

THE CHEMISTRY OF
NUCLEOSIDES AND NUCLEOTIDES

A. M. Michelson

Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, France

1963

Academic Press, London and New York

А. МИКЕЛЬСОН

ХИМИЯ
НУКЛЕОЗИДОВ
И НУКЛЕОТИДОВ

Перевод с английского

канд. хим. наук А. А. БОГДАНОВА,
канд. хим. наук О. Е. ВОРОБЬЕВА,
доктора хим. наук З. А. ШАБАРОВОЙ

Под редакцией

доктора хим. наук проф. М. А. ПРОКОФЬЕВА

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1966

Предисловие

Книга написана учеником А. Тодда — главы кембриджской «нуклеотидной» школы химиков, внесшей крупный вклад в эту область органической химии. Она привлекает пристальное внимание биохимиков, химиков и биологов. До сих пор имелись лишь обзорные статьи и небольшие монографии, охватывающие отдельные аспекты химии нуклеотидов. Книга Микельсона — первая монография, суммирующая экспериментальный и теоретический материал в этой важнейшей области природных соединений; это энциклопедический справочник, содержащий много ценных физико-химических данных об этом классе соединений.

Книга будет настольным справочником для биохимиков, биологов и химиков, занимающихся природными соединениями.

Книга А. М. Микельсона «Химия нуклеозидов и нуклеотидов» пополняет относительно небогатый список литературы, посвященной нуклеиновым кислотам, в которой они рассматриваются в химическом аспекте.

Глубокое проникновение в молекулярные основы жизни, характерное для наших дней, породило новые науки — молекулярную биологию и биорганическую химию. Разграничительные линии между этими науками провести трудно: здесь дело, скорее, в аспекте рассмотрения одних и тех же проблем. В первом случае — это биологический аспект, конкретнее биохимический, во втором — химический.

Биохимии нуклеиновых кислот, их биосинтезу, регуляции синтеза белков, химическим основам наследственности, строению вирусов и фагов и многим другим проблемам молекулярной биологии посвящено большое число хороших обзоров, издан ряд прекрасных книг отечественных и зарубежных ученых.

Несколько хуже обстоит дело с биорганической химией. Более половины научных публикаций в области органической химии в настоящее время посвящено химии природных соединений. Однако обобщение методов синтеза, доказательств структуры природных соединений в специальных книгах — явление далеко не частое, хотя потребность в этом очевидна.

Почти любая гипотеза может считаться доказанной, если по замыслу химика можно синтезировать и строго доказать строение промежуточных или конечных продуктов биохимических превращений. Книга Микельсона построена весьма логично. В ней последовательно разбирается химия нуклеозидов, нуклеотидов, полинуклеотидов, нуклеиновых кислот. В особую главу выделена химия так называемых нуклеотидангидридов, куда автор относит такие разнообразные по своим функциям соединения, как аденозинтрифосфат, аминокислотиды, кофермент II, флавинаденин-

динуклеотид и ряд других. Современная химия нуклеиновых кислот неразрывно связана с проблемами их биологического синтеза. Эти вопросы выделены автором в особую главу.

Внутри каждой главы существует также своя разумная логика. Как правило, автор разворачивает картину химии тех или иных соединений в такой последовательности: выделение веществ из природных объектов, доказательства их химической структуры, способы синтеза, наиболее важные химические свойства.

Книга вышла из печати в 1963 г. и содержит литературу по 1962 г. включительно.

В русском издании оmissa гл. 9 «Биология нуклеиновых кислот». За три года, прошедшие со дня издания книги, в этой области произошли принципиальные изменения, и в силу этого материал несколько устарел. Мы не сочли целесообразным его дополнять, имея в виду, что на русском языке имеются обзоры и книги, трактующие вопросы биологии нуклеиновых кислот с вполне современных позиций.

Автор книги принадлежит к числу ученых, активно разрабатывающих химию нуклеиновых кислот, что делает книгу еще более привлекательной. По нашему мнению, книга А. М. Микельсона будет весьма полезной для студентов старших курсов, аспирантов и научных работников, работающих в области химии вообще и в области биоорганической химии и молекулярной биологии в особенности.

М. ПРОКОФЬЕВ

Предисловие автора

«... можно только надеяться, что если мы не достигли последней главы в интереснейшей серии исследований, начатых Мишером много лет назад, то должны находиться где-то у предпоследней».

В. ХЭЛЛИБАРТОН

[Annual Reports on the Progress of Chemistry, 6, 170 (1909)]

Настоящая книга представляет собой попытку дать описание общей химии нуклеозидов и нуклеотидов и их главных производных — нуклеотидкоферментов и нуклеиновых кислот, а также тех аспектов их биохимии, которые настолько тесно связаны с химическим подходом, что отделение их становится затруднительным. Изложение химии углеводов или пуринов и пиримидинов как таковых отсутствует, поскольку она довольно подробно описана в обычных руководствах. Хочется надеяться, что эта книга, кроме обычного редакторского «предназначена для студентов старших курсов», привлечет внимание и окажется полезной тем многочисленным исследователям, чьи достижения сделали задачу составления такой монографии необходимой и возможной.

А. МИКЕЛЬСОН

Париж,
октябрь 1962 г.

О биологической значимости нуклеозидов, нуклеотидов и их производных свидетельствует большое число публикуемых в настоящее время работ. Возрождение интереса к этой области в значительной мере обусловлено появлением ряда методов, которые облегчили выделение и идентификацию веществ, не поддававшихся изучению с помощью классических методов органической химии как из-за сложности их структуры, так и вследствие малой устойчивости некоторых связей в этих соединениях. Нуклеотид лучше всего определить как фосфорный эфир сахара, связанного гликозидной связью с молекулой основания, являющегося производным пурина или пиримидина. Таким образом, нуклеотид представляет собой фосфорный эфир нуклеозида. В природных соединениях нуклеозидная часть обычно представлена β -D-рибофуранозильным или β -D-2-дезоксирибофуранозильным остатком. К нуклеотидам причисляют также такие соединения, как моонуклеотид никотинамида и моонуклеотид рибофлавина. Простейшими соединениями класса нуклеотидов являются аденозин-5'-фосфат, аденозин-5'-пирофосфат и аденозин-5'-трифосфат, а также моонуклеотиды, образующиеся при гидролизе нуклеиновых кислот. К числу нуклеотидов, имеющих более сложную структуру, относятся диэфиры пирофосфорной кислоты, представляющие собой коферменты, такие, как флавинадениндинуклеотид, кофермент А, уридиндифосфатглюкоза и дифосфопиридиннуклеотид. Эти примеры иллюстрируют до некоторой степени случайный характер принятой в настоящее время номенклатуры. К этому же классу соединений относятся полимеры нуклеотидов, известные под названием нуклеиновых кислот, молекулярные веса которых достигают нескольких миллионов. В качестве компонентов хромосом и вирусов, а также факторов клеточного роста эти соединения проявляют биологические свойства, связанные с самой сущностью жизни.

Самые первые попытки выделения полинуклеотидного материала связаны с исследованиями в области медицины (кстати, многие пуриновые и пиримидиновые производные имеют значительную химиотерапевтическую ценность). В 1869 г. Мишер [1] предпринял выделение ядерного вещества гнойных клеток, полученных из хирургических повязок. Эти клетки он сначала обрабатывал пепсином и разбавленной соляной кислотой в течение

длительного времени, а затем полученный гидролизат встряхивал с эфиром; при этом из водной фазы осаждались практически чистые ядра клеток. Из этого материала он получил довольно необычное вещество кислого характера, нуклеин, которое содержало большое количество фосфора, не растворялось в обычных органических растворителях и в разбавленных кислотах, но легко растворялось в разбавленных щелочах. Несмотря на скептицизм Хоппе-Зайлера, задержавшего публикацию этих результатов на два года (до тех пор, пока он с двумя своими аспирантами не подтвердил и не расширил это исследование), Мишер вскоре показал, что высокомолекулярный нуклеин можно выделить из спермы лосося. Наряду с нуклеином был выделен белок основного характера, названный Мишером протамином, который можно легко экстрагировать из спермы разбавленной кислотой. В более поздней работе Альтмана [2] (который в 1889 г. ввел термин «нуклеиновая кислота») и других работах были предложены общие методы выделения нуклеиновых кислот из дрожжей и ряда животных тканей. В 1891 г. Коссель [3] описал гидролиз нуклеиновой кислоты, не содержащей белка. Впервые существование двух основных типов нуклеиновых кислот, известных сейчас как рибонуклеиновая и дезоксирибонуклеиновая кислоты, было констатировано уже в самых первых работах Мишера и Косселя. Позднее это было подтверждено работами Хаммарстена, Джонса, Левина и других. История развития исследований в этой области связана с большим количеством споров. Так, например, в 1899 г. возникла полемика, временами слишком ожесточенная, по поводу описанной Бангом «гуаниловой кислоты», которая была охарактеризована им как комплекс, состоящий из четырех молекул гуанина, четырех соединенных вместе фосфатных групп, трех глицериновых остатков и трех пентоз. Большие расхождения во мнениях обнаружились в споре между приверженцами тринуклеотидной теории нуклеиновых кислот, выдвинутой Штейделем и сторонниками тетрануклеотидной теории Левина в интерпретации Джонса; но еще более ожесточенная дискуссия происходила между Левиным (США), Гулландом (Великобритания) и Бредерекком (Германия) по поводу апокрифической гуанинуридилевой кислоты [4—11]. Чрезмерное стремление к упрощению слишком часто имело успех при отсутствии надежных экспериментальных доказательств; с точки зрения сложности рассматриваемых проблем и имеющихся в то время в распоряжении методов это мало удивительно.

Хотя инозиновая кислота была открыта еще в 1847 г. Либихом [12] (структура ее была полностью определена только 90 лет спустя), вторая главная ветвь химии нуклеотидов начала развиваться с тех пор, как в 1927 г. Эмбден и Циммерман [13] выделили мышечную адениловую кислоту, а двумя годами позже Ломанн

[14], а также Фиске и Саббароу [15] изолировали аденозинтрифосфат. Эта группа веществ, неточно классифицированная как нуклеотидные коферменты, в последнее десятилетие значительно пополнилась новыми соединениями. В это время были получены дополнительные сведения о значимости аденозин-5'-трифосфата в большем числе биохимических реакций, которые не потеряли своего значения с открытием ди- и трифосфатов других нуклеозидов. В настоящее время методы выделения, характеристики и синтеза этих соединений стали обычным явлением, а всего пятнадцать лет назад попытки химического синтеза аденозинтрифосфата казались нелепыми и тщетными.

Литература

1. Miescher F., Hoppe-Seyler's Med. chem. Unters., 1871, 441.
2. Altmann R., Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1889, 524.
3. Kossel A., Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt., 1891, 181.
4. Bredereck H., Richter G., Chem. Ber., 69, 1129 (1936).
5. Bredereck H., Köthnig M., Lehmann G., Chem. Ber., 71, 2613 (1938).
6. Bredereck H., Fortschr. Chem. org. Naturstoffe, 1, 121 (1938).
7. Bredereck H., Berger E., Richter F., Chem. Ber., 74, 338 (1941).
8. Tipson R. S., Levene P. A., J. Biol. Chem., 127, 105 (1939).
9. Tipson R. S., Levene P. A., Chem. and Ind., 58, 1010 (1939).
10. Falconer R., Gulland J. M., Hobday G. I., Jackson E. M., J. Chem. Soc., 1939, 907.
11. Gulland J. M., Chem. and Ind., 59, 321 (1940).
12. Liebig J. von, Ann., 62, 257 (1847).
13. Embden G., Zimmermann M., Z. physiol. Chem., 167, 137 (1927).
14. Lohmann K., Naturwissenschaften, 17, 624 (1929).
15. Fiske C. H., Subbarow Y., Science, 70, 381 (1929).

ХИМИЯ НУКЛЕОЗИДОВ*

Название *нуклеозид*, введенное Левиным и Джекобсом в 1909 г., сначала относилось к углеводным производным пуринов, выделенным из щелочных гидролизатов дрожжевой рибонуклеиновой кислоты [1].

ВЫДЕЛЕНИЕ

Нуклеозиды могут быть получены как ферментативным, так и химическим путем из любого встречающегося в природе нуклеотидного материала. Однако главным источником получения этих гликозидов служат нуклеиновые кислоты, выделяемые из различных тканей и организмов. Расщепление рибонуклеиновой кислоты до смеси входящих в ее состав нуклеозидов может быть достигнуто различными способами, среди которых следует упомянуть гидролиз разбавленным раствором аммиака при повышенной температуре [2], кипячение в течение нескольких дней с водным пиридином [3] и гидролиз, катализируемый ионами различных металлов [4]. Предложенный недавно метод [5] основан на кипячении рибонуклеиновой кислоты (или моонуклеотида) с водным раствором формамида в течение нескольких часов при pH 4. Разделение и выделение нуклеозидов было в значительной степени улучшено благодаря использованию ионообменных методов [6].

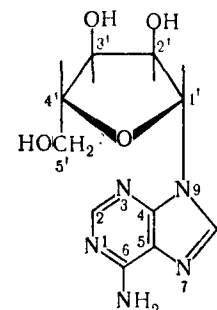
Химические методы гидролиза дезоксирибонуклеиновых кислот до дезоксинуклеозидов оказались по ряду причин непригодными, поэтому для этой цели приходится использовать [7] довольно трудоемкий путь ферментативного гидролиза с помощью дезоксирибонуклеазы, диэстеразы и монофосфатазы. И в этом случае старые методы разделения значительно упростились с введением ионообменной хроматографии [8].

Некоторые нуклеозиды, включая обладающие антибиотической активностью, встречаются в природе в свободном состоянии. Они могут быть экстрагированы непосредственно без предварительного гидролиза.

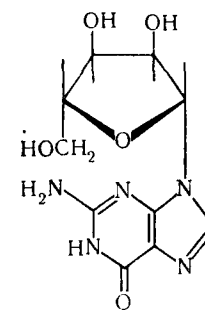
* Как и в случае пуринов, для замещенных пиримидина используется более старая система нумерации. Вероятно, есть некоторый смысл в отклонении от стандартных правил в номенклатуре для пуринов, но не для пиримидинов.

СТРОЕНИЕ

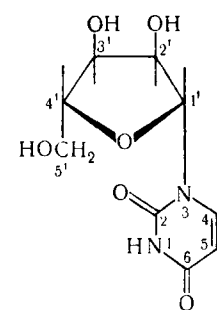
Основными нуклеозидами, полученными из рибонуклеиновых кислот, являются производные пурина — аденозин и гуанозин — и рибозилпиримидины — цитидин и уридин. Кроме того, некото-



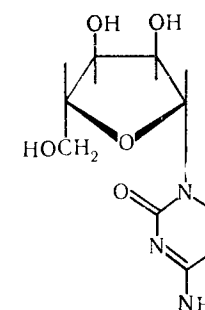
Аденозин



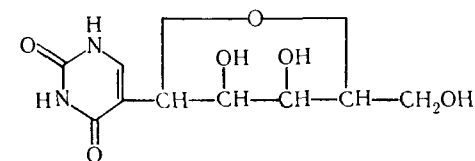
Гуанозин



Уридин



Цитидин



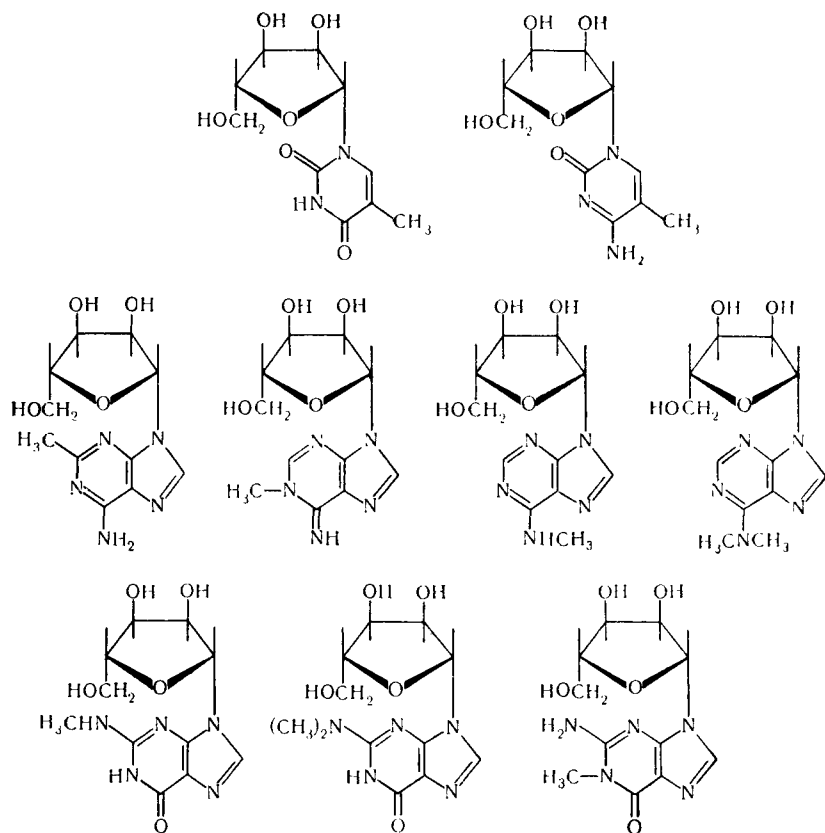
Псевдоуридин

Основные рибонуклеозиды

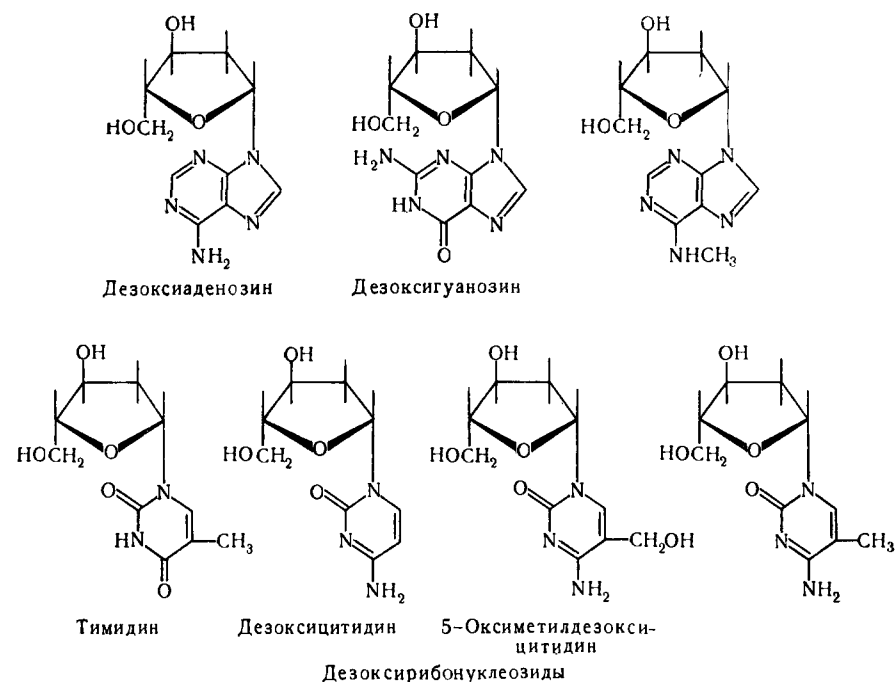
рые рибонуклеиновые кислоты содержат в относительно большом количестве изомер уридина — псевдоуридин. Содержание других рибонуклеозидов в составе нуклеиновых кислот незначительно. Сюда относятся рибонуклеозиды, производные метилированных пуринов и пиримидинов, включая тимин, 5-метилцитозин, 1-метил-

аденин, 2-метиладенин, 6-метиламинопурин, 6-диметиламинопурин, 1-метилгуанин, 6-окси-2-метиламинопурин и 6-окси-2-диметиламинопурин (нуклеозиды так называемых минорных оснований) [9]. Были также выделены нуклеозиды, замещенные при гидроксильной группе сахара в положении 2' [10, 11] и представляющие собой, вероятно, 2'-О-метилпроизводные.

Основными нуклеозидами дезоксирибонуклеиновой кислоты являются дезоксиаденин, дезоксигуанозин, дезоксицитидин и тимидин. Исключение составляют дезоксирибонуклеиновые кислоты чётно нумерованных бактериофагов *Escherichia coli* T, в которых цитозин полностью замещен 5-оксиметилцитозином [12] (или 5-гликозидом 5-оксиметилцитозина). В некоторых дезоксинуклеиновых кислотах встречается дезоксирибозил-5-метилцитозин, в част-



Минорные рибонуклеозиды



ности в дезоксинуклеиновых кислотах из зародышей пшеницы [13, 14], а в дезоксирибонуклеиновых кислотах различных бактерий и бактериофагов были обнаружены небольшие количества дезоксирибозил-6-метиламинопурина [15].

Из некоторых дезоксинуклеиновых кислот был выделен дезоксиуридин [16], который, скорее всего, является артефактом, образующимся в результате дезаминирования соответствующего цитозинового производного*.

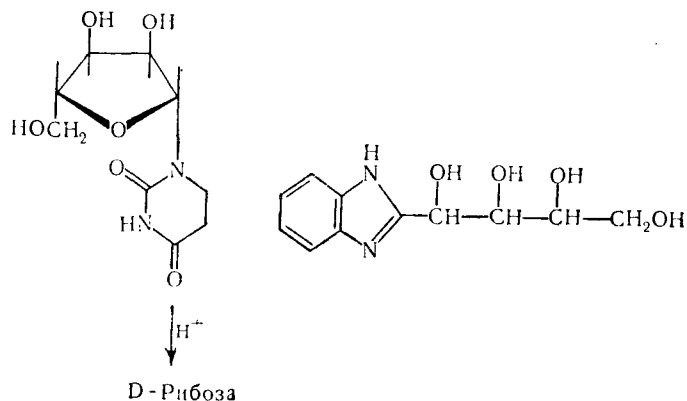
При установлении структуры нуклеозидов требуется определить а) природу основания, б) природу сахара, в) тип связи и место присоединения сахара к основанию, г) циклическую структуру сахара и д) конфигурацию гликозидного центра.

Так как основания «классических» рибонуклеозидов — аденозина, гуанозина, цитидина и уридина — легко образуются при кислотном гидролизе, они уже давно были идентифицированы как аденин, гуанин, цитозин и урацил соответственно [17]. Анало-

* Совсем недавно было обнаружено, что в ДНК бактериофага SP2 *Bacillus subtilis* тимин полностью замещен урацилом; в другом бактериофаге этого же хозяина вместо тимина присутствует 5-оксиметилурацил [369].

