛЕОТИДА,
СООТВЕТСТВУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ 28—37
И 37—42 ДРОЖЖЕВОЙ ВАЛИНОВОЙ тРНК_f***Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А.,
Смолянинова О. А., Хабарова М. И.**Институт биологической физики Академии наук СССР, г. Пущино Московской обл.**Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М.**Специальное конструкторско-технологическое бюро биологически
активных веществ, Новосибирск*

Синтезировали декануклеотид $\Psi\text{pCpUpGpCpUpUpIpApC}$ и гексануклеотид CpApCpGpCpA , соответствующие последовательностям 28—37 (с заменой остатка Ψ^{33} уридином) и 37—42 дрожжевой валиновой тРНК_f. Исходные олигонуклеотидные блоки ΨpCpU , pGpCpUpU , pIpApC , CpApC и pGpCpA получали с помощью рибонуклеаз различной специфичности и полинуклеотидфосфорилазы. Фрагменты 28—30 и 31—34, 28—34 и 35—37, 37—39 и 40—42 «сшивали» РНК-лигазой.

Продолжая исследования по комплексному использованию ферментов нуклеинового обмена в синтезе фрагментов тРНК и их аналогов, мы предложили схему синтеза фрагмента 28—39 антикодоновой ветви дрожжевой валиновой тРНК_f, в котором псевдоуридин-33 заменен уридином [2]. Делая выбор между альтернативными вариантами [2], мы синтезировали фрагменты 28—33, 28—34 и 31—37, используя для этого рибонуклеазы различной специфичности, полинуклеотидфосфорилазу *Micrococcus luteus* и РНК-лигазу Т4. Реализуя предложенную схему и учитывая результаты, полученные в модельных опытах [2], мы синтезировали декануклеотид $\Psi\text{pCpUpGpCpUpUpIpApC}$, соответствующий фрагменту 28—37 (с заменой остатка Ψ^{33} уридином), а также гексануклеотид CpApCpGpCpA , соответствующий фрагменту 37—42. Локализация этих олигонуклеотидов в дрожжевой валиновой тРНК_f показана на рис. 1.

В соответствии со схемой исходными блоками для синтеза декануклеотида служили трипнуклеозиддифосфат ΨpCpU (фрагмент 28—30), тетрапнуклеотид pGpCpUpU (фрагмент 31—34) и тринуклеотид pIpApC (фрагмент 35—37), получение которых было описано предварительно в работе [2], а суммарные результаты приведены в табл. 1. Динуклеозидмонофосфаты ΨpC , CpU , GpC и динуклеотид ApCp получали с помощью рибонуклеаз различной специфичности; дальнейшее наращивание олигонуклеотидной цепи проводили, применяя гуанилспецифичную рибонуклеазу C_2 в случае 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов и полинуклеотидфосфорилазу *M. luteus* в остальных случаях.

Гомогенность синтезированных олигонуклеотидных блоков контролировали электрофорезом и хроматографией на бумаге, а их нуклеотидный состав определяли, анализируя гидролизат, полученный при обработке олигонуклеотида тем или иным ферментом, с помощью хроматографии на бумаге и спектрофотометрии. Найденные характеристики совпали с полученными ранее [2].

Для сшивки олигонуклеотидных блоков использовали РНК-лигазу Т4, выделенную и охарактеризованную как описано нами ранее [3]. Получение фрагмента 28—34 из три- и тетрапнуклеотидных блоков подробно рассмотрено в работе [2], а итоговый результат приведен в табл. 1. Гепта-

Сокращения: ПНК-фосфорилаза — полинуклеотидфосфорилаза, СМ-рибонуклеаза — рибонуклеаза *Pen. brevicompactum*, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой. *Остальные сокращения соответствуют рекомендуемым [1].