гично после кислотного гидролиза были выделены и идентифицированы основания, присутствующие в дезоксинуклеозидах и в других «неклассических» рибонуклеозидах (за исключением псевдоуридина). В настоящее время идентификация оснований путем сравнения с известными пуринами и пиримидинами может быть проведена с очень небольшими количествами вещества, если использовать ультрафиолетовые спектры поглощения при различных значениях pH, хроматографию и электрофорез на бумаге, а также ионообменную хроматографию — методы, которые в значительной степени облегчили обнаружение и выделение и таких пуриновых и пиримидиновых оснований, которые присутствуют в нуклеиновых кислотах в незначительных количествах.

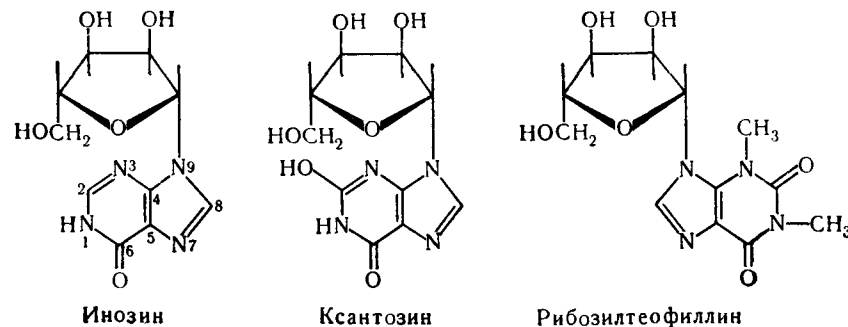
Углеводный фрагмент аденозина и гуанозина оставался неидентифицированным до 1911 г., когда Левин и Джекобс выделили его в кристаллической форме и охарактеризовали как D-рибозу, в то время еще не известную [18]. Значительные трудности возникли при исследовании уридина и цитидина, так как для расщепления гликозидной связи в этих соединениях требуются очень жесткие условия, при которых освободившийся сахар расщепляется далее. Однако если эти нуклеозиды предварительно прогидрировать, то образующийся гликозил-4,5-дигидропиримидин удастся далее прогидролизовать разбавленной кислотой до D-рибозы; кроме того, было найдено, что одновременный гидролиз и окисление уридина бромистоводородной кислотой и бромом дает D-рибовую кислоту [19]. Гуланд с сотрудниками [20] подтвердил наличие D-рибозы во всех четырех нуклеозидах, превратив сахарные фрагменты в D-рибобензимидазол; правда, это доказательство несколько сомнительно из-за возможных реакций эпитеризации. До сих пор никакой другой сахар, кроме D-рибозы, не был обнаружен ни в одном нуклеозиде, производном рибонуклеиновой кислоты.



При определении структуры углеводной компоненты в дезоксирибонуклеозидах столкнулись с еще большими трудностями. В тех же условиях гидролиза, которые использовались для пуриновых рибонуклеозидов, неизменно образовывалась левулиновая кислота, поэтому некоторое время считали, что сахар является гексозой. Однако Левин с сотрудниками в конце концов выделил кристаллическую дезоксипентозу, проведя кислотный гидролиз дезоксигуанозина в чрезвычайно мягких условиях [21].

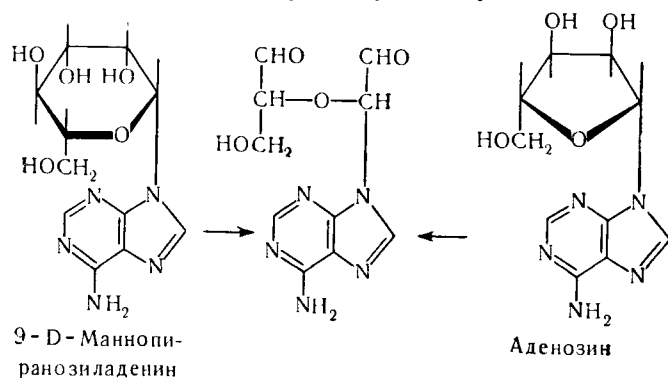
Этот сахар не образовывал озазона, обладал многими свойствами, характерными для 2-дезоксисахаров, и оказался идентичным синтетической L-2-дезоксирибозе, за исключением того, что его удельное вращение было таким же по величине, но противоположным по знаку [22]. Позднее после соответствующей обработки [23] дезоксирибонуклеиновой кислоты был выделен кристаллический бензилмеркаптал D-2-дезоксирибозы [24] и, кроме того, было показано, что сахар пуриновых дезоксинуклеозидов ряда дезоксинуклеиновых кислот (выделенных из разных источников) идентичен хроматографически 2-дезоксирибозе [24]. Восстановление тимидина и дезоксицитидина натрием в этиловом спирте или амальгамой натрия в воде с последующим кислотным гидролизом в мягких условиях приводит также к D-2-дезоксирибозе [25—27]. Из дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезоксицитидина и тимидина был получен бензилфенилгидразон D-2-дезоксирибозы [28]. Вследствие отсутствия других данных общепринято, что в дезоксирибонуклеиновых кислотах сахар является D-2-дезоксирибозой.

Быстро протекающий кислотный гидролиз пуриновых нуклеозидов свидетельствует о том, что сахар связан с основанием не с помощью связи C—C, а образует с ним циклический N-гликозид, причем в аденозине и гуанозине не допускалась возможность связи через аминогруппы, так как оба вещества могли дезаминироваться (до инозина и ксантозина соответственно) без потери остатка сахара. Так как можно прометиловать ксантозин до рибозилтео-

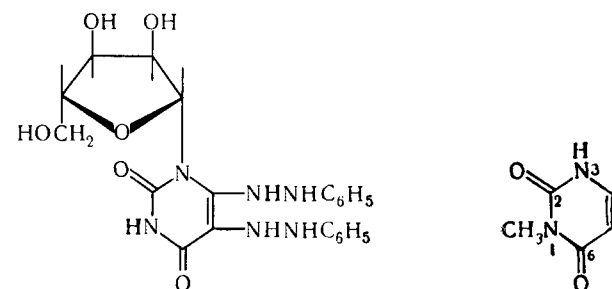


филлина, положения 1 и 3 также исключались; оставались только атомы азота в положении 7 и 9 как возможные места связи [29].

Ультрафиолетовые спектры поглощения ксантина отличны от спектров 7-метилксантина (а также от спектров 1- или 3-метилксантина) и они довольно близки к спектрам 9-метилзамещенных ксантина. Аналогично ультрафиолетовые спектры поглощения аденозина, инозина и гуанозина очень близки к спектрам 9-метиладенина, 9-метилгипоксантина и 9-метилгуанина соответственно, но не похожи на спектры 7-метилпроизводных [30—32]. Эти результаты ясно показывают, что пуриновые нуклеозиды представляют собой 9-рибозилпурины; это справедливо также для дезоксиаденозина и дезоксигуанозина, так как ультрафиолетовые спектры этих веществ почти идентичны со спектрами аденозина и гуанозина. Подтверждением того, что в пуриновых нуклеозидах сахар находится в положении 9, служит однозначный синтез 9-D-маннопиранозиладенина, проведенный Тоддом с сотрудниками [33]. При периодатном окислении этого нуклеозида образуется диальдегид, идентичный диальдегиду, полученному из аденозина.



При дезаминировании цитидина образуется уридин, откуда следует, что сахар не может быть связан с аминогруппой, находящейся в положении 6, а бромирование (или нитрование) уридина до 5-бром- (или 5-нитро)производного исключает наличие связи в положении 5. При действии фенилгидразина на уридин, предварительно обработанный бромом, получается 4,5-дифенилгидраинуридин, что указывает на отсутствие заместителей в уристине и в положении 4. Известная неустойчивость O²-гликозидов урацила к разбавленным кислотам свидетельствует о возможности существования гликозидной связи только через атомы N-1 и N-3 [34]. Метилирование 2',3'-ди-O-ацетил-5'-O-тритуридина диазометаном привело к образованию N-метилированного производного, которое при гидролизе



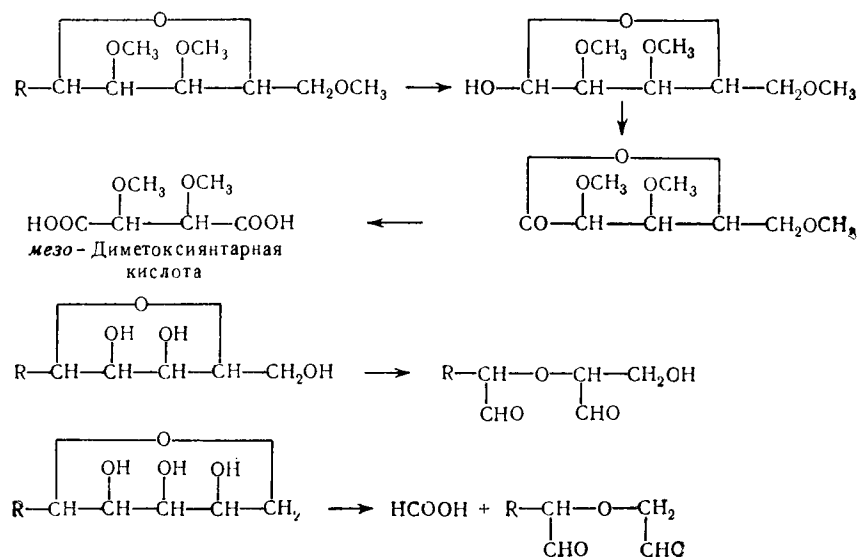
расщеплялось с образованием 1-метилурацила; следовательно, уридин и цитидин представляют собой 3-гликозиды [35].

Выделение 1-метилтимина из продуктов гидролиза метилированной дезоксирибонуклеиновой кислоты указывает, но не доказывает, что тимидин является также 3-гликозилпиримидином [36]. Сходство же ультрафиолетовых спектров поглощения цитидина и дезоксцитидина служит доказательством строения последнего. Описанные ниже методы синтеза и взаимопревращения этих нуклеозидов также подтверждают их структуру. Строение псевдоуридина (природного рибозилпиримидина, содержащего C—C-гликозидную связь) будет обсуждаться отдельно.

Фуранозная структура рибозного остатка в аденозине, гуанозине и уристине (а следовательно, и в цитидине) была убедительно доказана Левиным и Типсоном [37]. В результате одновременного метилирования и дезацетилирования три-O-ацетиладенозина образовывался три-O-метил-N-метиладенозин, из которого при кислотном гидролизе получался 6-метиламинопурин и триметилрибоза, идентифицированная как 2,3,5-триметил-D-рибофураноза. При ее окислении сначала образовался триметил-γ-D-рибонолактон и затем мезо-диметоксиглуктарная кислота. Те же продукты были получены при окислении метилированных гуанозина и дигидроуридина. Последующий синтез 2,3,5-триметил-D-рибофуранозы послужил окончательным доказательством предполагаемых структур [38] (см. формулы на стр. 20).

Более удобным методом доказательства рибофуранозной структуры кольца сахара в нуклеозидах является периодатное титрование [39]. На окисление пентафуранозного производного до диальдегида затрачивается 1 моль периодата, как и при окислении природных рибонуклеозидов; на окисление же пиранозных изомеров требуется 2 моля периодата, причем освобождается 1 моль муравьиной кислоты. Кроме того, периодатное титрование показало отсутствие двух соседних гидроксильных групп в тимидине, дезоксцитидине, дезоксигуанозине и дезоксинозине (полученном дезаминированием дезоксиаденозина), и, следовательно, эти дезоксинуклеозиды имеют фуранозную

структуру [40]. Эти данные согласуются также с тем, что они не увеличивают электропроводности раствора борной кислоты (проба Бёзекена для обнаружения *цис*-1,2-гликольных группировок) [41, 42].

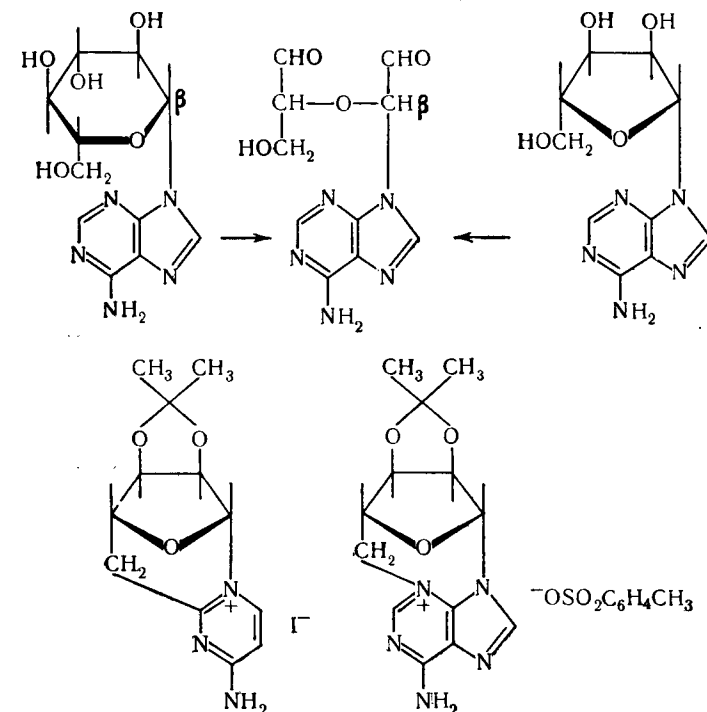


Синтезы тимидина, дезоксиуридина и дезоксиаденозина неопровержимо доказывают фуранозную природу сахара.

Конфигурация гликозидного центра в природных нуклеозидах оставалась неясной до 1946 г., когда Тодд с сотрудниками [43] показал, что диальдегид, полученный при периодатном окислении аденозина, идентичен диальдегиду, образующемуся при периодатном окислении 9-β-D-глюкопиранозиладенина, β-конфигурация которого была установлена синтезом этого соединения из α-ацетобром-D-глюкозы.

Сравнение диальдегидов, образующихся из уридина и цитидина при периодатном окислении, с диальдегидами, полученными соответственно из 3-β-D-глюкопиранозилурацила и 3-β-D-глюкопиранозилцитозина, позволило установить, что уридин и цитидин представляют собой β-(D)-гликозиды. Благодаря открытию 5'-циклонуклеозидов, производных цитидина и аденозина, появился еще один метод доказательства β-(D)-конфигурации этих нуклеозидов. Вследствие стерических затруднений циклизация с участием 5'-гидроксильной группы может протекать только для соединений, обладающих β-(D)-конфигурацией [44]. Образование 5'-циклонуклеозидов из уридина и гуанозина, а также из тимидина, дезокситимидина и дезоксиаденозина служило доказательством конфигурации этих

нуклеозидов, и весьма вероятно, что нуклеиновые кислоты целиком построены из β-D-гликозидных мономеров.



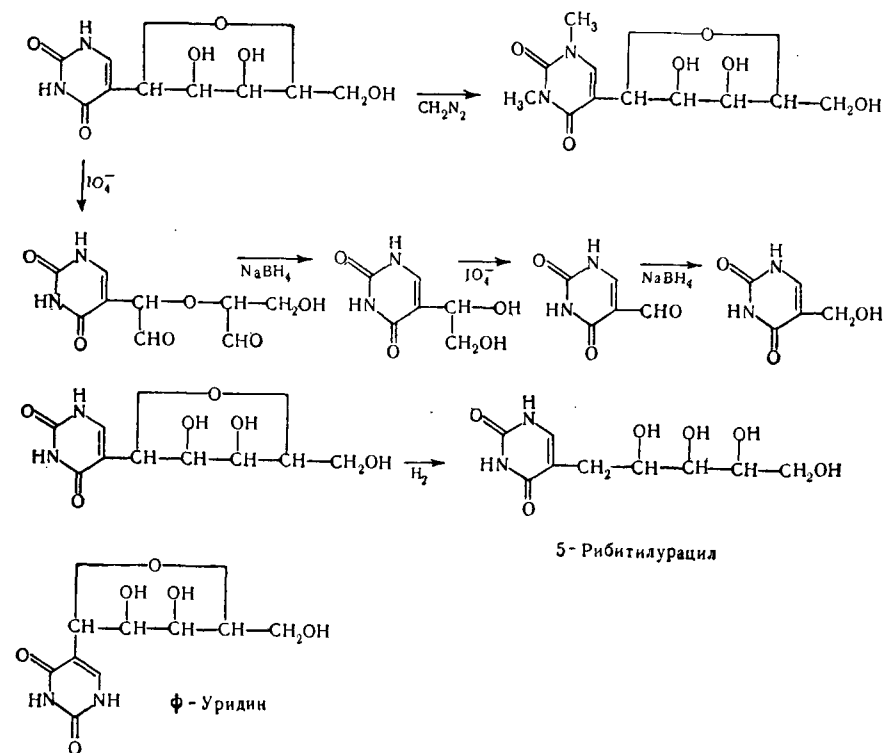
Рентгеноструктурный анализ ряда рибо- и дезоксирибонуклеозидов и их производных полностью подтвердил выясненные с помощью химических методов черты их строения. Кроме того, изучение дифракции рентгеновских лучей позволило получить дополнительные данные: было показано, что не совсем плоское кольцо сахара располагается почти перпендикулярно к плоскому кольцу пурина (или пиримидина), причем гликозидная связь лежит в плоскости основания [45]. С помощью инфракрасных спектров поглощения, в частности спектров растворов нуклеозидов в тяжелой воде, была получена информация о таутомерном строении оснований в различных условиях [46, 47].

ПСЕВДОУРИДИН

Кроме обычных «минорных» нуклеотидов, идентифицированных в последние годы [9, 48—53], был выделен «пятый» компонент, присутствующий в «растворимых» рибонуклеиновых кислотах в зна-

чительных количествах. Этот компонент необычен тем, что к нему оказались не применимы общепринятые методы определения структуры. Нуклеотид, выделенный из дрожжевой рибонуклеиновой кислоты после обработки последней рибонуклеазой (или в результате щелочного гидролиза в виде смеси 2'- и 3'-фосфатов), мог быть превращен в 2',3'-циклофосфат, который чувствителен к действию рибонуклеазы. Учитывая специфичность рибонуклеазы, было сделано предположение, что изучаемое соединение представляет собой производное пиримидина. Действительно, было найдено, что свободный нуклеозид имеет тот же элементарный состав, что и уридин. Однако ультрафиолетовые спектры поглощения его были ближе к спектрам 5-оксиметилурацила, а не 3-гликозилурацила. Реакция с гидразином свидетельствовала о наличии рибозы, а периодатное окисление нуклеозида указывало на фуранозную структуру. Тем не менее после гидрирования или бромирования с последующей обработкой кислотой или щелочью сахар не освобождался, а свободное основание не удавалось выделить после кислотного гидролиза в жестких условиях или окисления, а также после щелочного или кислотного гидролиза диальдегида, полученного при периодатном окислении нуклеозида. Однако в результате обработки этого диальдегида бромом был получен урацил и 5-бром урацил. Изучение продуктов метилирования нуклеозида исключало возможность существования гликозидной связи в положениях 1, 2, 3 и 6 пиримидинового кольца [54—57]. Наличие этой связи у C_5 , а не у C_4 было доказано восстановлением ранее упомянутого диальдегида боргидридом натрия до продукта, который был затем окислен периодатом до альдегидурацила; после восстановления последнего был получен 5-оксиметилурацил [54, 55]. Окончательное доказательство структуры псевдоуридина как 5-рибофуранозилурацила было получено с помощью спектров ядерного магнитного резонанса, которые показали наличие C_4 -протона и отсутствие C_5 -протона. Кроме того, были замечены изменения в характере протонов у C_4 и C_1' при переходе от связи $C_5 - C_1'$ в псевдоуридине к $N_3 - C_1'$ -связи в уридине [54, 55]. В соответствии с этой структурой при метилировании свободного нуклеозида диазометаном легко образуется диметил-(т. е. N^1 и N^3)-псевдоуридин. Уридин в этих же условиях дает только N^1 -метилуридин [54, 55]. Действие ультрафиолетовых лучей на водные растворы псевдоуридина аналогично их действию на тимин, а не на уридин, для которого фотолиз (по-видимому, связанный с присоединением воды по 4,5-двойной связи) происходит необратимо [58].

При действии щелочи на псевдоуридин образуются изомерные нуклеозиды. Обработка псевдоуридиновой кислоты кислотой приводит к образованию довольно большого числа изомеров, что обусловлено мутаротацией (образование смеси α - и β -изомеров), взаимо-

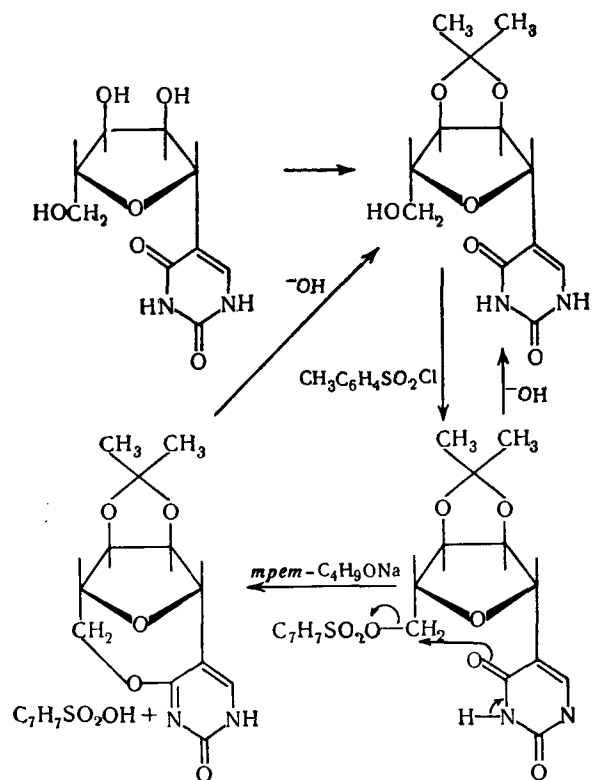


превращениями фуранозной, пиранозной и ациклической форм, а также миграцией фосфатного остатка [55].

Псевдоуридин дает с орцином характерную для нейраминовой кислоты реакцию, в то время как дигидронуклеозид, сохраняющий поглощение в ультрафиолетовой области, не дает этой реакции. Поэтому дигидропсевдоуридин представляет собой 5-рибитилурацил и восстановление является, скорее всего, гидрогенолизом, а не насыщением 4,5-двойной связи (ср. гидрогенолиз аллилового и бензильного эфиров и 5-оксиметилурацила) [54].

Псевдоуридин (встречающийся в природе изомер) был синтезирован в результате реакции между 2,6-диметоксипиримидин-5-литием (полученным обработкой 2,6-диметокси-5-бромуридина *n*-бутиллитием) и 2,3,5-три-*O*-бензоил-*D*-рибофуранозилхлоридом с последующим снятием защитных групп и разделением четырех возможных изомеров (α и β фуранозиды и пиранозиды) [59]. Несмотря на чрезвычайно низкий выход, этот синтез еще раз подтвердил принятую для этого нуклеозида структуру 5-*D*-рибофуранозида.

То, что гликозидный центр природного псевдоуридина имеет β -D-конфигурацию, было доказано получением толуолсульфопроизводных 2',3'-изопропилиденпсевдоуридина. В отличие от толуолсульфонатов простых первичных спиртов полученное 5'-О-толуолсульфопроизводное легко гидролизуется до изопропилиденпсевдоуридина при действии разбавленной щелочи (обусловлено действием «соседней» кетогруппы, находящейся в положении 6 агликона), тогда как при обработке *трет*-бутилатом натрия образуется циклонуклеозид, а именно 2',3'-изопропилиден-О⁶,5'-циклопсевдоурдин [60]. Он обладает характерным ультрафиолетовым спектром



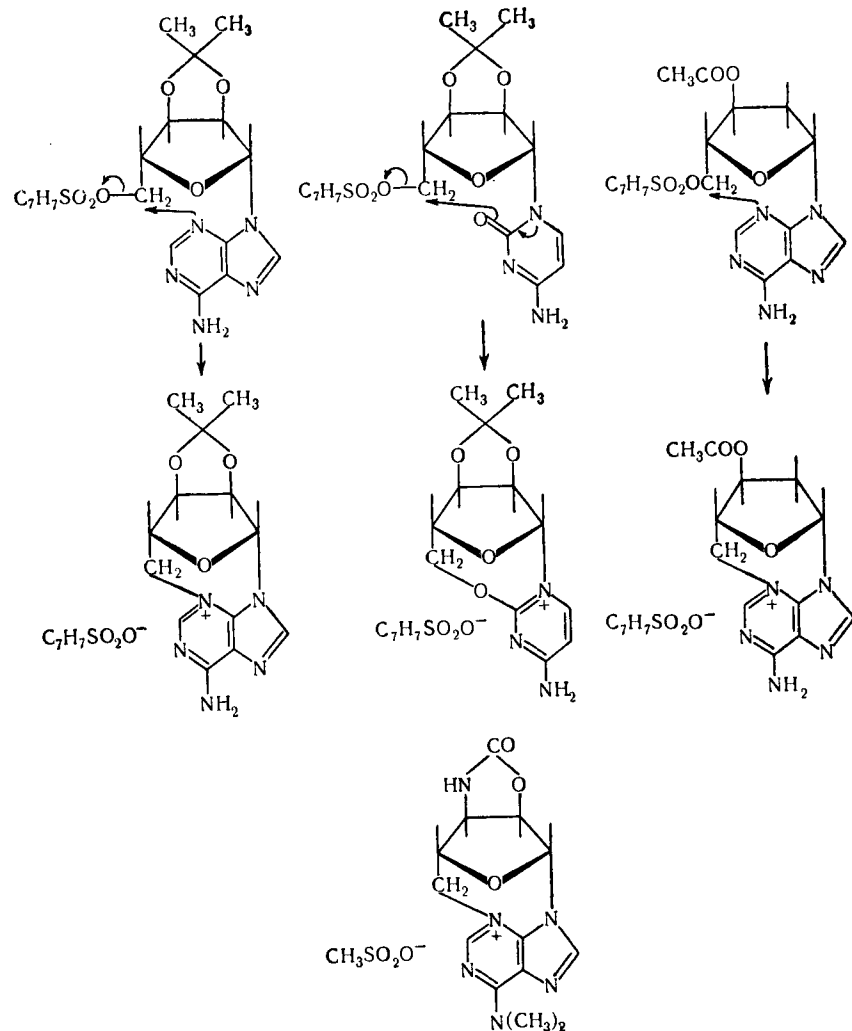
поглощения и при щелочном гидролизе вновь превращается в изопропилиденпсевдоуридин. Как и в случае О²,5'-циклонуклеозидов, образование кольца между атомами С₅ и О₆ может протекать только для β -нуклеозида.

ЦИКЛОНУКЛЕОЗИДЫ *

Превращение некоторых эфиров нуклеозидов в производные циклонуклеозидов впервые наблюдали в 1951 г., когда было найдено, что 5'-О-*n*-толуолсульфонил-2',3'-О-изопропилиденаденозин легко изомеризуется в тозилат ионной природы, особенно при нагревании растворов исходного ковалентного соединения [44]. Ультрафиолетовые спектры поглощения и определение молекулярного веса криоскопическим методом обнаружили внутримолекулярное алкилирование адениновой части молекулы. Исследование соответствующего иодида методом рентгенографии четко показало, что образуется новое кольцо и что ионный тозилат является тозилатом 2',3'-О-изопропилиден-N³,5'-циклоаденозина [44]. Незащищенный циклонуклеозид был получен через 5'-О-*n*-толуолсульфониладенозин [61]. Аналогично нагревание раствора ковалентного 5'-О-*n*-толуолсульфонил-2',3'-О-изопропилиденцитидина приводит к ионному тозилату 2',3'-О-изопропилиден-О²,5'-циклоцитидина, что было обнаружено по изменению ультрафиолетовых спектров поглощения и с помощью кислотного гидролиза этого соединения до цитидина [44] (см. схему на стр. 26).

Таким же образом были получены циклонуклеозиды из 3'-О-ацетил-5'-О-*n*-толуолсульфонил-2'-дезоксиаденозина и из 5'-О-*n*-толуолсульфонил-2'-дезоксцитидина [62]. Как и в случае рибонуклеозидов, протекающая в этих случаях циклизация служит доказательством β -конфигурации гликозидного центра. Аналогично образование соли циклонуклеозида из 5'-О-метансульфонилового эфира пурамицина свидетельствует о β -гликозильной природе этого антибиотика [63]. По-видимому, в этих случаях внутримолекулярное алкилирование облегчается отчасти основным характером пуринового или пиримидинового кольца; нуклеофильная атака при С₅ зависит также и от силы кислоты, которой этерифицирован гидроксил сахара. Так, например, 5'-О-*n*-толуолсульфонильные производные инозина, уридина и тимидина до некоторой степени устойчивы к циклизации, а N⁶,3'-О-диацетил-5'-*n*-толуолсульфонил-2'-дезоксцитидин заметно более устойчив, чем соответствующее деацетилированное соединение. При нагревании или при обработке бензилатом натрия в бензиловом спирте 2',3'-О-изопропилиденгуанозин-5'-ди-(*n*-нитрофенил)фосфат легко подвергается внутримолекулярному алкилированию, давая производное циклогуанозина

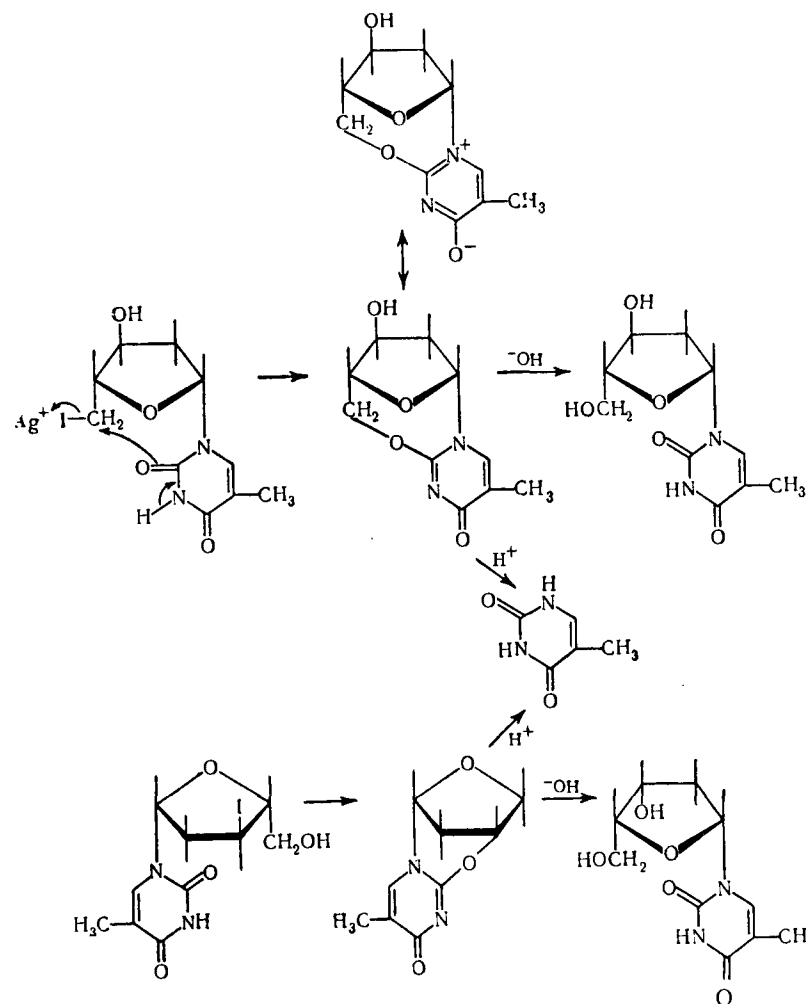
* Следует предпочесть первоначальный термин «цикло» термину «ангидро», введенному Фоксом и Вемпеном [Advances in Carbohydrate chemistry, 14, 283 (1959)]. В химии углеводов «ангидро» имеет несколько значений, но редко применяется в случае аминзамещенных или алкиловых (арильных) эфиров. С другой стороны, термин «цикло» используется в обычном смысле, как в случае циклодекстринов.



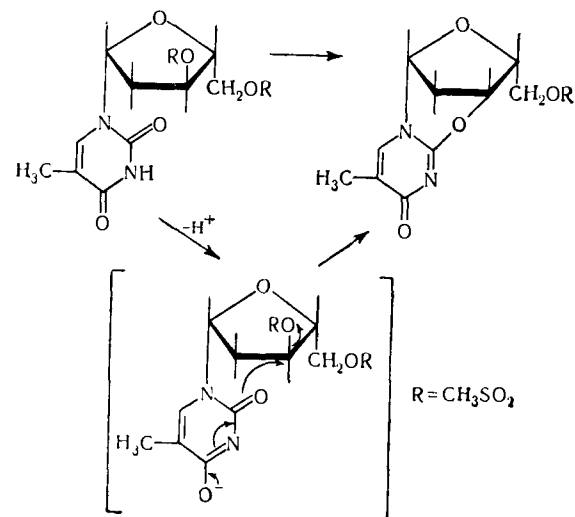
[64]; фосфаты $O^2,2'$ -циклоуридина и $O^2,2'$ -циклоцитидина были получены обработкой соответствующего нуклеозида полифосфорной кислотой [65].

Методы получения циклических производных нуклеозидов, имеющих менее основной характер, стали развиваться с тех пор, как было обнаружено, что при обработке 5'-иод-5'-дезокситимидина ацетатом серебра (в присутствии основания) получается, как свидетельствуют физические свойства, соответствующий $O^2,5'$ -циклотимидин [66]. Щелочной гидролиз его дает тимидин,

тогда как при кислотном гидролизе происходит разрыв как гликозидной, так и $O^2,5'$ -эфирной связи с образованием тимина. Нестабильность связи $N_3 - C_1'$, замеченная ранее у $O^2,5'$ -цикло-2'-дезокситимидина, который в отличие от производных рибозы настолько неустойчив, что не поддается выделению, обусловлена, вероятно, наличием CH_2 -группы в β -положении к положительно заряженному азоту. Подобным же образом 3'-иод-3'-дезокситимидин при действии на него ацетата серебра подвергается циклизации с образованием $O^2,3'$ -циклотимидина. Последний при щелочном гидролизе



легко превращается в 3-β-D-2'-дезоксифуранозилтимин, а при действии кислоты — в смесь тимина и углевода. С помощью молекулярных моделей было показано, что по легкости образования циклонуклеозидов соединения располагаются в следующем



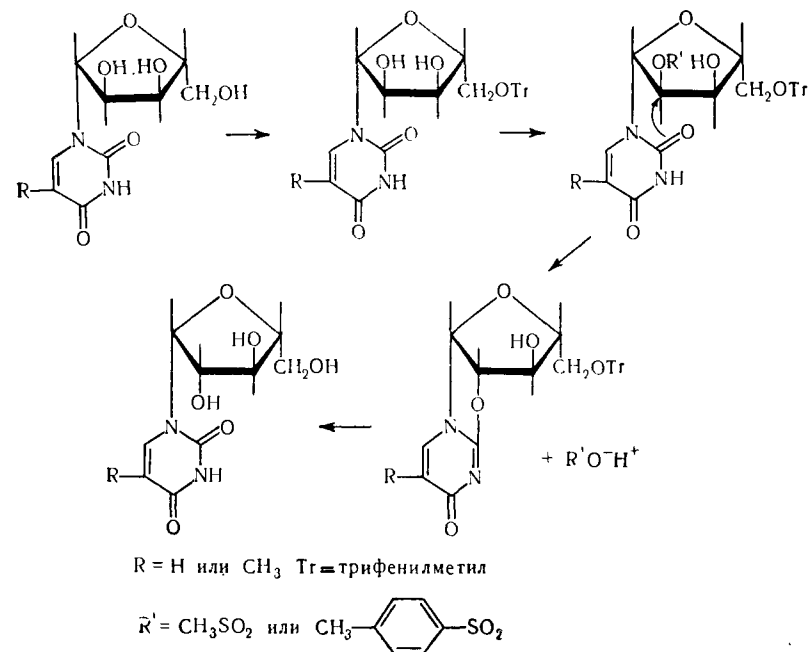
порядке: $O^2,3' > O^2,5'$, а в случае соединений рибозы $O^2,2'$ -циклизация должна быть еще более легкой. Оказалось, что это действительно имеет место и что до некоторой степени такой же порядок сохраняется и в отношении устойчивости соединений к раскрытию кольца [66]. Так, 5'-О-сульфонилпроизводные тимидина инертны к действию слабых оснований, 3'-эфиры тимидина легко превращаются в этих условиях в циклонуклеозиды. При действии на 3',5'-ди-О-метансульфонилтимидин спиртового раствора аммиака образуется 5'-О-метансульфонил- $O^2,3'$ -циклотимидин [66].

Позднее было показано, что производные 5'-иод-5'-дезоксипуридина также легко циклизуются при действии ацетата серебра, хотя ни 5'-О-толуол-*n*-сульфонуридин, ни 5'-иод-5'-дезоксипуридин не дают циклических соединений ни при нагревании, ни при действии некоторых оснований [67].

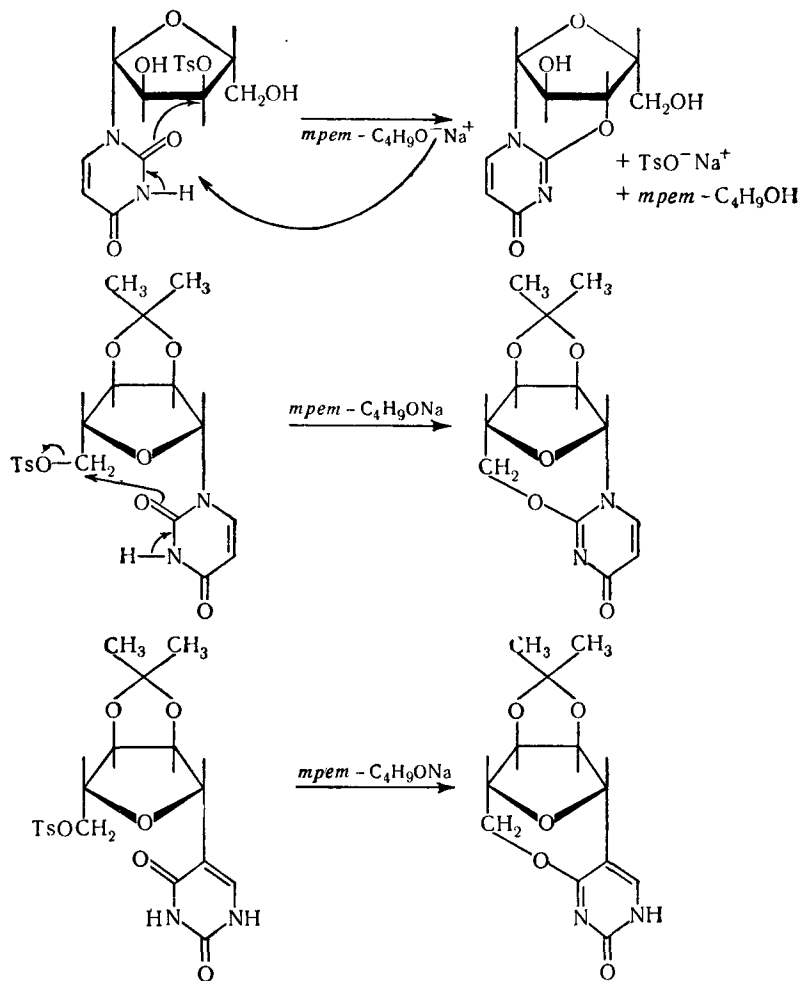
В противоположность быстрому превращению производных 3'-О-метансульфонилтимидина в $O^2,3'$ -циклонуклеозиды под действием спиртового раствора аммиака 3'-О-*n*-толуолсульфонуридин не циклизуется при действии этого реагента. Однако подобная обработка 3',5'-ди-О-ацетил-2'-О-*n*-толуолсульфонуридина дает $O^2,2'$ -циклоуридин [68]. Аналогичные $O^2,2'$ -циклонуклеозиды были получены из 2'-О-метансульфоновых эфиров 3-β-D-рибофурано-

зилтимина [69] и 3-β-D-ксилофуранозилтимина [70]. Циклизация 5'-О-третил-2'-О-метансульфонил-5-метил-2-тиоуридина с образованием $S^2,2'$ -циклопроизводного протекает, как этого и следовало ожидать, очень легко [71], так как при нуклеофильной атаке атома S_2 , происходящей с отщеплением метансульфонат-иона, тиокарбонильная группа должна быть еще более эффективной, чем карбонильная группа. Общий и удобный метод получения $O^2,2'$ -циклонуклеозидов из рибозилпиримидинов заключается в непосредственном действии сульфлирующих агентов на 5'-О-третил-(или ацетил)-нуклеозиды с последующей обработкой сырого продукта спиртовым раствором аммиака, причем в качестве промежуточного продукта образуется главным образом 2'-О-сульфонилзамещенное, хотя может получаться также и небольшое количество 3'-изомера.

5'-О-Сульфонилпроизводные как тимина, так и уридина легко превращаются в $O^2,5'$ -циклонуклеозиды при действии *tert*-бутилата натрия, при этом замещение сульфонилоксигруппы при нуклеофильной атаке 2-карбонильной группой агликона атома C_5' облегчается вследствие удаления протона из пиримидинового основания [72]. Этот реагент также успешно применялся при циклизации 3'-О-*n*-толуолсульфонуридина до $O^2,3'$ -циклоуридина [72] и 5'-О-*n*-толуолсульфонил-2',3'-изопропилиденпсевдоуридина до

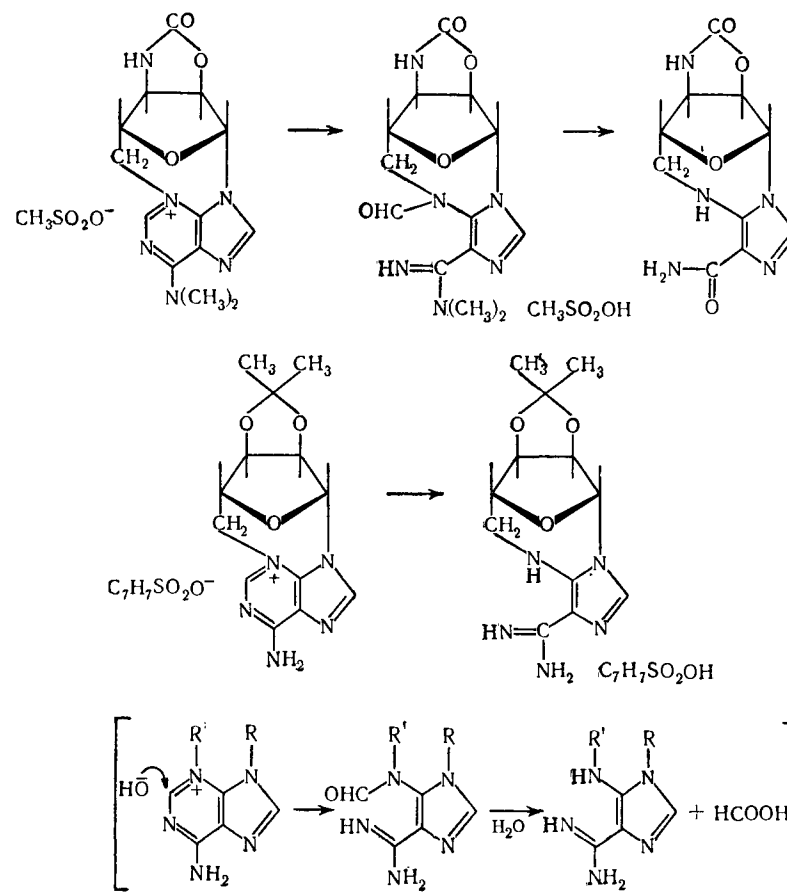


2',3'-изопропилиден-О⁶,5'-циклопсевдоуридина [60]. Бензоат натрия в диметилформамиде превращает 2',5'-ди-О-тритил-3'-О-метансульфонуридин в соответствующий О²,3'-циклонуклеозид (но не реагирует с детритилированным соединением) [73].