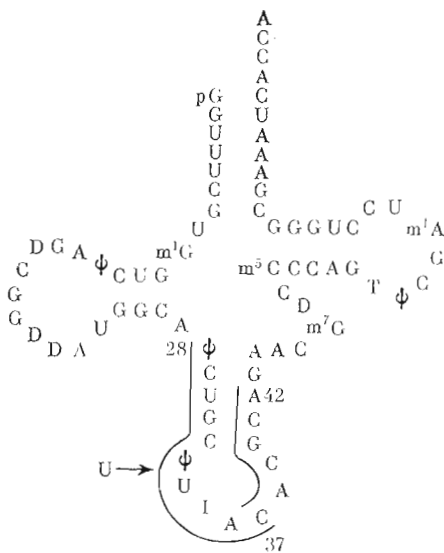


Рис. 1. Локализация фрагментов 28—37 и 37—42 в дрожжевой валниной тРНК_f (сплошная линия). Стрелкой обозначена замена остатка Ψ^{33} остатком уридина

пуклеотид $\Psi rCpUrGrCpUrU$ образуется с выходом 10—23% в зависимости от концентрации РНК-лигазы. Тетрануклеотид $rGrCpUrU$ — донор фосфата в этом синтезе — «самоконденсируется» в меньшей степени, чем тринуклеотид $rGrCpU$ [2]. Результаты опытов по сшивке фрагментов 28—34 и 35—37, а также 37—39 и 40—42 приведены в табл. 2.

При проведении модельной сшивки $GrCpUrU$ и $rIrArC$ наблюдали образование гептануклеозидгексафосфата $GrCpUrUrIrArC$ и гексануклеотида $rIrArCpIrArC$ — продукта «самоконденсации» донора фосфата, которые выходили отдельными пиками в системе Томлинсона-Тенера, причем гексануклеотид частично терял концевой фосфат в процессе выделения [2]. Чтобы исключить «самоконденсацию» $rIrArC$, в настоящей работе мы получили 3'-фосфат этого тринуклеотида (см. табл. 1) и использовали его в качестве исходного блока. Если при «сшивании» РНК-лигазой $GrCpUrU$ и $rIrArC$ реакция проходила на 6—8% [2], то замена $rIrArC$ на $rIrArCp$ увеличила выход продукта сшивки до 13—15% (см. табл. 2), т. е. примерно вдвое. Таким образом, можно полагать, что низкий выход $GrCpUrUrIrArC$ в первом случае был связан прежде всего с одновременным расходом донора $rIrArC$ на образование побочного продукта, а не с субстратной специфичностью фермента. Правда, по литературным данным [4], наличие даже одного уридилового остатка в одном из трех положений у 3'-конца акцептора может быть причиной его недостаточной эффективности. Однако, принимая во внимание примерно одинаковую эффективность $GrCpUrU$ и $rIrArC$ как акцепторов («сшивка» этих олигонуклеотидов и «самоконденсация» $rIrArC$ проходят примерно с одинаковым выходом), мы считаем, что пока следует с достаточной осторожностью делать выводы о структурных требованиях РНК-лигазы, тем более что все имеющиеся на этот счет к настоящему времени данные получены или на гомоолигомерных субстратах, или же в работах, направленных на получение того или иного конкретного олигонуклеотида, а систематическая оценка эффективности различных гетероолигонуклеотидных субстратов была проведена лишь на ограниченном числе примеров.

При переходе от тетрануклеотидного акцептора ($GrCpUrU$) к гептануклеотидному ($\Psi rCpUrGrCpUrU$), в котором четыре нуклеотидных остатка с 3'-конца повторяют структуру тетрануклеотида, мы наблюдали значительное (в 3 раза) уменьшение выхода в РНК-лигазной реакции с тем же донором ($rIrArCp$). Это согласуется с литературными данными: на примере гомоолигомерных акцепторов было показано, что сродство РНК-лигазы к акцептору и скорость межмолекулярной реакции зависят как от нуклеотидного состава, так и от длины цепи акцептора, причем скорость несколько увеличивается с увеличением длины акцептора до 5—6 нуклеотидов, а при дальнейшем росте длины цепи уменьшается [5].