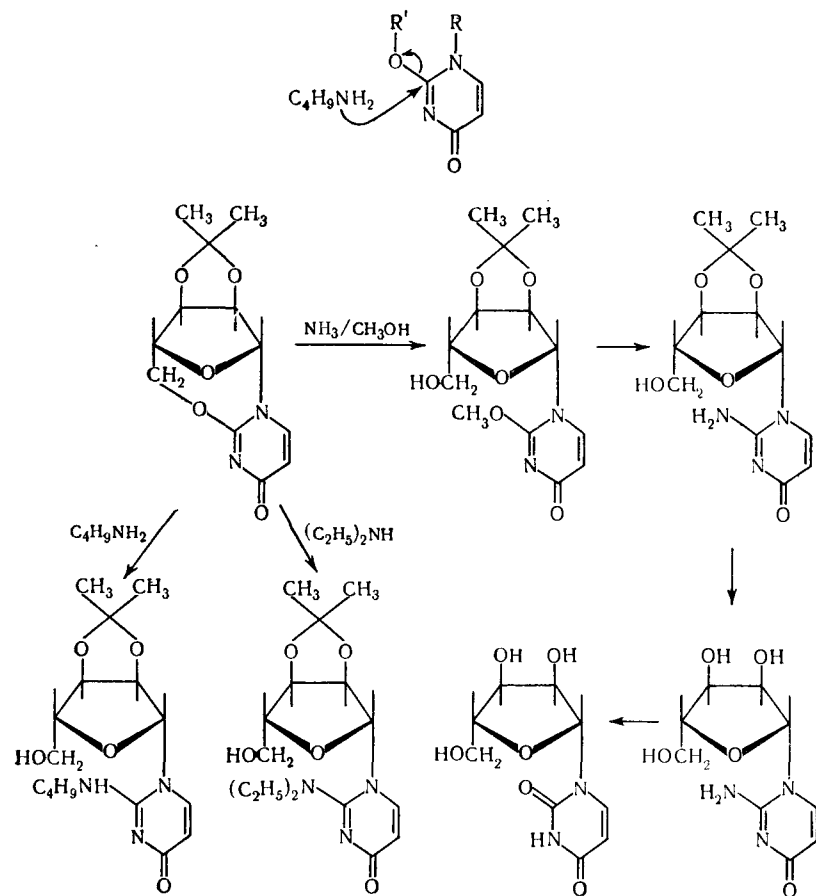
Реакционная способность циклонуклеозидов была изучена различными способами. При обработке 6-диметиламинопуринциклонуклеозида разбавленной щелочью происходит быстрый разрыв пиримидинового кольца с образованием метансульфоната 5',N⁴-

цикло-3-(2',3'-карбонил-3'-амино-3'-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-4-формамидоимидазол-5-(N,N-диметил)карбоксамидина, который при дальнейшем действии щелочи превращается в 5',N⁴-цикло-3-(2',3'-карбонил-3'-амино-3'-дезоксид-β-D-рибофуранозил)-4-аминоимидазол-5-карбоксамид [63]. Подобным образом удаление C₂ из *n*-толуолсульфоната 2',3'-изопропилиден-N³,5'-циклоаденозина при действии на него оснований приводит к образованию имидазольного производного [74].



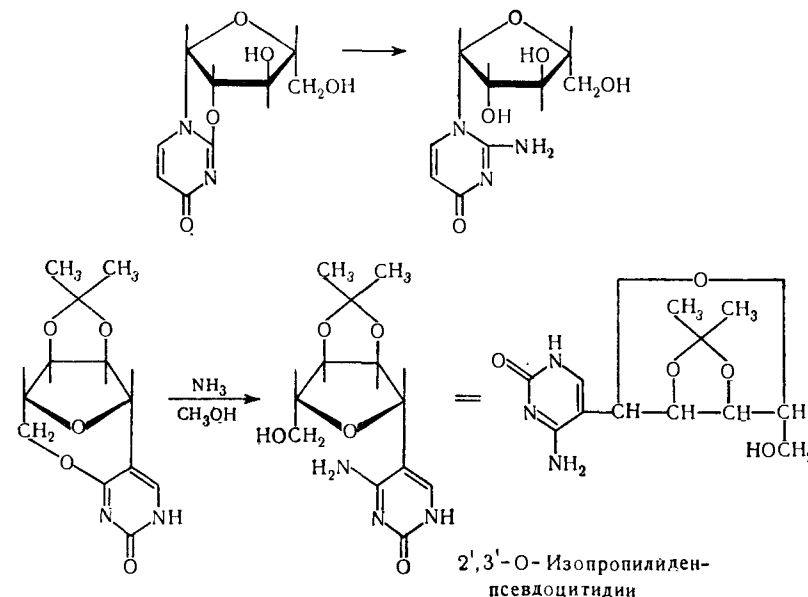
Благодаря инверсии при C₂ в процессе образования пиримидинциклонуклеозидов последние имели большое значение для синтеза *цис*-C₁ — C₂-гликозильных производных (обычно не получающихся при реакции галогенсахара с соответствующим пиримидино-

вым производным). Кроме того, циклонуклеозиды оказались очень полезными для получения 2'-дезоксинуклеозидов. Подробно изучены реакции циклоуридинов с рядом реагентов; обычно $O^2,5'$ -цикло-соединения значительно более реакционноспособны, чем $O^2,2'$ -изомеры. При действии метилового (или этилового) спирта в при-



сутствии основания на 2',3'-О-изопропилиден- $O^2,5'$ -циклоуридин получается 2',3'-О-изопропилиден- O^2 -метил(или этил)-уридин, который при дальнейшей обработке спиртовым раствором аммиака дает 2',3'-изопропилиденизоцитидин, легко превращающийся в изоцитидин, структура которого была подтверждена дезаминированием этого нуклеозида до уридина [67]. Аналогично при обработке 2',3'-О-изопропилиден- $O^6,5'$ -циклопсевдоуридина

раствором аммиака в метиловом спирте получается 2',3'-О-изопропилиденпсевдоцитидин [60]. В дальнейшем эта реакция была распространена для синтеза изопропилиден-N-бутилизоцитидина и изопропилиден-N,N-диэтилизоцитидина из соответствующего амина и 2',3'-О-изопропилиден- $O^2,5'$ -циклоуридина [75].



Подобная обработка $O^2,2'$ -циклоуридина аммиаком в метиловом спирте приводит к образованию 3-β-D-арабинофуранозилизоцитозина [76]; аналогично при гидролизе разбавленной кислотой образуется 3-β-D-арабинофуранозилурацил [68].

Раскрытие кольца происходит в результате нуклеофильной атаки атома C_2 пиримидина; кроме того, связь углерод—кислород может разрываться также благодаря нуклеофильному замещению у углеродного атома сахара. При действии на 2',3'-О-изопропилиден- $O^2,5'$ -циклоуридин сероводорода и триэтиламина получается производное 2-тиоуридина и родственные полисульфиды, тогда как реакция с более сильным нуклеофильным реагентом—этилмеркаптидом натрия—приводит к образованию 5'-дезоксис-5'-этилтио-2',3'-изопропилиденуридина [76] (см. схему на стр. 34).

Однако в тех же условиях $O^2,2'$ -циклоуридин дает 3'-дезоксис-3'-этилтиоуридин (вероятно, через 2',3'-ангидроуридин-анион), так как обработка ацетилированного продукта никелем Ренея с последующим дезацелированием приводит к 3'-дезоксуридину [76].

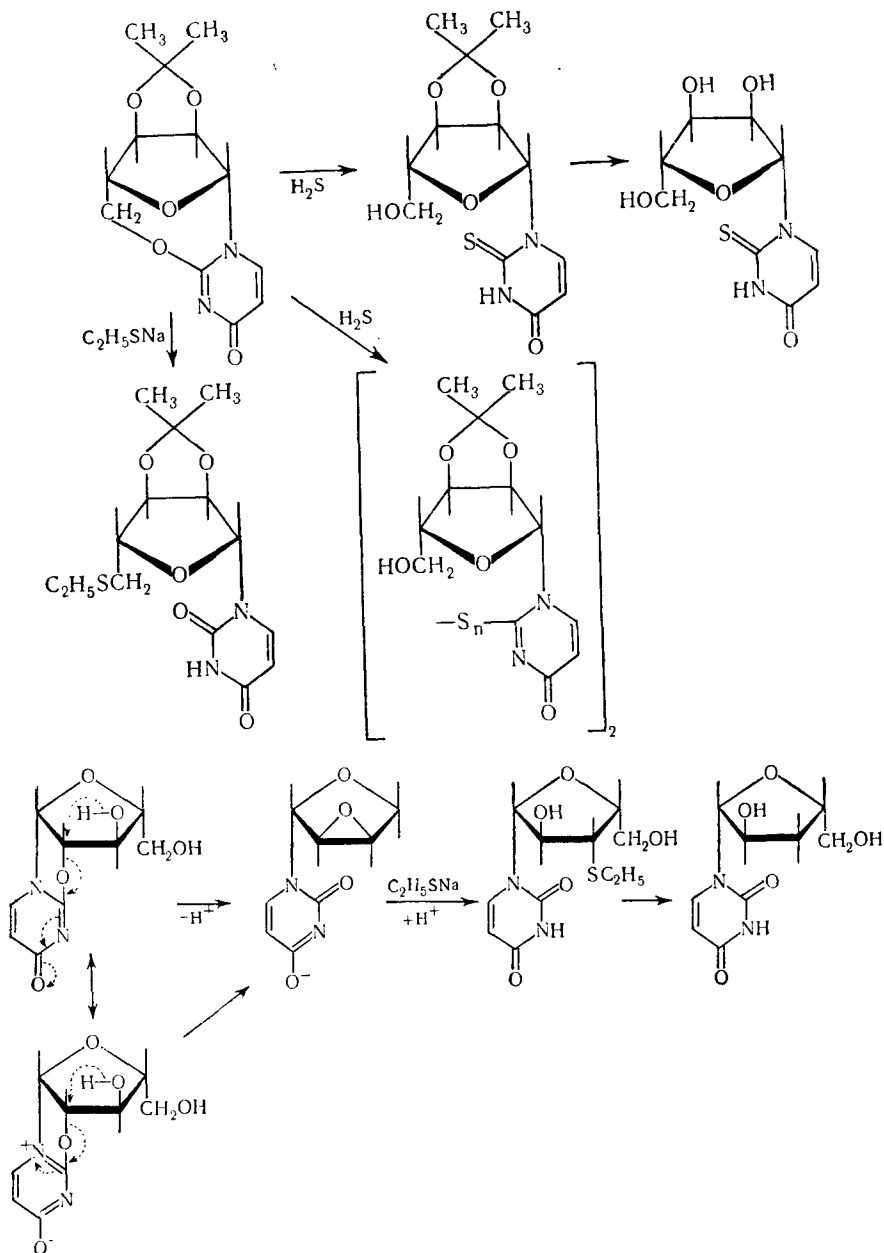
Нуклеофильная атака атома C_2' в $O^2,2'$ -циклоуридине галоид-анионом описана в связи с синтезом 2'-дезоксинуклеозидов (см. также на стр. 91 описание других реакций циклонуклеозидов).

СВОЙСТВА

Химические и физические свойства нуклеозидов зависят от состава входящих в них оснований и сахаров. Будучи гликозильными производными, они оптически активны, причем значения оптической активности зависят от величины pH. Однако помимо диссоциации сахара (pK от ~ 12 до 13) значительное влияние на оптическую активность оказывает также природа основания (и его константы диссоциации), и, вероятно, все значения pK могут быть определены из данных об изменении вращения с изменением величины pH.

Ацилирование углеводной части протекает легко. Показано, что в дезоксирибозидах 5'-гидроксильная группа обладает явно выраженной избирательностью при частичном ацилировании [77]. В случае производных рибозы при частичном ацилировании 5'-О-ацетилнуклеозида образуется 3',5'-ди-О-ацетильное производное, а не 2',5'-диацетат [78] либо вследствие заметной специфичности реакции, либо, что более вероятно, в результате быстрой и легкой миграции ацетила. В то время как при частичном дезацелировании ацелированных дезоксинуклеозидов образуются как 5'-О-ацетилнуклеозид, так и 3'-О-ацетилнуклеозид [79], частичное дезацелирование 2',3',5'-три-О-ацетиладенозина приводит к получению в качестве моноацетильного производного главным образом, если не исключительно, 5'-О-ацетиладенозина [80], а 2' (или 3'), 5'-ди-О-ацетиладенозин не образуется. Это показывает, что ацильная группа, находящаяся в положении 2' или 3', значительно менее устойчива, когда она находится по соседству со свободной *цис*-гидроксильной группой. При обработке 5'-О-ацетиладенозина 2',3',5'-три-О-ацетиладенозином проходит трансацелирование, причем образуется 3',5'-ди-О-ацелированное соединение [80]. Аминоацилирование нуклеозидов и нуклеотидов* удалось осуществить с довольно низким выходом обработкой аминокислот в диметилсульфоксиде тиофениловыми эфирами при температуре

* Первые О-аминоацильные производные нуклеозидов были получены с хорошим выходом при реакции нуклеозидов с хлорангиридами фталиламинокислот [Вестник МГУ, № 6, 215 (1957)]. Но лучшим методом получения О-аминоацилнуклеозидов является ацилирование карбобензоксинаминокислотами в присутствии дициклогексилкарбодимида в пиридине с последующим удалением защитной группы гидрогенолизом [ДАН СССР, 128, 740 (1959); ЖОХ, 31, 3899 (1961)]. Избирательное аминоацилирование аминной группы цитидина и дезоксцитидина проводят в диоксане [Биохимия, 27, 1079 (1962); ЖОХ, 33, 2480 (1963)]. — Прим. ред.



120° [81—83]. Более мягкие методы обычно включают либо предварительное образование защищенного аминоксилангидрида, такого, как, например, этилкарбонатное производное (из карбобензоксикаминокислоты и этилхлорформиата), либо образование ангидрида *in situ* под действием дициклогексилкарбодиимида или N,N'-карбонилдиимидазола [84].

Хотя О-триметилсилилзамещенные пентозы и гексозы описаны, сообщения о действии триметилсилилхлорида на нуклеозиды до сих пор не появлялись. Так как триметилсилилгруппа легко удаляется при гидролизе в воде (при нейтральных значениях pH), эта группа могла бы иметь значительные преимущества перед другими в качестве защитной.

При действии трифенилметилхлорида на нуклеозиды, как правило, образуются 5'-О-триметилпроизводные, хотя этот реагент, преимущественно действуя на первичную гидроксильную группу, все же не является совершенно специфичным для нее [85—88]. Действительно, уридин образует дитриметилпроизводное [89], которое, как было показано, представляет собой 2',5'-ди-О-триметилуридин [73]. Образуется также некоторое количество 3',5'-ди-О-триметилуридина.

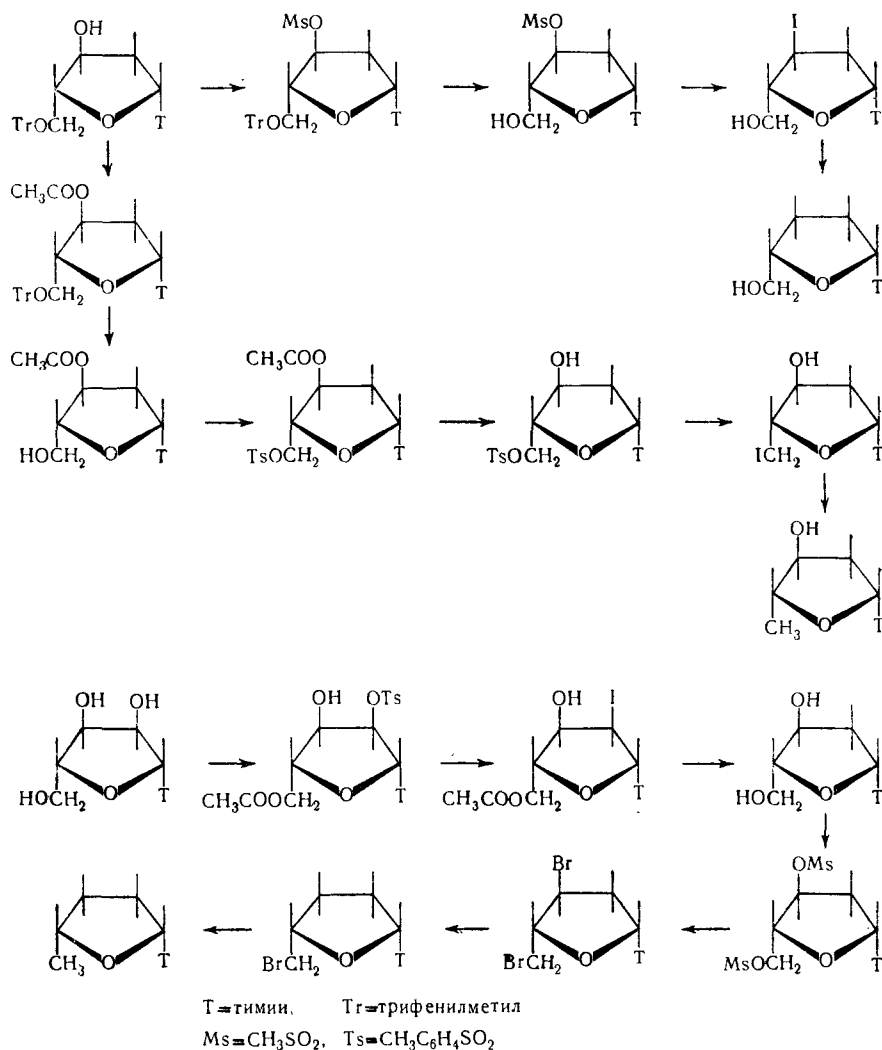
Рибонуклеозиды реагируют с бензальдегидом, давая 2',3'-О-бензильденпроизводные (можно получить любой из диастереомеров, образующихся при введении асимметрического атома углерода, используя подходящую температуру реакции) [90, 91]. С ацетоном рибонуклеозиды образуют 2',3'-О-изопропилиденнуклеозиды. Последние легко получают при действии на рибонуклеозиды ди-*n*-нитрофенилфосфата и 2,2-диметоксипропана в ацетоне [92] или просто при катализируемой кислотой конденсации с ацетоном [73, 87, 93—96]. Выходы продуктов, получаемых по первому методу (диметоксипропан служит для поддержания безводности среды), являются практически количественными для широкого ряда нуклеозидов и их аналогов [92].

Как правило, все гидроксильные группы при подходящих условиях можно превращать в эфиры толуол (или метан) сульфокислоты [87]. Ранее было упомянуто об избирательном сульфонилировании 2'-, а не 3'-гидроксильной группы*. Влияние, кото-

* Сообщения в литературе, описывающие избирательное фосфорилирование 3'-гидроксильной группы в рибонуклеозидах, защищенных в положении 5', не являются абсолютно правильными с точки зрения последних достижений в химии нуклеотидов. Действительно, весьма вероятно, что при условиях, устраняющих образование циклического фосфата и миграцию фосфатной группы, фосфорилирование будет протекать по 2'-гидроксильной группе, по крайней мере при действии мягких реагентов. Ср. тритилирование и тозилрование (миграция маловероятна) с ацетилированием (перенос и миграция, приводящие к образованию более устойчивого эфира, установленные во многих случаях). Известно, что 2'-гидроксильная группа в рибонуклеозидах является более «кислой», чем гидроксил в положении 3'.

рое оказывает основание на реакционную способность гидроксильных групп сахара по отношению к определенным реагентам, хорошо демонстрируется на примере нуклеозидов гуанина; несмотря на непрекращающиеся попытки получить сульфопроизводные, они пока еще не описаны. (Другим примером может служить факт более легкого протекания фосфорилирования 2',3'-О-изопропилиденаденозина по сравнению с аналогичными производными 6-диметиламинопурина [97] и гуанина [94] при действии мягкого реагента, такого, как дибензилхлорфосфат.) При обработке иодидом натрия [98] или бромидом лития 5'-О-алкил(или арил)сульфонилзамещенных нуклеозидов основного характера образуются соли циклонуклеозидов, а 5'-сульфонилоксигруппа в урidine, тимидине или инозине замещается на галоген. Эта реакция, обычно указывающая на образование эфира у первичной гидроксильной группы, не имеет такого значения в применении к нуклеозидам с тех пор, как при помощи этого метода были получены 2'-иод-2'-дезоксинуридин и 3'-иод (или бром)-3'-дезокситимидин, по-видимому, через стадию промежуточного образования циклонуклеозидов. Каталитическое восстановление галогендезоксинуклеозидов приводит к соответствующим дезоксисоединениям. Этот метод был использован не только для синтеза встречающихся в природе 2'-дезоксинуклеозидов, но также для получения 5'-дезоксинуридина [75, 99], 3'-дезокситимидина, 5'-дезокситимидина и 3-β-D-2',3',5'-тридезоксирибифуранозилтимина (3',5'-дидезокситимидина) [66], причем последний был получен ступенчатым каталитическим восстановительным дегалогенированием 3',5'-дибром-3',5'-дидезокситимидина.

Устойчивость гликозидной связи в кислой среде широко варьирует в зависимости от природы как основания (и его заместителей), так и сахара (и его заместителей). Так, например, дезоксинуклеозиды менее устойчивы, чем рибонуклеозиды, тогда как в пределах каждого класса устойчивость изменяется в следующем порядке: урацил-(или тимин-) > цитозин- > аденин- > гуаниннуклеозид. На скорость кислотного расщепления гликозидной связи может оказывать значительное влияние наличие ацильного остатка в гетероцикле [100, 101], хотя имеется и другая точка зрения [102]. Этерификация гидроксильных групп сахара также влияет на устойчивость гликозидной связи, как, например, в случае О-ацетил-2'-дезоксигуанозина [79], фосфатов тимидина [103] и 2'-О-*n*-толуолсульфонилденаденозина [78]. На это указывает также удивительная устойчивость 2',3',5'-три-О-(3,5-динитробензоил)уридина [99]. Вероятно, кислотный гидролиз нуклеозидов связан с тремя основными факторами [104, 105], хотя вполне возможно, что другие факторы имеют значение. Для того чтобы гидролиз протекал с заметной скоростью, необходимо присоединение протона к кольцевому атому кислорода углеводной



части молекулы. В тех случаях, когда первый протон присоединяется к атому азота основания, гидролиз идет при условии, если возможен легкий перенос этого протона к кольцевому атому кислорода. Когда такой перенос не может происходить, гидролиз все-таки протекает, если возможно присоединение второго протона. Легкость переноса протона от основания к атому кислорода

очень важна. Так, атом N_3 пуринового кольца, аминогруппа у C_2 пиримидинового кольца и аминогруппа у C_5 имидазольного кольца — все они могут располагаться близко к атому кислорода кольца сахара, облегчая, таким образом, перенос протона. В соответствии с этой концепцией пуриновые нуклеозиды и 5-амино-1-β-D-рибофуранозилимидазолы легко гидролизуются, а изоцитидин гидролизуется значительно быстрее, чем цитидин. Устойчивость «природных» пиримидиновых нуклеозидов может быть обусловлена малой способностью карбонильного атома кислорода у C_2 к протонизации. Незначительные различия в устойчивости гликозидной связи в родственных пуриновых нуклеозидах являются, вероятно, результатом различного расположения зарядов и наличия таутомерных форм протонизированных оснований. Кинетические исследования гидролиза α- и β-аномеров нуклеозидов могли бы представить в связи с этим значительный интерес.

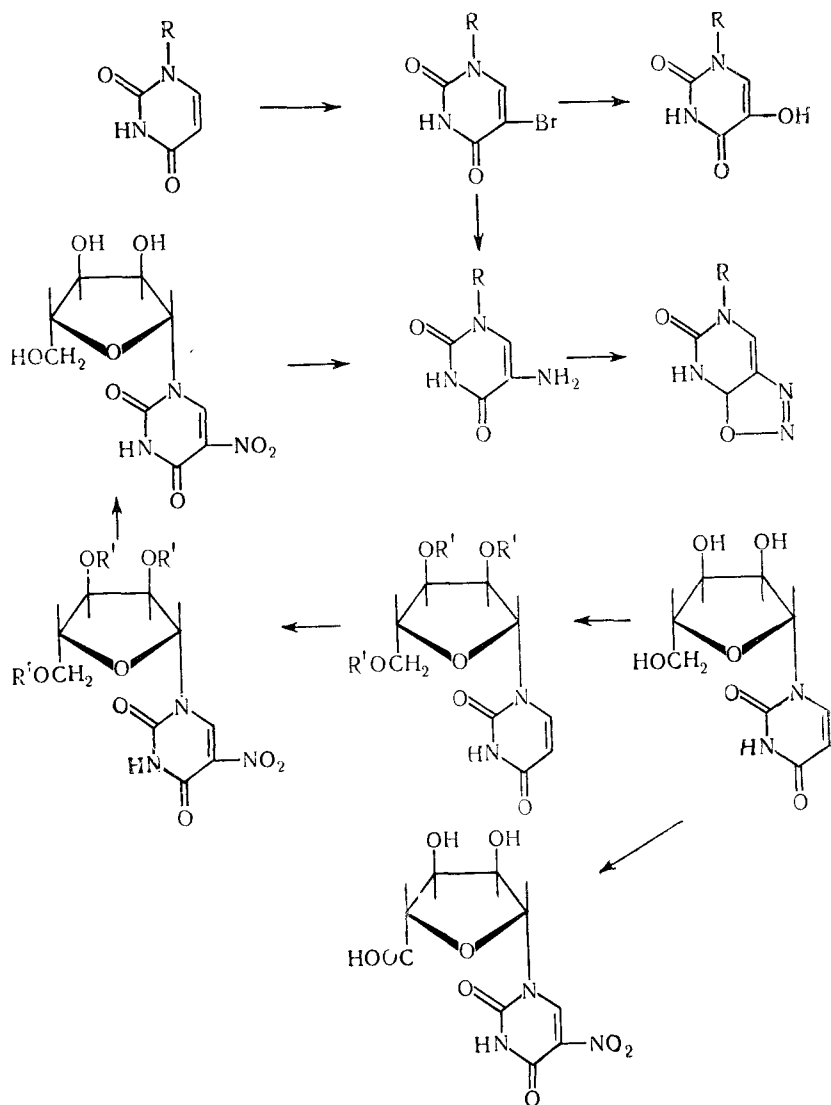
Как правило, нуклеозиды очень устойчивы к щелочному гидролизу. Однако известен ряд исключений, когда гликозидная связь легко разрывается без разрушения пурина или пиримидина. (В других случаях, описанных ниже, происходит разрыв кольцевой системы пиримидина или имидазола.) Так, например, аденозин-3',5'-циклофосфат и 2',3'-ангидро-9-β-D-лихсофуранозиладенин гидролизуются водным раствором едкого натра до свободного основания, вероятно, благодаря напряженности конформации сахара. Сульфониновые производные рибонуклеозидов, как, например, S-(5'-дезоксиаденозин-5')диметилсульфонийиодид и соответствующие производные уридина и инозина, разлагаются холодной разбавленной щелочью, давая свободное основание и сульфониновое производное сахара. Вследствие промежуточного образования 4,5-двойной связи с последующей потерей асимметрии у C_4 образуются как ликсоза, так и рибоза [234]. Освобождение аденина из витамина B_{12} в слабощелочном растворе цианида калия, вероятно, протекает по аналогичному механизму [213]. (См. также катализируемый основаниями гидролиз псикофураина [190].)

За исключением особого случая псевдоуридина (гликозидная связь которого образована «этиленовым» атомом углерода), для природных нуклеозидов (N-гликозидов) не было получено убедительных фактов о наличии мутаротации.

Галогенирование пиримидиновых нуклеозидов протекает легко по C_5 . Фотокаталитическая реакция с галогеном в смеси пиридина и уксусной кислоты была использована для получения 5-хлор- и 5-бромпроизводных нуклеозидов урацила и цитозина (как рибозы, так и 2'-дезоксирибозы) [106, 107]. Обработка иодом уридина и 2'-деоксиуридина дает соответствующие 5-иодпроизводные [108]. Эффективным является прямое хлорирование в уксусной кислоте; бромирование и иодирование лучше проходят при действии гало-

гена на нуклеозид в водном диоксане, содержащем небольшое количество азотной кислоты [109]. 5-Фторпроизводные были синтезированы через 5-фторурацил.

Несмотря на низкую реакционную способность галогеннуклеозидов, для них возможны реакции замещения. При



действии жидкого аммиака на 5-бромнуклеозид образуется 5-аминопроизводное; галоген может быть также замещен на гидроксил. Дальнейшее взаимодействие 5-аминоуридина с азотистой кислотой дает диазоуридин [110, 111]. Имеется также сообщение о превращении 5-бромуредина в 5-морфолинуридин (под действием морфолина) [112].

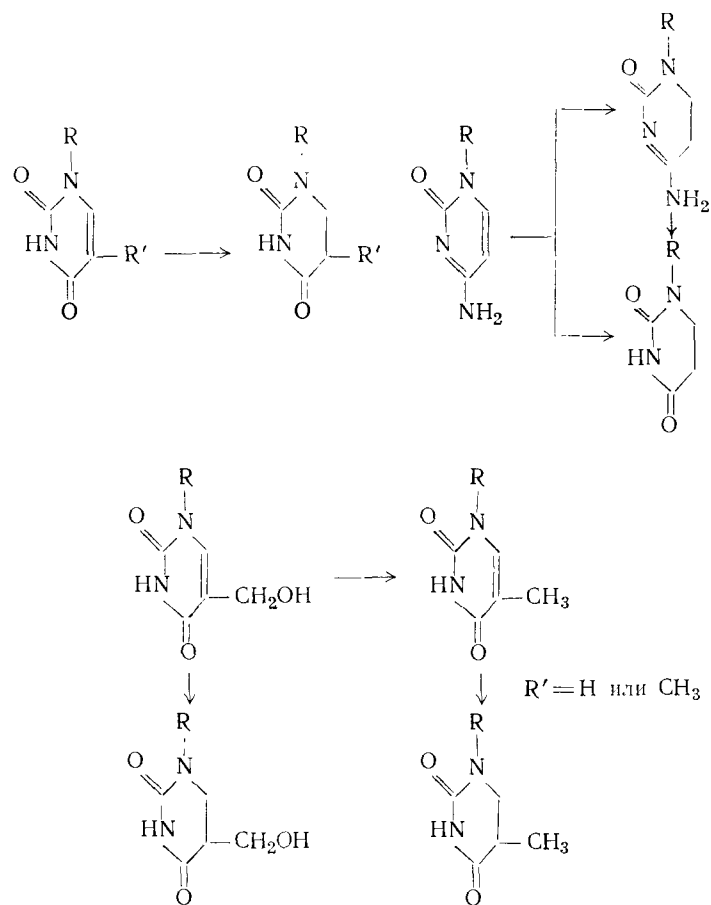
Дополнительным фактом, подтверждающим, что положение 5 особенно чувствительно к электрофильному замещению, служит нитрование 2',3',5'-три-О-(3,5'-динитробензоил)уридина до 5-нитропроизводного, из которого после дезацилирования получается 5-нитроуридин. Восстановление нитросоединения дает 5-аминоуридин. Уридин при тех же условиях нитрования окисляется в 5-нитроурацил-3-β-D-рибоную кислоту [99, 113]. (См. также действие формальдегида на урацилнуклеозиды, стр. 110.)

Присоединение по 4,5-двойной связи пиридина в нуклеозидах может протекать различными способами. Ранее было упомянуто, что восстановление является одним из способов уменьшения устойчивости гликозидной связи, причем в ранних работах использовали платиновые и палладиевые катализаторы. При использовании родиевого катализатора [114] гидрирование в мягких условиях протекает более эффективно, и этим способом был восстановлен до 4,5-дигидросоединений ряд нуклеозидов (и нуклеотидов), включая тимидин, дезоксицитидин, цитидин, 5-оксиметил-2'-дезоксидеозидин и 5-оксиметил-2'-дезоксидеозидин.

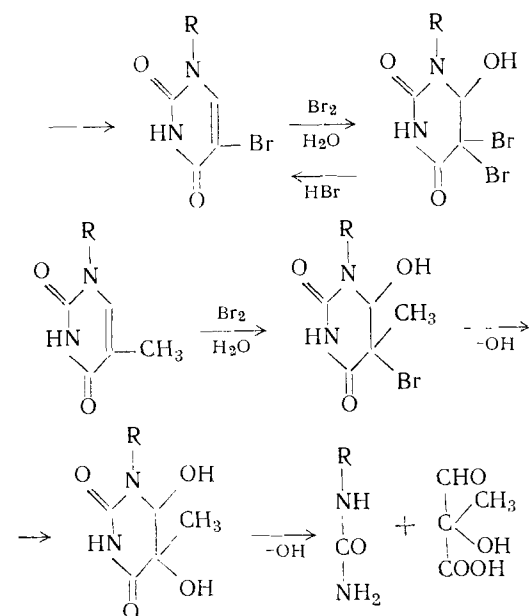
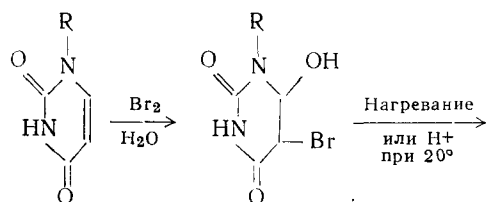
6-Аминогруппа в производных дигидроцитозина очень лабильна, и фактически дигидроуридиловая кислота получается при каталитическом гидрировании как уридиловой, так и цитидиловой кислоты, а аналогичное восстановление 2'-дезоксидеозидин-5'-фосфата приводит к 4,5-дигидро-2'-дезоксидеозидиловой кислоте [114, 115]. При щелочном гидролизе в мягких условиях дигидроуридиловой кислоты образуется N-фосфорибозид β-уреидопропионовой кислоты [114].

Ход гидрирования 5-оксиметилпроизводных при использовании катализатора родий — окись алюминия существенно зависит от pH раствора. При гидрировании в воде образуется 4,5-дигидро-5-оксиметилпиридин, устойчивый к дальнейшему восстановлению; однако в 50%-ной уксусной кислоте оксиметильный остаток избирательно восстанавливается (гидрируется) до метильной группы. После замены растворителя можно затем прогидрировать двойную связь [116, 117].

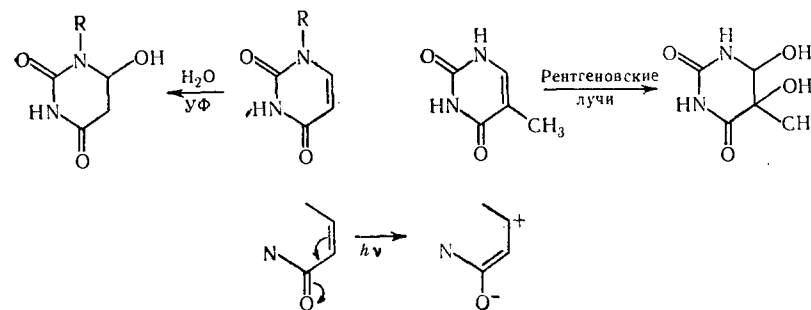
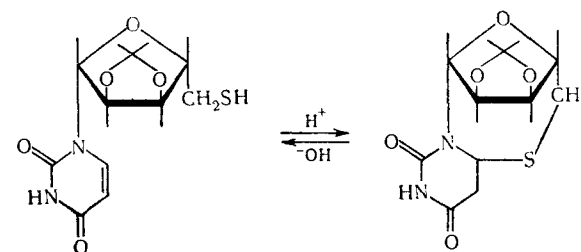
При действии бромной воды происходит присоединение к 4,5-двойной связи и получается 5,5-дибром-4-оксидигидропроизводное, которое под действием щелочи превращается в гликозидное производное (вероятно, ациклическое), из которого затем при кислотном гидролизе легко освобождается сахар [118, 119].



И наоборот, при действии кислоты на дибромпроизводное образуется 5-бромнуклеозид и, таким образом, восстанавливается поглощающая ультрафиолетовый свет система [120, 121].

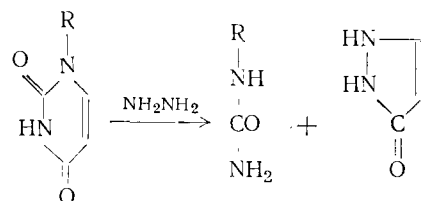


Другими примерами присоединения к 4,5-двойной связи являются, например, поведение 2',3'-О-изопропилиден-5'-тиоури-



дина в кислоте и в щелочи [122], а также обратимый фотолиз пири-
мидиновых нуклеозидов под действием ультрафиолетового излуче-
ния. В последнем случае происходит присоединение воды по двой-
ной связи [123, 124]; первоначальным процессом, вероятно,
является поляризация с образованием ионных промежуточных
продуктов [125]. По такому же механизму идет образование гидро-
перекисей при облучении рентгеновскими лучами в присутствии
кислорода [126—128].

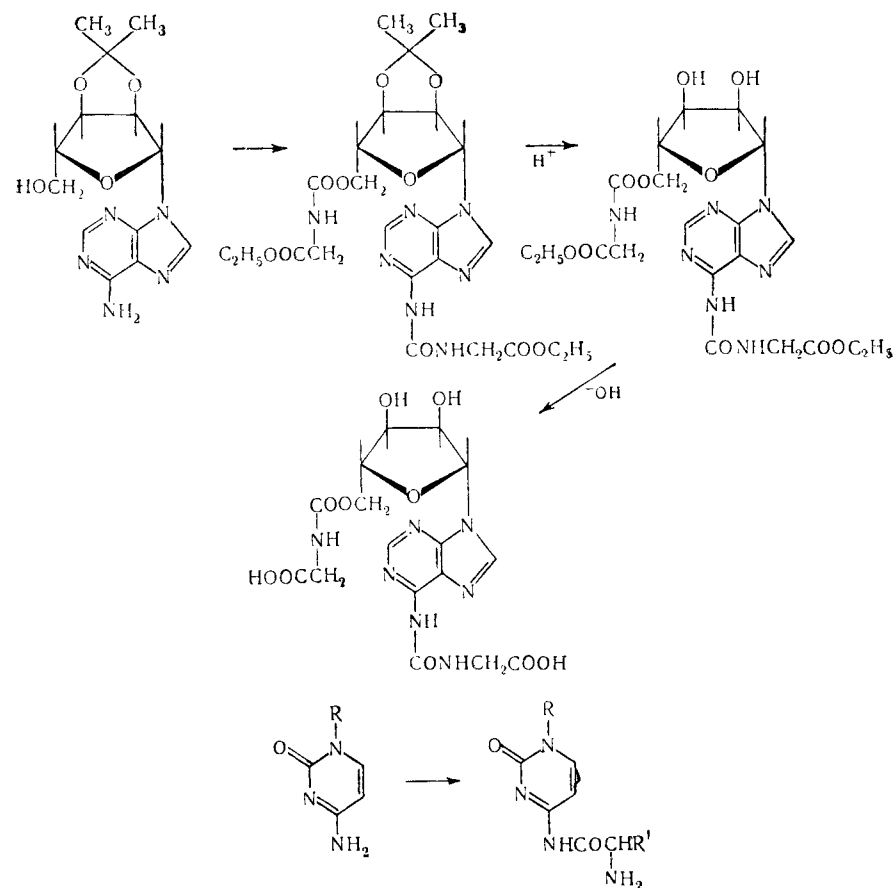
Расщепление пиримидинового кольца в нуклеозидах может
быть осуществлено различными способами. При действии на ури-
дин гидразингидрата получается пиразолон и рибозилмочевина;
ранее уже говорилось о неустойчивости пиримидинового кольца
в 4,5-дигидронуклеозидах по отношению к щелочи.



Метилирование тимидина и уридина под действием диазометана
протекает с образованием соответствующих N¹-метилнуклеозидов
[130]; при продолжительной обработке уридина диазометаном обра-
зуется N¹,2'-О-диметилуридин [75, 131], что согласуется с боль-
шей кислотностью 2'-гидроксильной группы по сравнению с гидро-
ксильными группами у C_{3'} и C_{5'}. Метилирование цитидина (дими-
тилсульфатом в диметилформамиде) также приводит к образованию
N¹-метилцитидина.

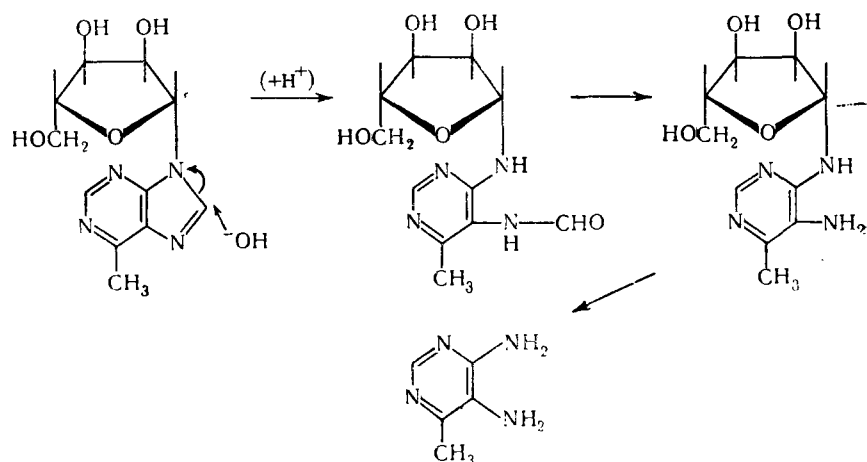
Легко протекает ацетилирование 6-аминогруппы в цитидине
и дезоксицитидине [100]; был также получен ряд N⁶-аминоациль-
ных и пептидных производных 3-β-D-глюкопиранозилцитозина
и цитидина [132—134]. Удаление защитной карбобензоксигруппы
в таких соединениях приводит к уменьшению устойчивости амидной
связи, которая легко расщепляется под действием щелочи. Подо-
бные соединения были получены посредством аминоацелирова-
ния аминных групп аденозина и 9-β-D-глюкопиранозилгуанина
[135]. Аминопурины реагируют с органическими изоцианатами
с образованием уреидопуриновых производных.

Подобным же образом ведут себя и соответствующие нуклео-
зиды, но при этом, по-видимому, протекает также реакция с гидро-
ксильными группами сахара. Так, при взаимодействии 2',3'-О-изо-
пропилиденаденозина с этиловым эфиром изоцианоксусной кис-
лоты легко образуется диэфир (показанный ниже), из которого
последовательным гидролизом сначала разбавленной уксусной



кислотой (для удаления изопропилиденового остатка), а затем
щелочью была получена свободная дикарбоновая кислота [136].

В то время как большинство нуклеозидов относительно устой-
чивы к действию щелочи, некоторые пуриновые нуклеозиды
претерпевают разрыв по имидазольному кольцу аналогично
расщеплению 9-метилпурина до 5-амино-4-метиламинопиримидина
(однако сам пурин устойчив). Так, 9-β-D-рибофуранозилпурин
(небуларин) при действии разбавленной щелочи легко расщепляется
с образованием 4,5-диаминопиримидина и его рибозильных произ-
водных; 6-метилнебуларин расщепляется аналогично, причем сна-
чала образуется рибозильное производное 4-амино-5-формамидо-
6-метилпиримидина, которое затем деформируется. Устойчи-



ность промежуточного формилпроизводного доказана также в случае небуларин-5'-фосфата [137, 138].

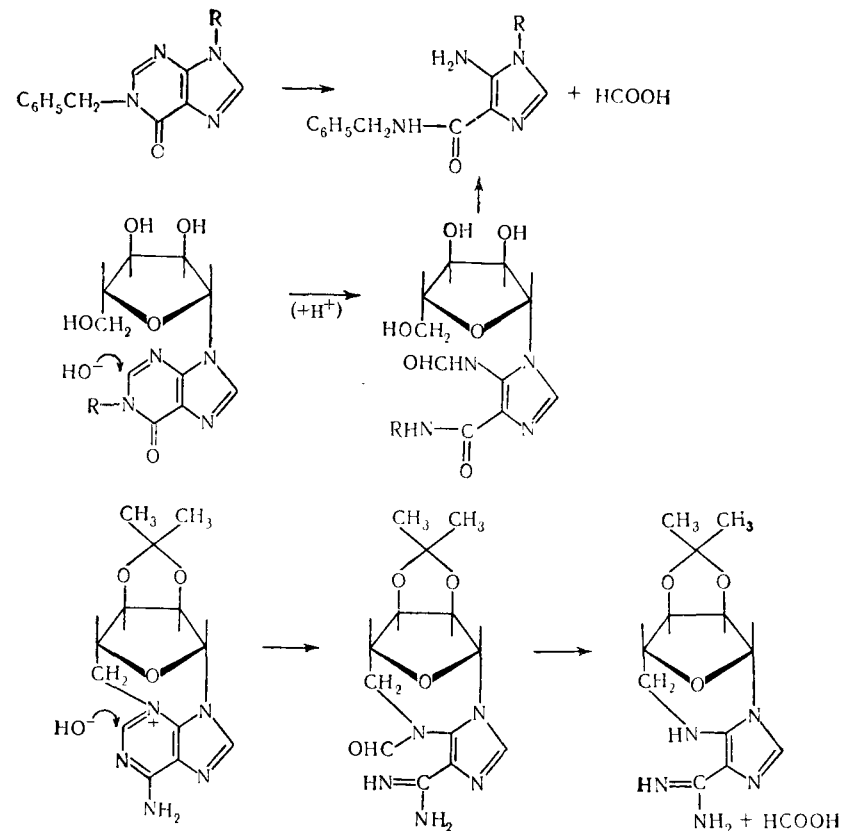
Так как 9-гликозилпроизводные 6-хлор- и 6-метилмеркаптопурина также неустойчивы к действию щелочи, а соответствующие 6-диметиламино-, 6-метиламино-, 6-амино- или 6-оксипроизводные устойчивы, весьма вероятно, что первоначальной стадией разложения является нуклеофильная атака атома углерода C₈ гидроксильным ионом, поскольку электронная плотность у этого атома углерода зависит от наличия заместителей в пиримидиновом кольце [139]. Замечено, что подобный разрыв имидазольного кольца происходит при щелочной обработке иодметилатов 1-метилбензимидазола и 1,2-диметилбензимидазола [140], а также 7,9-ди-(2-оксипропан-2-ил)гуанина [141].