Препаративный синтез олигонуклеотидных блоков

Субстраты		Фермент	Олигонуклеотид	Выход *	
донор	акцептор			мкмоль	%
Ψ>р	С	Рибонуклеаза панкреатич.	ΨрС	152	30
С>р	U	»	СрU	234	12
G>р	С	СМ-рибонуклеаза	GrС	100	60
A>р	Ср	»	ArСр	103	27
ppU	ΨрС	ПНК-фосфорилаза	ΨрСрU	19	12
ppU	СрU	»	СрUrU	31	10
ppU	GrС	»	СрСрU	5	9
			GrСрUrU	2	3
С>р	ArС	Рибонуклеаза панкреатич.	СрArС	2	5
рG>р	СрA	Рибонуклеаза С ₂	рGrСрA	1,5	25
рI>р	ArС	»	рIrArС	2	9
рI>р	ArСр	»	рIrArСр	1	4
рG>р	СрUrU	»	рGrСрUrU	7	7
рGrСрUrU	ΨрСрU	РНК-лигаза	ΨрСрUrGrСрUrU	0,4	10-23

* Выделено чистого вещества.

Таблица 2

Синтез гептануклеотида GrСрUrUrIrArСр, декануклеотида ΨрСрUrGrСрUrUrIrArСр и гексануклеотида СрArСрGrСрA в присутствии РНК-лигазы T4

Начальная концентрация донора фосфата ~1 мМ

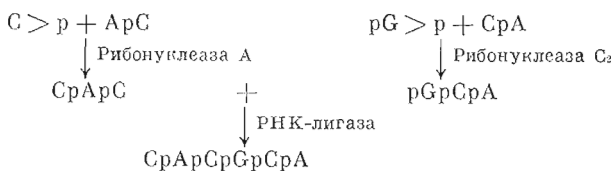
Акцептор фосфата	Донор фосфата	акцептор/донор	РНК-лигаза, ед. акт./мг	Выход		Возврат, %	
				мкмоль	%	акцептора	донора
GrСрUrU							
GrСрUr	рIrArСр	2,5	2930	43	13	48	38
GrСрUrU	рIrArСр	1,5	3500 *	50	15	45	50
ΨрСрUrGrСрUrU	рIrArСр	0,4	3500	5	5	29	21
СрArС	рGrСрA	3	2000	52	16	70	54
»	»	2	3250	105	32	50	22
»	»	1	4350	70	21 **	36	58
рGrСрA	»		3250	26	8		23

* 30° С, 5 ч.

** Смесь СрArСрGrСрA и GrСрArGrСрA.

Более близкую аналогию можно найти в работе [6]: при «сшивании» одного и того же донора фосфата рСрArArСрСрA (<СНОEt) с гексануклеотидом (Ср)₅G и ундекануклеотидом UrСрСрGrGr(Ср)₅G, в котором шесть нуклеотидных остатков с 3'-конца повторяют структуру гексануклеотида, получили соответственно 16 и 5% додекануклеотида и гептадекануклеотида.

Фрагмент 37-42 был синтезирован по следующей схеме:



Зависимость выхода CrArC от отношения $[\text{C}>\text{p}]/[\text{ArC}]$,
 начальной концентрации панкреатической рибонуклеазы
 и времени
 $[\text{C}>\text{p}]=0,25 \text{ M}$, $[\text{C}>\text{p}]/[\text{ArC}]=0,5$

[E], мг/мл	Время, ч	Выход, %	Регенериро- вано ArC , %
0,01	6	5,5	64
0,01	24	5,2	63
0,01	48	4,8	62
0,01	72	3,7	60
0,04 *	24	4,4	
0,08 **	24	5,3	

* $[\text{C}>\text{p}]/[\text{ArC}]=1$.