При облучении гуанозина электронами, обладающими энергией 15 Мэв, имидазольное кольцо раскрывается и образуется 2-амино-4-рибозиламино-5-формамино-6-оксипиримидин [142]. Аналогичное раскрытие кольца происходит при облучении водного раствора ксантозина; продуктами реакции являются ксантин, 2,6-диокси-4-амино-5-формаминопиримидин и его рибозильное производное [143].

Расщепление пуринового нуклеозида может также протекать с разрывом пиримидинового кольца пуринового основания. Реакция протекает легче, если нуклеозид окислить или проалкилировать по N₁ (например, превращение 1-бензилинозина в производное рибозилимидазола) [144] или проалкилировать по N₃ (например, расщепление циклонуклеозидов). Вероятно, в большинстве (если не во всех) этих реакций первоначальной стадией является нуклео-

фильная атака гидроксильным ионом атома углерода C₂, причем в качестве промежуточного продукта получается формильное производное, образование которого сопровождается разрывом кольца. И в этом случае природа заместителей у N₁ или N₃, вероятно, влияет на легкость атаки C₂ и, следовательно, на легкость разрыва связи между C₂ и N₁, особенно если кольцо несет положительный заряд, как в случае соединений циклоаденозина.

Аналогично этому при щелочном гидролизе N¹-*n*-толуолсульфонинозина образуется 1-рибозил-5-аминоимидазол-4-(N-тозил)-карбоксамид [145]. Вероятно, миграция метильной группы от N₁ к аминогруппе при щелочном гидролизе 1-метиладениловой кислоты протекает через стадию раскрытия кольца и последующего его замыкания. Однако при кислотном гидролизе продуктов метилирования аденозина (метилированных диметилсульфатом) образуется смесь 1- и 3-метиладенина, 1,3-диметиладенина и 5-амино-



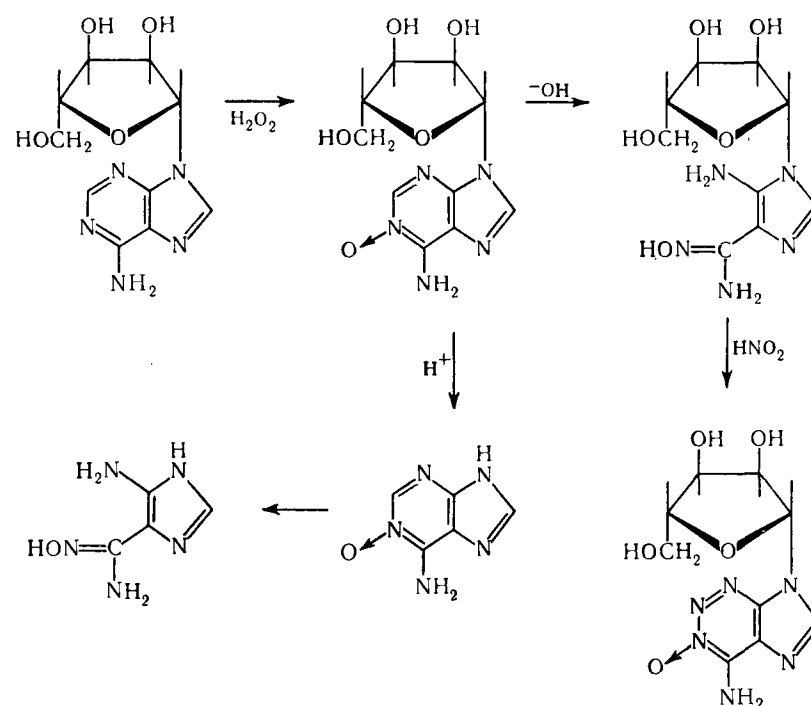
имидазол-4-(N-метил)карбоксамидина, причем последний получается в результате кислотного гидролиза 1-метиладенина.

Следует отметить [146], что адениновые нуклеозиды и нуклеотиды алкилируются по пиримидиновой части молекулы, тогда как в случае производных гуанина протекает алкилирование по имидазольной части (N₇) [141, 147—149], что находится в соответствии с теоретически предсказанной относительной реакционной способностью кольцевых атомов азота этих двух пуринов [150]. Алкилирование гуанозина бифункциональными агентами дает также ди(гуанин-7-ил)производные [141]. При действии на аденозин окиси этилена в водной среде образуется N¹-(2-оксиэтил)аденозин, который при нагревании в разбавленной щелочи превращается в 6-(2-оксиэтиламино)-9-β-D-рибофуранозилпурин [151]. Аналогично образуются N¹-оксиэтиловые производные аденозин-5'-трифосфата (наряду с моноэтиловыми по γ-фосфатной группе) и кофермента I (никотинададениндинуклеотида, НАД).

В результате окисления аденина, аденозина и адениловых кислот перекисью водорода образуются соответствующие 1-N-окиси, структура которых была установлена расщеплением этих веществ [152, 153]. Получены [154] также 1-N-окись дезоксиаденозина и соответствующий 5'-фосфат. В результате кислотного гидролиза 1-N-окиси аденозина получается 1-N-окись аденина, которая при дальнейшем гидролизе превращается в 5-аминоимидазол-4-карбоксамидоксим, при этом раскрытие кольца с потерей C₂ протекает значительно легче в случае самого аденина. При щелочном гидролизе 1-N-окиси аденозина и адениловой кислоты образуются соответственно 1-рибозильное и 1-фосфорибозильное производное 5-аминоимидазол-4-карбоксамидоксима [152, 153]. Дальнейшая обработка 1-β-D-рибофуранозил-5-аминоимидазол-4-карбоксамидоксима азотистой кислотой приводит к 2-азааденозин-1-N-окиси [155].

Бромирование гуанозина бромом в диоксане дает 8-бромгуанозин [175]. Гуаниновые нуклеотиды несколько менее реакционноспособны, но также образуют 8-бромзамещенные.

Как было упомянуто выше, периодатное окисление рибонуклеозидов (и производных, содержащих свободные 2'- и 3'-гидроксильные группы) приводит к диальдегидам. Эти соединения дают дифенилгидразоны, при взаимодействии которых с гидразином образуется свободное гетероциклическое основание [156]. Гликозидная связь C—N в диальдегидах значительно менее устойчива, чем в исходных нуклеозидах, и поэтому гетероциклическая часть освобождается при гидролизе в мягких условиях, в частности в присутствии первичных аминов. При действии щелочного раствора боргидрида натрия обе альдегидные группы восстанавливаются до спиртовых. В противоположность ациклическим триоксиэфирам

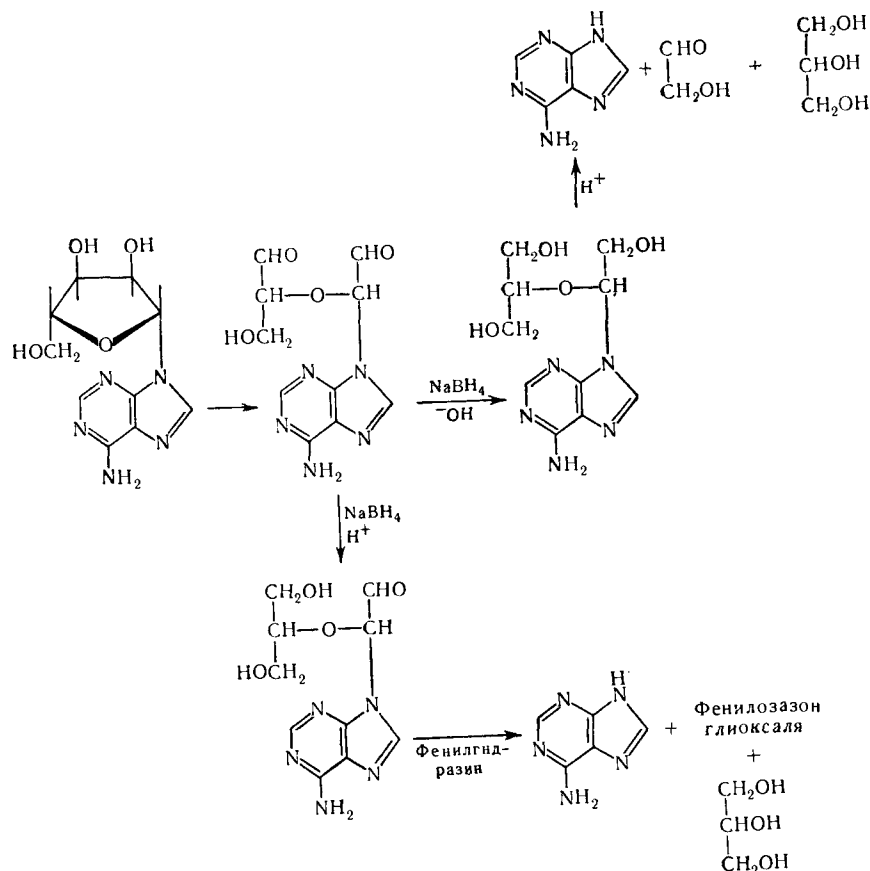


уридина производные цитозина устойчивы к кислотному гидролизу в жестких условиях; производные же пурина легко гидролизуются разбавленными кислотами, давая свободное основание, гликолевый альдегид и глицерин, причем разрыв эфирной связи происходит после разрыва связи C—N [156].

Действуя боргидридом натрия в разбавленной кислоте, можно избирательно восстановить лишь одну альдегидную группу окисленного периодатом нуклеозида, причем в спиртовую группу превращается только та альдегидная группа, которая более удалена от пуринового или пиримидинового кольца. При дальнейшей обработке фенилгидразином с количественным выходом образуются пуриновое или пиримидиновое основание, фенилозазон глиоксаля и свободный глицерин [156].

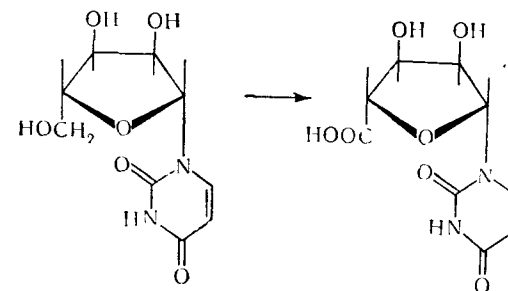
В результате каталитического (в присутствии платины) окисления рибо- и дезоксирибонуклеозидов при pH 9 получаются соответствующие 5'-карбиновые кислоты, причем окисление аденозина и гуанозина протекает несколько медленнее по сравнению с окислением уридина и тимидина. Таким же образом в кислой среде окисляется тимидин-3'-фосфат; полученные данные позволяют исполь-

зовать для ступенчатого гидролиза полидезоксинуклеотидов простое или сопровождающееся декарбоксилированием отщепление фосфата [157]. Этот метод был усовершенствован благодаря использованию дезактивированного катализатора (для предотвращения



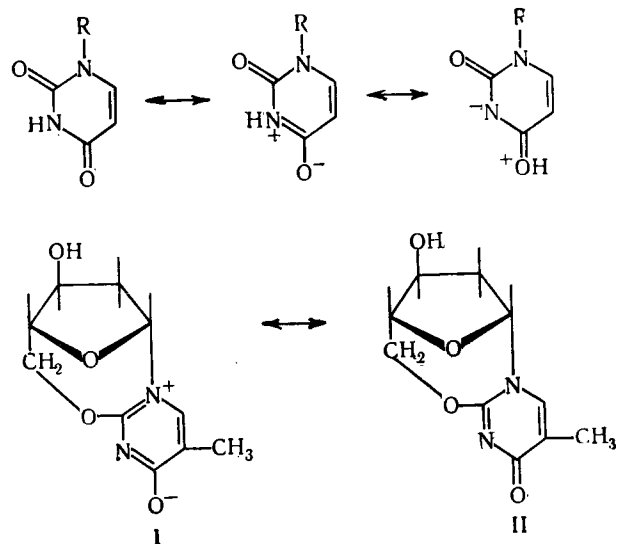
необратимой адсорбции олигомера) и перекиси водорода (вместо кислорода) [158]. Этим способом тимидил-3': 5'-тимидин был окислен до 5'-урановой кислоты. Она оказалась сравнительно устойчивой к щелочному гидролизу, но после превращения карбоксильной группы в неустойчивую к действию щелочи пропиламидную группу в результате гидролиза был получен с количественным выходом тимидин-5'-фосфат. Другими продуктами реакции были тимин, N-пропилфурамид и небольшое количество ангидротимидинурановой кислоты.

Окисление рибо- и дезоксирибонуклеозидов до 5'-карбоновых кислот проводилось также с использованием системы хромовый ангидрид — пиридин при комнатной температуре. 3'-Гидроксильная группа довольно устойчива к окислению, поскольку 5'-О-три-тилтимидин не подвергается воздействию этого окислителя. При действии этого реагента на цетримидную (цетавлон) соль дезоксирибонуклеиновой кислоты не было обнаружено спектроскопических изменений в выделенной ДНК, что указывает на то, что гетероциклические основания не окисляются в применяемых условиях [159].



Пуриновые и пиримидиновые компоненты нуклеозидов обуславливают ультрафиолетовое поглощение этих соединений. Природа этого поглощения зависит от природы заместителей в основании и от pH раствора, так как ионизация основания или его заместителей влияет не только на таутомерные превращения, но и на возможность резонанса. Кажущиеся значения pK (включая pK сахара) могут быть легко определены с помощью как спектрофотометрических методов, так и титрования [160]. Поскольку таутомерная форма обуславливается окружающей средой и каждая форма представляет собой набор многих резонансных структур, характеристика с помощью обычных методов оказывается до некоторой степени ошибочной. Физические свойства нуклеозидов свидетельствуют о значительном вкладе цвиттерионных структур, в частности в циклонуклеозидах, таких, как $O^2,5'$ -циклотимидин. Этому соединению на основании его растворимости, более высокой по сравнению с тимидином температуры разложения (но не температуры плавления), а также данных хроматографии на бумаге и поведения при электрофорезе следует приписать структуру I, но не II (см. стр. 52).

Другой проблемой тонкой структуры нуклеозидов является взаимодействие между недиссоциированными гидроксильными группами сахара и агликоном. При спектроскопических [161, 162] и фотохимических [163] исследованиях пиримидиновых нуклеозидов было отмечено наличие водородной связи между 2-карбонильной группой пиримидина и гидроксильными группами сахара.



Пониженное значение pK 2-аминогруппы гуанозина и уменьшение скорости его реакции с формальдегидом по сравнению со скоростью реакции 2'-дезоксигуанозина с формальдегидом дает возможность предположить, что 2'-гидроксильная группа сахара связана водородной связью с 2-аминогруппой гуанина [164]. С химической точки зрения это взаимодействие представляется очевидным вследствие различной реакционной способности гидроксильных групп сахара в различных нуклеозидах.

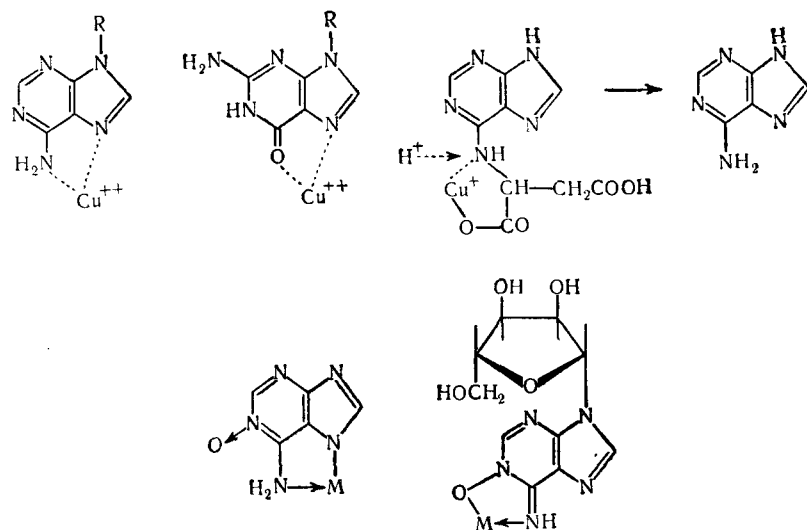
Инфракрасные спектры поглощения нуклеозидов и нуклеотидов в тяжелой воде показывают, что в нейтральном водном растворе тимидин и уридин существуют, вероятно, в дикетонной форме, а цитидин и аденозин — в аминной форме [46]. Изучены также спектры диссоциированных форм [165]. Очевидно, что кажущиеся значения pK обусловлены не только наличием замещающей группы, но связаны также с влиянием соседней части кольцевой системы пурина или пиримидина. Природа этих групп имеет большое значение в отношении водородных связей между производными пурина и пиримидина в макромолекулярных структурах нуклеиновых кислот.

Исследование спектров ядерного магнитного резонанса пуринов, пиримидинов, нуклеозидов и нуклеотидов в тяжелой воде при различных концентрациях иона водорода свидетельствует об определенных таутомерных структурах у катионов цитидина (протонизация у N^1), аденозина (протонизация у N^1 , причем положительный заряд распределен между атомами азота кольцевой системы аде-

нина) и иона гуанозин-5'-трифосфата (протонизация у N^7) [166]. Отмечено, что химические сдвиги, различные для разных протонов данного пурина, зависят от концентрации. Поскольку этот эффект был также замечен и у самого пурина, то причиной его не является наличие водородных связей при высоких концентрациях. Возможным объяснением зависимости сдвигов от концентрации является следующее: предпочтительное расположение молекул в растворе обусловлено тем, что протоны данной молекулы могут испытывать в различных степенях диамагнитный защитный эффект вторичного магнитного поля, возникшего благодаря соседству анизотропных молекул. Изучение ядерного магнитного резонанса также показало, что конформация рибозного кольца в нуклеозидах и нуклеотидах зависит от пуриновой или пиримидиновой природы агликона [167, 168]. Так, в пуриновых нуклеозидах C_2' находится вне плоскости, ограниченной атомами C_1' , O и C_4' (или C_1' , O, C_3' и C_4'), тогда как в пиримидиновых нуклеозидах C_3' расположен вне плоскости, ограниченной C_1' , O и C_4' (или C_1' , C_2' , O и C_4'), как было ранее установлено при помощи рентгеноструктурного анализа. Такое различие в конформации рибозной части молекулы пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов позволяет объяснить поразительные различия в оптическом вращении производных пуриновых нуклеозидов (отрицательные значения удельного вращения) и соединений пиримидина (положительные значения удельного вращения) [167]. Анализы спектров ядерного магнитного резонанса дезоксинуклеозидов и дезоксинуклеотидов свидетельствуют о вероятности того, что в пятичленном кольце сахара атом кислорода и, возможно, атом C_1' выходят из плоскости кольца [169].

Нуклеозиды, особенно соединения пурина, легко образуют комплексы с ионами металлов [170]. Так, например, аденозин и гуанозин (и в значительной степени соответствующие дезоксинуклеозиды) образуют хелатные комплексы меди, связывающие, вероятно, имидазольный азот и заместитель в положении 6. Подобные комплексы, по-видимому, принимают участие в каталитическом разложении 6-сукциаминопурина до аденина в нейтральном растворе в присутствии таких ионов двухвалентных металлов, как медь и марганец [171]. В щелочной среде получается гипоксантин и аденин, тогда как кислотный гидролиз приводит к образованию 5-аминоимидазол-4-карбоксамида [172, 173]. При действии на аденозин кетопентозы (или фруктозы, или гликолевого альдегида), неорганического пирофосфата и ионов меди при 70° получили небольшие количества 5-амино-1-рибозилимидазола. Кроме того, отмечено образование двух других производных аденозина, вероятно, 6-аминозамещенных [174].

Исследование различных комплексов металлов с 1-N-оксиями аденина и аденозина показало, что в первом случае происходит



образование связи между N₇ и 6-аминогруппой, а в случае 1-N-окиси аденозина вследствие таутомерного сдвига устанавливается связь посредством металла между 6-аминогруппой и кислородом окиси [175].

Встречающиеся в природе рибонуклеозиды препятствуют ингибированию роста *Lactobacillus arabinosus* 17-5 этиловым или другими простыми спиртами [176].

НУКЛЕОЗИДЫ-АНТИБИОТИКИ

Кордицепин, выделенный [177] из плесени *Cordyceps militaris*, активен против *B. subtilis* и туберкулезной бациллы птиц. При кислотном гидролизе этого нуклеозида образуются аденин и кордицепоза; ультрафиолетовые спектры поглощения этого соединения указывают на наличие 9-гликозидной связи [178]. Экстракты из мицелия *Cordyceps militaris* содержат также 3'-(гомоцитруллиламино)-3'-дезоксаденозин [179]. В результате гидролиза этого нуклеозида едким натром в метаноле получается 3'-амино-3'-дезоксаденозин; кислотный гидролиз приводит к аденину, 3-амино-3-дезоксирибозе и L-гомоцитруллину.

Небуларин, 9-β-D-рибофуранозилпурин, выделенный из грибов *Agaricus (Clytocybe) nebularis* [180] и из фильтратов культурной среды *Streptomyces* [181], обнаруживает активность против мико-

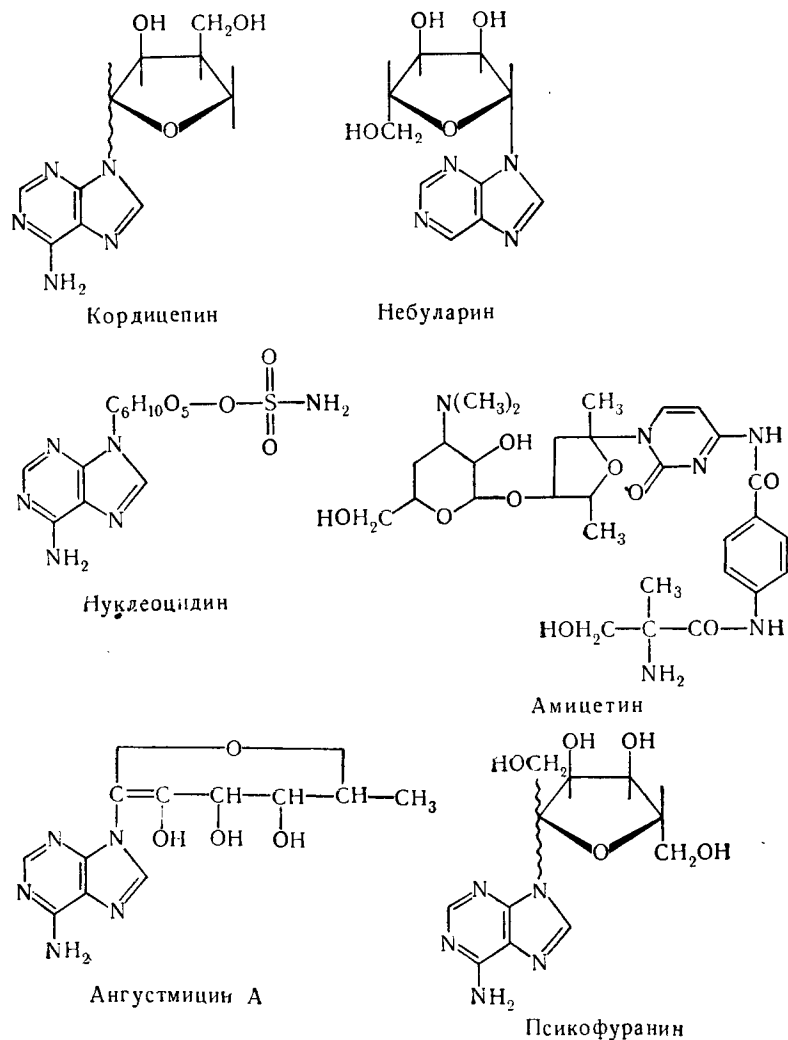
бактерий и мышинной саркомы 180, но высоко токсичен для мышей (хотя сам пурин не токсичен). С помощью обычных методов расщепления была установлена структура нуклеозида, которая была подтверждена его синтезом в результате восстановительного дегалогенирования 6-хлор-9-β-D-рибофуранозилпурина (промежуточный продукт, легко превращающийся в аденозин, что указывает на 9-β-D-конфигурацию нуклеозида-антибиотика). Небуларин был также синтезирован другим путем, непосредственно из хлормеркурпроизводного пурина и 2,3,5-три-O-ацетилрибофуранозилхлорида [182].

Нуклеоцидин, выделяемый *Streptomyces*, обнаруживает феноменальную антитрипаносомную активность и обладает широким спектром антибактериальных свойств. Данные о его частичной структуре были получены методом расщепления [183].

Амицетин — антитуберкулезный антибиотик, продуцируемый *Streptomyces vinacensdrappus* и *Streptomyces fasciculatis* [184]. При кислотном гидролизе антибиотика в жестких условиях выделяется свободный цитозин; дальнейшие исследования методом расщепления позволили установить его структуру [185].

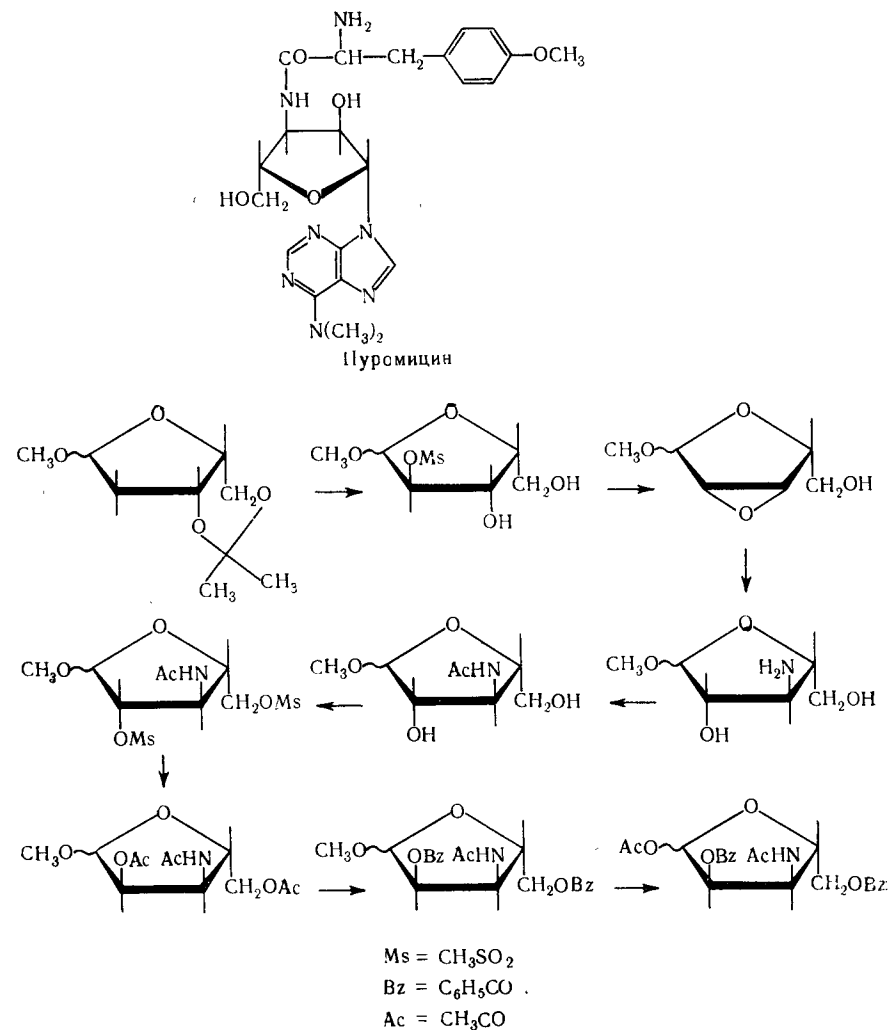
Ангустицин А был идентифицирован как 6-амино-9-L-2'-кето-(ендиол-1',2')фукопиранозилпурин. При кислотном гидролизе получается аденин и L-2-кетофукопираноза. Последнее соединение при восстановлении боргидридом натрия дает смесь L-фуцитолу и 6-дезоксид-L-талитолу. При ацетилировании нуклеозида образуется тетраацетат (N⁶,2',3',4'), каталитическое гидрирование которого до дигидропроизводного с последующим разрывом гликозидной связи под действием кислоты приводит к аденину и 6-дезокситалозе [186].

Ангустицин С [187], **псикофуранин** [188], 6-амино-9-β-D-псикофуранозилпурин, дает при кислотном гидролизе аденин и псикозу. Антибиотик был выделен из фильтратов культуры *Streptomyces hydroscopicus* var. *decoyinine*; он обнаруживает антибактериальную и противоопухолевую активность. Изучение действия псикофурана in vivo и in vitro показало, что антибиотик ингибирует ксантин-5'-фосфатаминиазу [189]. Принятая для него структура была подтверждена синтезом этого нуклеозида из хлормеркурпроизводного 6-ацетаминопурина и тетра-O-ацетил-D-псикозилхлорида с последующим деацетилированием продукта и очисткой методом противоточного распределения [188]. Гидролиз нуклеозида катализируется как кислотами, так и основаниями [196].



Тойокамицин, выделенный [191] из *Streptomyces toyocaensis*, представляет собой цианпроизводные 7-дезааденозина [192]. При гидролизе нуклеозида в присутствии дауэкса 50 образуется D-рибоза. Это соединение активно по отношению к *Mycobacterium tuberculosis* и *Candida albicans*.

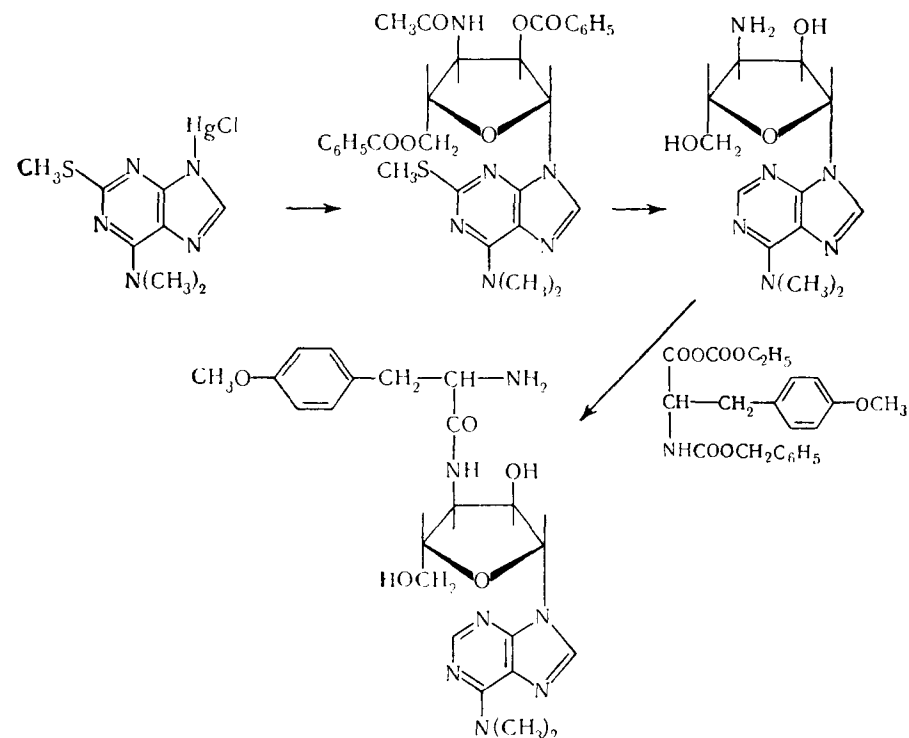
Пурамицин, продуцируемый *Streptomyces alboniger*, — антибиотик с широким спектром действия. Он активен против *Trypanosoma equiperdum* и других простейших и подавляет рост аденокарциномы у мышей [193]. В результате разложения нуклеозида спиртовым раствором хлористого водорода получается 6-диметиламинопурин, *p*-метокси-L-фенилаланин и аминсахар, идентифицированный путем сравнения с синтетическим образцом как D-3-амино-3-дезоксисирюза. Ультрафиолетовые спектры поглощения обнаружили



наличие 9-гликозидной связи, а β -конфигурация и фуранозная природа сахара были установлены с помощью периодатного титрования. Сам пуромин не реагирует с периодатом; это указывает на то, что свободная аминогруппа находится не в остатке сахара, а в *n*-метоксифенилаланиновой части молекулы. Однако удаление аминокислотного остатка приводит к 6-диметиламино-9-(3'-амино-3'-дезоксирибозил)пурину, который окисляется 1 молем периодата (т. е. сахар имеет фуранозную структуру), давая тот же диальдегид, который получается при окислении периодатом 6-диметиламино-9- β -D-глюкопиранозилпурина. Следовательно, пуромин является 6-диметиламино-9-(3'-деокси-3'-*n*-метокси-L-фенилаланиламино- β -D-рибофуранозил)пурин [193]. Бейкер с сотрудниками [194], проведя изобретательный синтез пуромина, подтвердил эту структуру.

Метил-2,3-ангидро-D-липсофуранозид был получен из 3,5-O-изо-пропилиденметил-D-ксилофуранозиды через стадию образования метансульфопроизводного с последующим удалением изопропилиденной группы и обработкой полученного метил-2-O-метансульфонил-D-ксилофуранозид метилатом натрия. При действии аммиака окисное кольцо раскрывалось с образованием производного 3-амино-3-дезоксисарабинозы, в результате ацетилирования которого по азоту был получен метил-3-ацетамин-3-дезоксид-арабинофуранозид. Инверсия у C₂ была осуществлена реакцией метансульфонилирования с образованием 2,5-ди-O-метансульфонилпроизводного с последующей обработкой влажным ацетатом натрия. При этом обе сульфонилоксигруппы замещались; при замещении сульфонилоксигруппы у C₂ оказывала действие соседняя группа и образовывалось производное рибозы, которое после ацетилирования 2'-гидроксильной группы было выделено в виде метил-3-ацетамин-3-дезоксид-2,5-ди-O-ацетил-D-рибофуранозид. Это соединение затем O-деацетилировали, бензоилировали и затем действием соляной или бромистоводородной кислоты в уксусной кислоте проводили отщепление метильной группы. После заключительного ацетилирования 1-гидроксильной группы была получена смесь аномерных 3-ацетамин-1-O-ацетил-2,5-ди-O-бензоил-3-дезоксид-рибофураноз.

Предварительные модельные опыты показали необходимость наличия 2-метилтиогруппы в 6-диметиламинопуриновом производном, для того чтобы при использовании хлортитанового комплекса неустойчивого гликозилхлорида (в модификации метода Давола — Лови с использованием хлормеркурипроизводного) образовывалось не 7-, а 9-гликозильное производное. При взаимодействии хлормеркурипроизводного 6-диметиламино-2-метилтиопурина с комплексом четыреххлористого титана и 3-ацетамин-1-O-ацетил-2,5-ди-O-бензоил-3-дезоксид-D-рибофуранозы получался



гликозид, причем необходимый для реакции гликозилхлорид образовывался в момент реакции. После удаления метилтиогруппы (на никеле Ренея) из сырого продукта с последующим дебензоилированием и де-N-ацетилированием был получен 6-диметиламино-9-(3'-амино-3'-дезоксид- β -D-рибофуранозил)пурин, идентичный аминонуклеозиду, полученному разложением пуромина. Наконец, после взаимодействия этого аминонуклеозиды со смешанным ангидридом этилкарбоната и N-карбобензоксид-*n*-метокси-L-фенилаланина с последующим удалением карбобензоксигруппы гидролизом был получен пуромин [194]. Синтезированы также многочисленные изомеры и аналоги как самого пуромина, так и аминонуклеозидной части его молекулы.

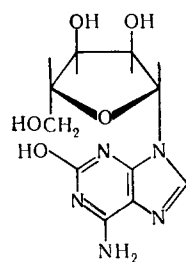
ДРУГИЕ НУКЛЕОЗИДЫ

Кротонозид (выделенный из семян кротона) гидролизуетсся до D-рибозы и изогуанина и может быть дезаминирован до ксантозина. Следовательно, он представляет собой 9- β -D-рибофуранозил-

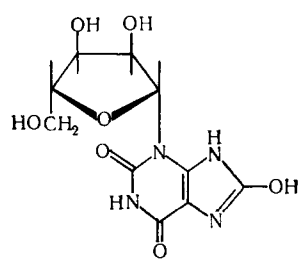
изогуанин [195]. Эта структура была подтверждена синтезом нуклеозида через 9-β-D-рибофуранозил-2,6-диаминопурин [196].

В результате кислотного [197] или ферментативного [198] гидролиза **рибозида мочевой кислоты** (выделенного из бычьей крови [197] и из покоящихся куколок бабочек семейства *Sphingidae* [199]) получают D-рибоза и мочевая кислота. Сравнение его ультрафиолетовых спектров поглощения, значений pK , определенных спектроскопическим методом, цветных реакций и скорости гидролиза в щелочной среде со свойствами 3-, 7- и 9-метилмочевых кислот показало, что этот нуклеозид представляет собой 3-рибозилмочевую кислоту [198], а не изомерное 9-рибозилпроизводное, как считалось ранее [200].

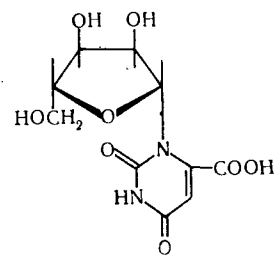
Оротидин (выделенный из потребляющего пиридин мутанта красно-коричневой плесени *Neurospora crassa*) гидролизуетсся разбавленной щелочью значительно быстрее, чем уридин, давая оротовую кислоту и рибозу [201]. Данные спектроскопического анализа показали, что это 3-рибозильное производное [202], а периодатное окисление, ферментативный синтез этого нуклеотида и превращение его в уридин свидетельствовали о том, что оротидин является 3-β-D-рибофуранозилоротовой кислотой.



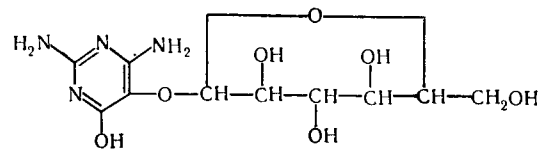
Кротанозид



Рибозилмочевая кислота



Оротидин

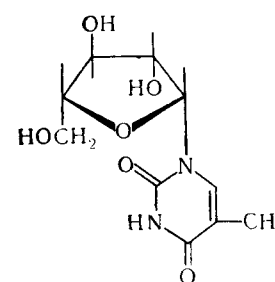


Визин

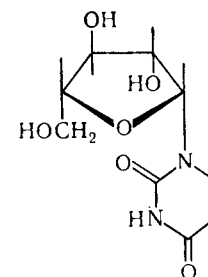
Визин (из вики мучнистой) [203] представляет собой 5-O-β-D-глюкопиранозил-2,4-диамино-5,6-диоксипиримидин, что было

установлено на основе ферментативного гидролиза (эмульсин) и при сравнении его химических и спектральных свойств со свойствами аналогичных соединений [204].

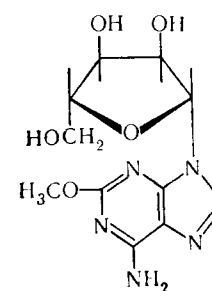
Несколько нуклеозидов было получено прямой экстракцией из губок [205]. Показано, что **спонготимидин** и **спонгоуридин** являются 3-β-D-арабофуранозильными производными тимина и урацила соответственно. Оба соединения были получены из 3-β-D-рибофуранозилпиримидинов инверсией 2'-гидроксильной группы через стадию образования $O^2,2'$ -циклонуклеозидов [68, 69]. Строение



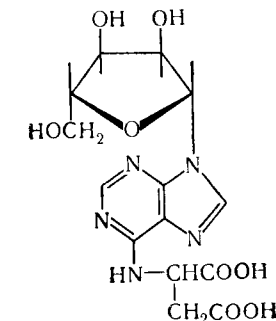
Спонготимидин



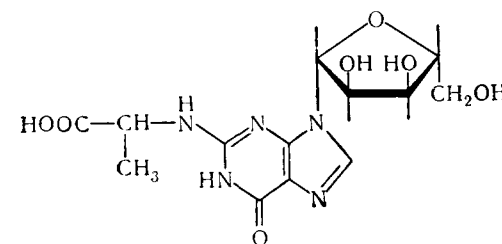
Спонгоуридин



Спонгозин



Сукциниладенозин

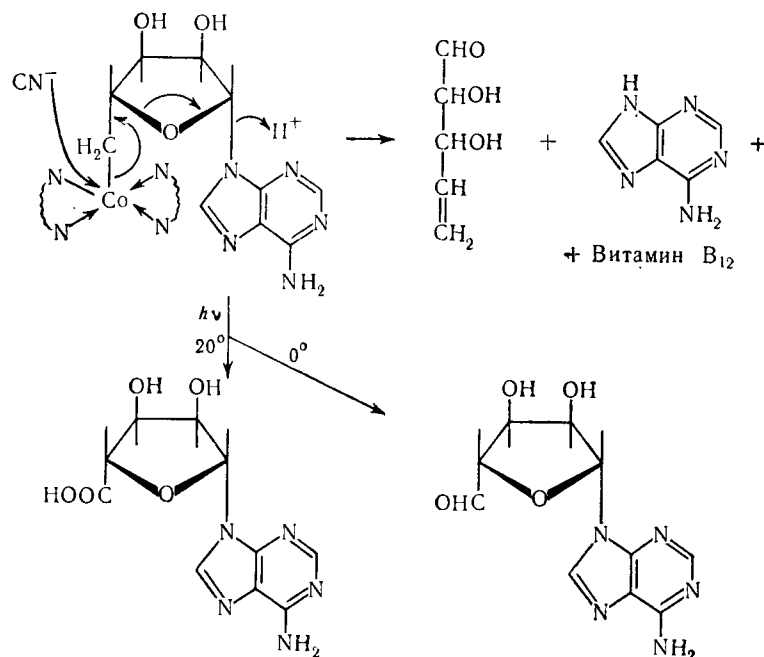


α-Карбоксэтилгуанозин

спонгозина (9-β-D-рибофуранозил-2-метоксиаденина) было установлено синтезом этого нуклеозида в результате частичного метилирования серебряной соли кротонозида или из хлормеркурипроизводного 2-метоксиаденина и 2,3,5-три-О-бензоил-D-рибозилхлорида [206].

Сукциниладенозин представляет собой производное сукцинил-аденозин-5'-фосфата, промежуточного продукта в биохимическом превращении инозиновой кислоты в адениловую. Этот нуклеозид был получен в результате реакции 6-метилмеркапто-9-β-D-рибофуранозилпурина и аспарагиновой кислоты в щелочной среде [207].

Пуриновый нуклеозид, выделенный из *Fusarium*, был идентифицирован как 2-(1-карбоксиэтиламино)-6-окси-9-β-D-рибофуранозил-пурин. В результате кислотного гидролиза получались рибоза и пуриновое производное, которое при дальнейшей обработке превращалось в гуанин [208]. Из кислых гидролизатов реакционной смеси, полученной при обработке гуанина экстрактами из мицелия *Eremothecium ashbyii*, было выделено свободное основание, 2-(α-карбоксиэтиламино)-6-оксипурин [209]. Вероятно, сначала образуется нуклеотид или производное нуклеозида. N₂-α-Карбо-



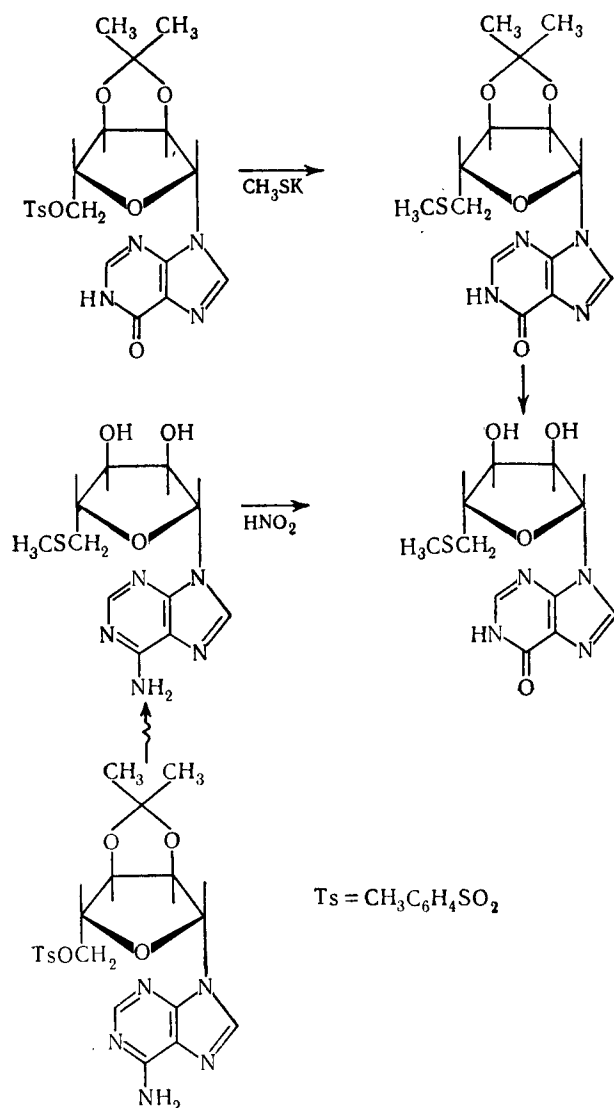
ксиэтилгуанин не дезаминируется под действием азотистой кислоты. В результате кислотного гидролиза в довольно жестких условиях (кипчение в 6 н. соляной кислоте в течение 60 час) получались ксантин, аланин, глицин и молочная кислота, а гидролиз в интервале значений pH от 3 до 12 давал гуанин и L-молочную кислоту [210].