** $[\text{C}>\text{p}]/[\text{ArC}]=2$.

Ферментативный синтез CrArC из $\text{C}>\text{p}$ и ArC ранее был описан Бернфилдом [7], использовавшим для этой цели *S*-белок. Позднее в нашей лаборатории было показано, что синтетическая активность *S*-белка в основном определяется теми небольшими примесями рибонуклеазы *A* или рибонуклеазы *S*, которые сохраняются в препаратах *S*-белка, несмотря на многократную очистку, и что применение *S*-белка в препаративном синтезе не дает преимуществ по сравнению с рибонуклеазой *A* [8]. Поэтому в настоящей работе для получения тринуклеозиддифосфата CrArC мы применили панкреатическую рибонуклеазу, варьируя отношение донор/акцептор, начальную концентрацию фермента и время (табл. 3). Препаративный выход CrArC в среднем не превышал 5%, однако возможность получать в одну стадию практически любое количество ArC [9] и не требующая больших материальных и временных затрат одностадийная реакция получения CrArC делают этот путь вполне приемлемым для препаративных целей.

Тринуклеотид pGrCrA получали в соответствии с нашими общими рекомендациями по синтезу 5'-фосфорилированных олигорибонуклеотидов [10], используя двукратный избыток донора фосфата для более эффективного использования олигонуклеотидного акцептора. Выход pGrCrA составил 20–25% (см. табл. 1), при этом ~70% CrA может быть регенерировано. Соответствующий тринуклеозиддифосфат GrCrA был получен в присутствии рибонуклеазы *T*, с более низким выходом: 14% [11] и 12% [12].

Сшивку тринуклеотидных блоков РНК-лигазой проводили, варьируя отношение донор/акцептор и концентрацию фермента (см. табл. 2). Гексануклеозидпентафосфат CrArCrGrCrA образуется с выходом 16–32% в зависимости от условий. При эквимольных количествах субстратов наблюдали образование гексануклеотида pGrCrArGrCrA , хотя как акцептор pGrCrA менее эффективен, чем CrArC , так как при инкубировании с РНК-лигазой в тех же условиях одного тринуклеотида pGrCrA сшивка проходит только на 8%.

После окончания реакции с участием РНК-лигазы и ингибирования фермента реакционные смеси разделяли на ДЕАЕ-сефадексе в системе Томлинсона-Тенера (см. рис. 2–4). Микроколоночная хроматография на лихросорбе Li_2N_2 показала, что продукты сшивки, выделенные после дополнительной очистки ВХ, как правило, гомогенны или содержат не более 3–5% примесей.

Для определения нуклеотидной последовательности к декануклеотиду присоединяли $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{pCr}$ с помощью РНК-лигазы [3] и подвергали прямому химическому секвенированию по методу [14]. После разделения образующегося набора фрагментов электрофорезом в полиакриламидном геле получили автордиограмму, подтверждающую структуру декануклеотида (рис. 5) *.

* Анализ выполнен А. С. Манькиным (МГУ).

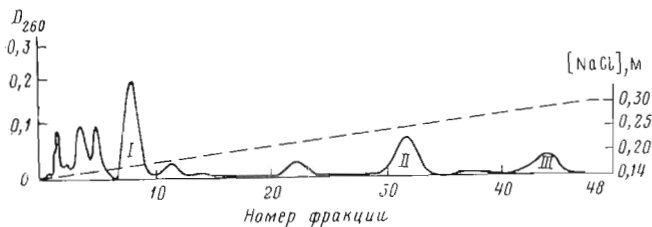


Рис. 2

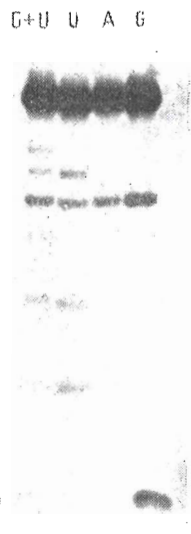


Рис. 5

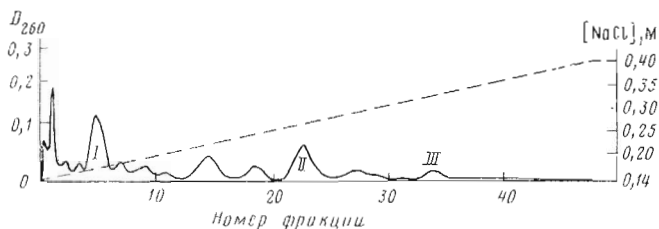


Рис. 3

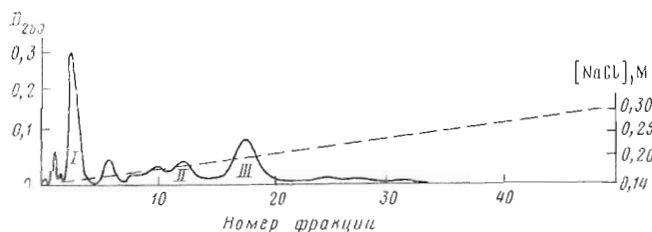


Рис. 4

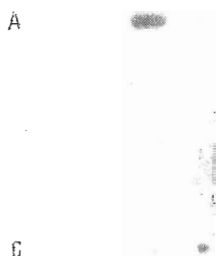


Рис. 2. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе GrCrUpUrIrArCr (фрагмент 31-37), на колонке (0,9×22 см) с DEAE-сефадексом в системе Томлинсона-Тенсра: пик I - GrCrUpU, пик II - rIrArCr, пик III - GrCrUpUrIrArCr

Рис. 3. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе ΨrCrUpGrCrUpUrIrArCr и последующем дефосфорилировании: пик I - IrArCr, пик II - ΨrCrUpGrCrUpU, пик III - ΨrCrUpGrCrUpUrIrArCr. Условия см. в подписи к рис. 1

Рис. 4. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе CrArCrGrCrA: пик I - CrArCr, пик II - rGrCrA, пик III - CrArCrGrCrA. Условия см. в подписи к рис. 1

Рис. 5. Радиоавтограмма полиакриламидного геля, полученная при определении первичной структуры ΨrCrUpGrCrUpUrIrArCr по методу Питти [14]

Экспериментальная часть

В работе использовали цитидин, уридин, Na-соли 2',3'-циклофосфатов аденозина и цитидина, цитидин-2'(3')-фосфата, UDP и АТР, панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), дитиозеритрит (Serva, ФРГ), DEAE-целлюлозу Cellex, ПНК-фосфориллазу *M. luteus* (Calbiochem, США), сефадексы G-10, G-15, DEAE-сефадек A-25 (Pharmacia, Швеция).

Неспецифичная рибонуклеаза *Penicillium brevicompactum* (КФ 2.7.7.17), ковалентно связанная с СМ-целлюлозой, была приготовлена нами по методу [13] из препарата фермента, любезно предоставленного В. А. Ежовым (ИБФМ АН СССР). Гуанилспецифичная рибонуклеаза *Aspergillus clavatus* C₂ (КФ 2.7.7.26) получена от С. И. Безбородовой (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов).

РНК-лигаза Т4 была выделена как описано в работе [3].

Псевдоуридин-2',3'-циклофосфат, нуклеозид-2'(3'), 5'-дифосфаты и соответствующие 5'-фосфорилнуклеозид-2',3'-циклофосфаты синтезировали как описано в работах [2, 10].

Хроматографию и электрофорез на бумаге, микроколоночную хроматографию, УФ-спектрофотометрию, а также синтез олигорибонуклеотидов, представленных в табл. 1, проводили в соответствии с работой [2].

Динуклеотид АрСр* был получен инкубированием смеси А>р и С2'(3')р (начальные концентрации 0,25 и 0,75 М соответственно) в 0,2 М фосфатном буфере, рН 7,0, в течение 24 ч при 0°С с СМ-рибонуклеазой *Pen. brevicompactum* (12,5 мг/мл). Объем реакционной смеси составлял 0,8 мл. Динуклеотид АрСр выделяли хроматографией на колонке (1,6×70 см) с ДЕАЕ-целлюлозой в градиенте концентрации ТЕАВ от 0,05 до 0,2 М. Для обессоливания фракции, содержащей АрСр, упаривали несколько раз с этанолом, остаток дополнительно очищали на сефадексе G-15.

Тринуклеотид рІрАрСр получали, инкубируя рІ>р и АрСр (начальная концентрация 0,04 М) в 0,04 М фосфатном буфере (рН 7,5) в течение 96 ч при 0°С с гуанилспецифичной рибонуклеазой С₂ (6 ед. акт./мл). Объем реакционной смеси составлял 0,6 мл. Из смеси рІрАрСр выделяли препаративной хроматографией в системе этанол—конц. аммиак—вода (65:10:25) и отделяли от рІр электрофорезом на бумаге, проводя затем повторную хроматографию в той же системе.

Синтезы с участием РНК-лигазы Т4 и разделение реакционных смесей проводили в условиях, описанных в работе [2]. На рис. 2—4 представлен профиль элюции реакционных смесей, полученных при сшивании ГрСрУрU и рІрАрСр, УрСрУрГрСрУрU и рІрАрСр, СрАрСр и рГрСрА.

Авторы приносят сердечную благодарность В. Л. Друце и А. А. Пурмалю (МГУ) за содействие в проведении микроколоночной хроматографии и А. С. Манькину за определение первичной структуры декануклеотида.

ЛИТЕРАТУРА

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their components.— *Biochim. et biophys. acta*, 1971, v. 27, № 1, p. 1—12.
2. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. *Биоорганическая химия*, 1981, т. 7, № 4, с. 524—533.
3. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Манькин А. С., Прокофьев М. А., Загребельный С. П., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезнин М. И., Смолянинов В. В. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 7, с. 1037—1046.
4. England T. E., Uhlenbeck O. C. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 11, p. 2069—2076.
5. Веньяминова А. Г., Ямковой В. П. *Биоорганическая химия*, 1981, т. 7, № 10, с. 1445—1466.
6. Ohtsuka E., Nishikawa S., Markham A. F., Tanaka S., Miyake T., Wakabayashi T., Ikehara M., Sugiura M. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 23, p. 4894—4899.
7. Bernfield M. J. *Biol. Chem.*, 1966, v. 241, № 9, p. 2014—2023.
8. Женодарова С. М., Хабарова М. И. *Молекулярная биология*, 1980, т. 14, № 2, с. 299—306.
9. Хабарова М. И., Женодарова С. М. *Молекулярная биология*, 1972, т. 6, № 5, с. 682—688.
10. Женодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 10, с. 1516—1521.
11. Grünberger D., Holý A., Šorm F. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 1968, v. 33, № 1, p. 286—295.
12. Sekiya T., Furuichi Y., Yoshida M., Ukita T. J. *Biochemistry*, 1968, v. 63, № 4, p. 514—520.
13. England T. E., Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. In: *Methods in Enzymology* / Ed. Moldave K. et al. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 65, part 1, p. 65—74.
14. Peattie D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, v. 76, № 4, p. 1760—1764.
15. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 5, с. 736—742.

Поступила в редакцию
27.1.1982.

* Синтез АрСр был выполнен И. А. Соболевой, за что авторы приносят ей искреннюю благодарность.

SYNTHESIS OF DECANUCLEOTIDE AND HEXANUCLEOTIDE CORRESPONDING
TO THE FRAGMENTS 28-37 AND 37-42 OF YEAST tRNA₁^{Val}

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SEDELNIKOVA E. A.,
SMOLYANINOVA O. A., KHABAROVA M. I., MAISTRENKO V. F., PUSTOSHILOVA N. M.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino;
Special Design and Technology Bureau for Biologically Active Compounds, Novosibirsk*

Decanucleotide $\Psi\text{pCpUpGpCpUpUpIpApC}$ and hexanucleotide CpApCpGpCpA corresponding to fragments 28-37 (where Ψ -33 was replaced by uridine) and 37-42 of yeast tRNA₁^{Val} have been synthesized. Initial oligonucleotide blocks ΨpCpU , pGpCpUpU , pIpApC , CpApC and pGpCpA were prepared enzymatically in the presence of ribonucleases of different substrate specificity and polynucleotide phosphorylase. Fragments 28-30 and 31-34, 28-34 and 35-37, 37-39 and 40-42 were joined by RNA-ligase T4.