Кофермент витамина B₁₂ содержит 5'-**дезоксиаденозин**, связанный с кобальтом через атом углерода в положении 5' [211]. Кислотный гидролиз в мягких условиях кофермента [212] или реакция с цианидом калия сопровождаются разрывом гликозидной связи; при этом получают аденин и D-эритро-2,3-диоксипентен-4-аль. Фотолиз кофермента при комнатной температуре приводит к образованию «аденозин-5'-карбоновой кислоты» [213], а также соответствующего 5'-альдегида [368].

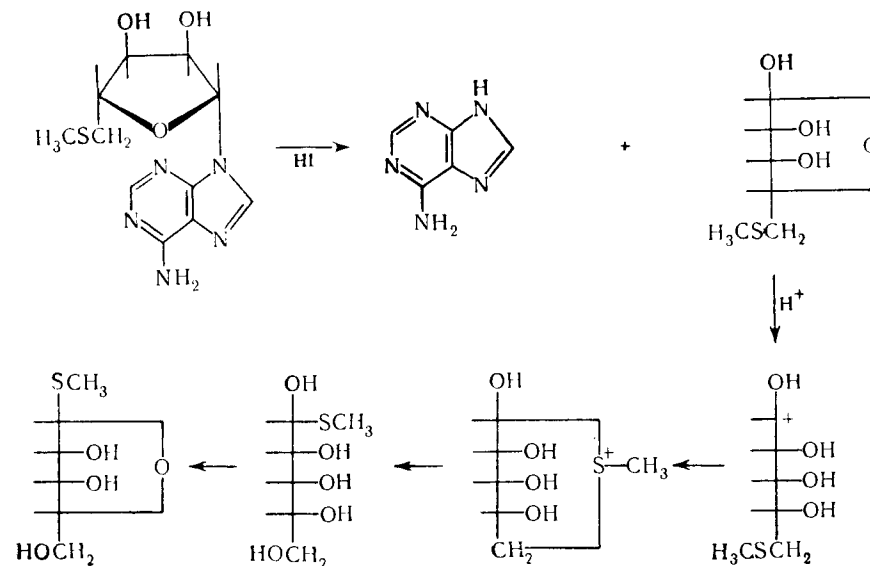
«АКТИВНЫЙ МЕТИОНИН» И АДЕНИНТИОМЕТИЛПЕНТОЗИД

Аденинтийометилпентозид был впервые выделен [214] из дрожжей в 1912 г., но значение этого нуклеозида было выяснено только 40 лет спустя, когда было обнаружено, что биологическое метилирование метионином требует промежуточного образования активированного серусодержащего соединения, получающегося при взаимодействии аминокислоты с аденозин-5'-трифосфатом. Кислотный гидролиз аденинтийометилпентозида приводил к образованию аденина и 5-дезоксис-5-метилтиорибозы. Строение последней было доказано рядом способов, а ультрафиолетовые спектры поглощения нуклеозида свидетельствовали о наличии 9-гликозидной связи [215—219]. То, что этот нуклеозид имеет β-конфигурацию, было отчетливо показано синтезом гипоксантинтийометилпентозида из инозина [220, 221]. При обработке 2',3'-О-изопропилиден-5'-*n*-толуолсульфонилинозина метилмеркаптидом калия был получен 2',3'-О-изопропилиден-5'-метилтио-5'-дезоксиаденозин. Удаление изопропилиденовой группы приводит к 5'-метилтио-5'-дезоксиаденозину, идентичному продукту, получающемуся после действия на аденинтийометилпентозид азотистой кислотой [222]. Следовательно, этот нуклеозид представляет собой 9-(5'-метилтио-5'-дезоксис-β-D-рибофуранозил)аденин (см. схему на стр. 64).

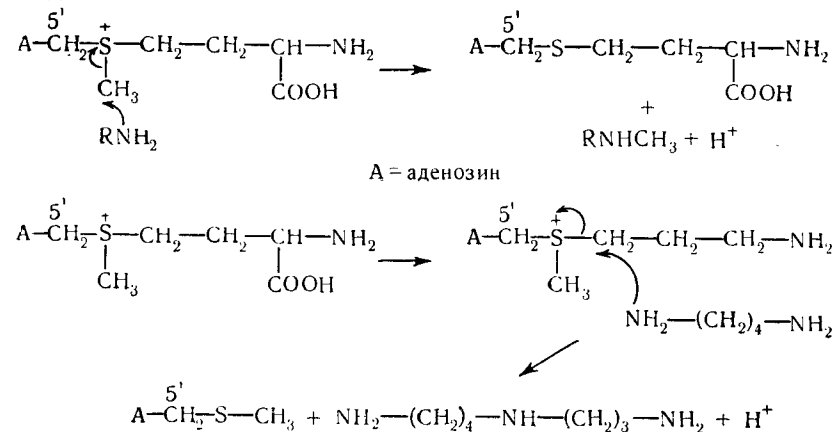
Подобным образом исходя из 2',3'-О-изопропилиден-5'-*n*-толуолсульфониаденозина получают с хорошим выходом аденинтийометилпентозид [223]. В другом случае это соединение было получено конденсацией 2,3-ди-О-ацетил-5-метилтио-5-дезоксис-β-D-рибофуранозилхлорида с 6-ацетиламинопурином с последующим удалением защитных групп [224].



Как уже было упомянуто, при кислотном гидролизе нуклеозида образуются аденин и 5-дезоксипентоза. При дальнейшей обработке иодистоводородной кислотой происходит миграция тиометильной группы от C_5 к C_1 рибозы [225].



«Активный метионин» является донором метильной группы в ряде биологических реакций, таких, как метилирование некоторых 2-аминопуринов до 2-метиламинопуринов [226]. Он, вероятно, связан с метаболизмом метилированных пуринов и пиримидинов, присутствующих в некоторых рибонуклеиновых кислотах. Это соединение образуется также в качестве промежуточного продукта в биосинтезе спермина. В результате декарбоксилирования «активного метионина» получается производное пропиламина, которое затем алкилирует 1,4-диаминобутан, давая спермин и метилтиоаденозин [227].



удаления изопропилиденовой группы был получен S-(5'-дезоксиаденозин-5')-гомоцистеин, идентичный соединению, образующемуся после ферментативного трансметилирования «активного метионина». Метилирование S-аденозилгомоцистеина приводит к получению S-аденозилметионина с хорошим выходом [230, 231].

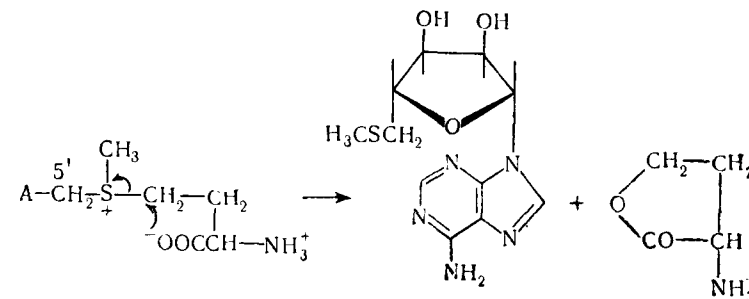
Так как при действии иодистого метила на S-аденозил-L-гомоцистеин вводится новый асимметрический центр, образуется смесь двух сульфониевых диастереомеров, т. е. ($\pm$)-S-аденозил-L-метионины. В результате расщепления смеси ферментативным путем был получен (+)-S-аденозил-L-метионин. В изученных ферментных системах он оказался совершенно неактивным, но по своим химическим свойствам (за исключением оптического вращения) был идентичен «активному метионину», (—)-S-аденозил-L-метионину, синтезированному ферментативным путем [232].

Химические свойства S-аденозилметионина представляют значительный интерес. Они идентичны для всех четырех возможных диастереомеров. Как было упомянуто выше, гидролиз при значении pH от 4 до 7 приводит к гомосерину и метилтиоаденозину. Последний при действии кислоты в более жестких условиях разлагается дальше с образованием аденина и метилтиорибозы. В результате щелочного гидролиза в мягких условиях при 0° происходит разрыв гликозидной связи в нуклеозиде и получаются аденин и S-рибозилметионин; при действии горячей щелочи S-рибозилметионин разлагается далее до метионина. Чрезвычайная чувствительность к щелочи была также отмечена и для 5'-диметилтио-5'-дезоксиаденозина, который подобным же образом легко разлагается с образованием аденина, хотя как аденозин, так и 5'-метилтио-5'-дезоксиаденозин устойчивы в этих условиях [233]. Дальнейшие исследования щелочного гидролиза серусодержащих нуклеозидов показали, что при разрыве гликозидной связи образуются производные ликсозы и рибозы; при этом происходит инверсия у атома углерода в положении 4, являющаяся результатом промежуточного образования двойной связи в положении 4,5 [234].

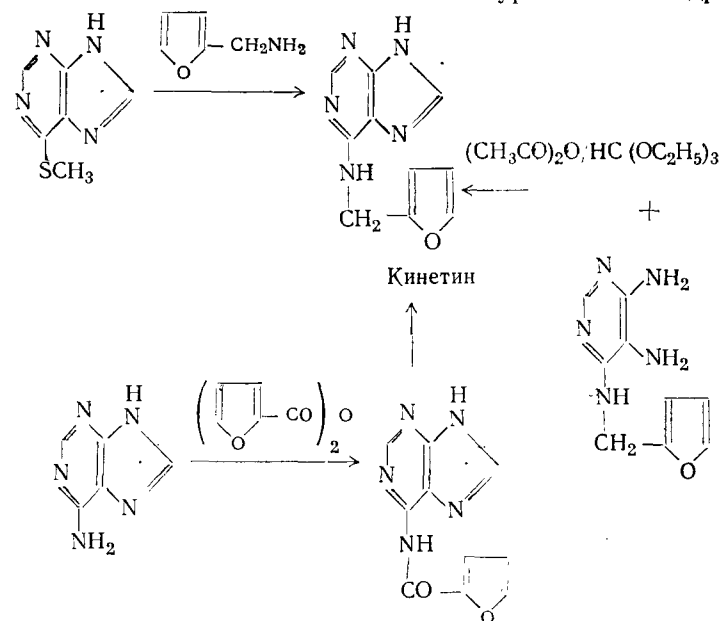
«Активный метионин» можно также расщепить ферментативным путем на 5'-метилтио-5'-дезоксиаденозин и α -амино- γ -бутиролактон. Эта реакция протекает через стадию нуклеофильного замещения, происходящего в результате атаки связанного с серой атома углерода карбоксильным анионом. При проведении реакции в триэтиловом спирте обмена водорода на тритий не происходило [235].

Механизм ферментативного синтеза «активного метионина» все еще не выяснен. Но известны следующие факты: для синтеза необходимы глутатионин и ионы магния; промежуточных продуктов, активированных по карбоксилу, не образуется, а в результате реакции получаются в стехиометрических количествах пиродифосфат и ортофосфат [236]. Исследования с помощью меченых атомов

(O¹⁸ и P³²) показали, что неорганический пиродифосфат сохраняет все семь своих первоначальных атомов кислорода и образуется целиком за счет α - и β -атомов фосфора аденозин-5'-трифосфата. Ортофосфат образуется из γ -атома фосфора с включением O¹⁸.



Кинетин (6-фуриламинопурин) представляет собой гормон растительного происхождения, содержащийся в кокосовых орехах. Более богатыми источниками его являются старые дезоксирибонуклеиновые кислоты и растворы дезоксирибонуклеиновых кислот после автоклавирования [237] при pH 4. Синтез кинетина был осуществлен из 6-метилтиопурина (или 6-хлорпурина) и фуриламина [238], а также из аденина и ангидрида α -фурилкарбоновой кислоты с последующим восстановлением ациламинопурина алюмогидридом



лития [239]; кроме того, кинетин был получен взаимодействием 4,5-диамино-6-фуриламинопириимидина с ортомуравьиным эфиром и уксусным ангидридом [240]. Описан также удобный метод синтеза кинетина, основанный на переаминировании [241]; реакция осуществляется простым нагреванием аденина и фуриламина в присутствии небольших количеств хлористого водорода.

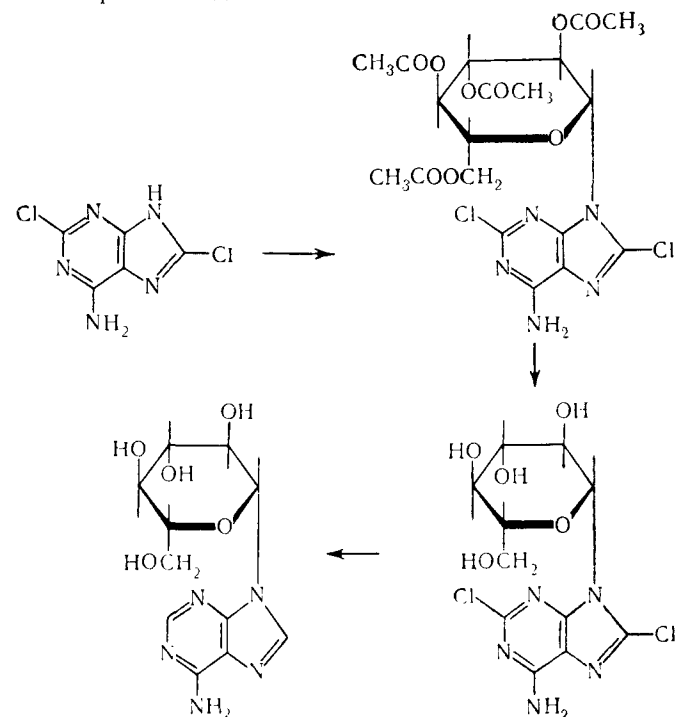
9-β-D-Рибофуранозильное производное, «кинетиннуклеозид», был получен из три-О-бензоил-β-D-рибофуранозил-6-хлорпурина и из три-О-ацетил-β-D-рибофуранозил-6-метилтиопурина (оба эти нуклеозида были получены хлорртутным методом) [242, 243].

СИНТЕЗ НУКЛЕОЗИДОВ

Со времени ранних работ Э. Фишера и Гельфериха затрачены значительные усилия по синтезу нуклеозидов. С одной стороны, синтез нуклеозидов является дополнительным методом в деструктивном анализе, применяемом для выяснения строения природных соединений (в том числе нуклеотидов и нуклеиновых кислот), с другой стороны, он позволяет получать ценные аналоги, необходимые при выяснении биологического действия в зависимости от химического строения. Позднее выделение нуклеозидов-антибиотиков, а также возможность применения «аномальных» нуклеозидов в качестве химиотерапевтических агентов для лечения опухолей создали тот стимул, который обусловил быстрое развитие методов, при помощи которых могут быть синтезированы почти все нуклеозиды, природные и неприродные. Эти методы разделяются на три основных класса. К первому классу относятся методы, согласно которым соответствующее производное пурина или пириимидина вводят в реакцию с сахаром в подходящей для данной реакции форме, чаще всего в виде гликозилгалогенида; в методах, относящихся ко второму классу, циклическая система пурина или пириимидина конструируется на базе простого N-гликозильного предшественника; третий класс включает методы, согласно которым уже готовый нуклеозид видоизменяется путем преобразования либо сахарной части молекулы, либо пуринового или пириимидинового основания. Все три типа методов были успешно применены для синтеза природных нуклеозидов, и все они имеют свои биохимические аналогии. Возможен четвертый тип: построение сахара, исходя из простого N-алкил(или ацил)пуринового или пириимидинового основания. Такая реакция, однако, не наблюдалась в метаболических процессах, и как метод синтеза эта реакция также не использовалась.

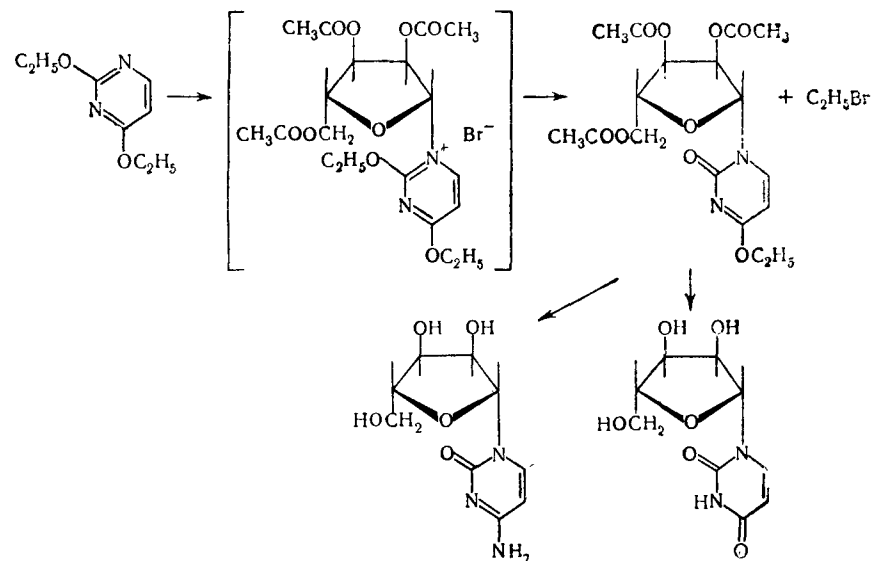
Класс 1. Реакция сахара с готовым основанием. Наиболее ранними исследованиями по синтезу нуклеозидов являются эксперименты, проведенные Э. Фишером и его сотрудниками. Они использовали

метод, который, претерпев ряд видоизменений и усовершенствований, нашел широкое применение. В этом классическом методе соответствующее серебряное производное пурина конденсировали с ацетогалогенсахаром и продукт реакции дезацетилювали [244]. В то время как теобромин давал O-гликозиды, а теofilлин — 7-гликозильные производные, при взаимодействии серебряной соли 2,8-дихлораденина (или 2,6,8-трихлорпурина) с ацетобромглюкозой получалось 9-гликозильное производное, хотя положение гликозидной связи было определено значительно позже [246]. После дегалогенирования 2,8-дихлор-9-глюкозиладенина был получен 9-β-D-глюкопиранозиладенин [244].



Применение этого метода для синтеза пириимидиновых нуклеозидов, по которому серебряная соль пириимидина должна была реагировать с ацетогалогенсахаром, оказалось менее успешным, так как в случае пириимидинов, содержащих лактам-лактимную таутомерную систему, образовывался O-гликозид (например, с урацилом) или реакция вообще не протекала (например, с цитозином) [247, 248]. Однако Хильберт и Джонсон, ограничив таутомерные сдвиги благодаря использованию 2,6-диалкоксопириимидинов,

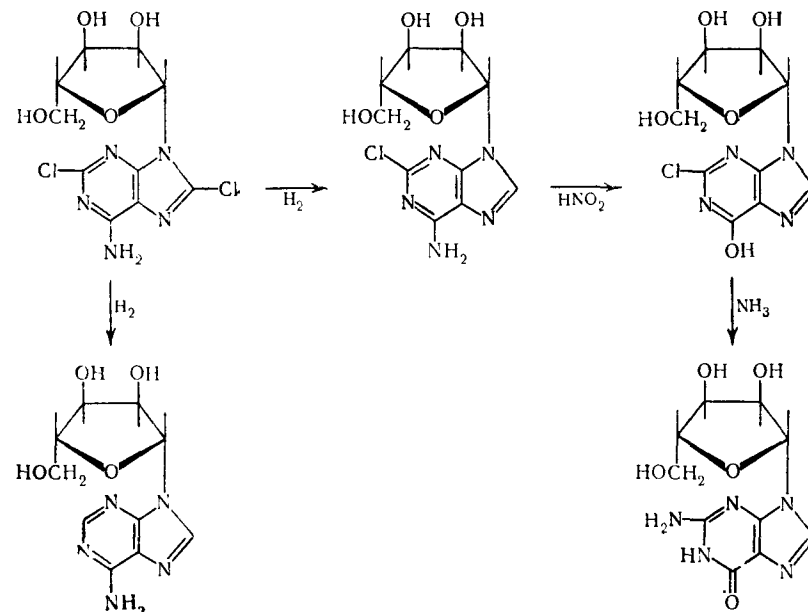
смогли получить гликозилпиримидины, которые по аналогии с продуктом взаимодействия между иодистым метилом и 2,6-диэтоксипиримидином оказались N³-гликозильными производными [249]. Таким образом, в результате взаимодействия 2,6-диэтоксипиримидина с ацетобромглюкозой получили продукт, из которого этильные или ацетильные группы можно было удалить или обработкой раствором хлористого водорода в метиловом спирте с образованием 3-D-гликозилурацила или раствором аммиака в метиловом спирте с образованием 3-D-гликозилцитозина [249, 250]. Этим способом было получено большое число глюкопиранозилпиримидинов, но применить его для синтеза природных нуклеозидов не удавалось до тех пор, пока не был найден необходимый для этого синтеза рибофуранозилгалогенид. В 1947 г. Говард, Литго и Тодд, исходя из ацетобромрибофуранозы и 2,6-диэтоксипиримидина, получили цитидин (а следовательно, и уридин после дезаминирования) [251].



Усовершенствование первоначального метода Фишера — Гельфериха, заключающееся в использовании три-О-ацетил-D-рибофуранозилхлорида и серебряной соли 2,8-дихлораденина, дало возможность получить аденозин и гуанозин [252]. Полное гидрогенолитическое дегалогенирование промежуточного 9-β-D-рибофуранозил-2,8-дихлораденина привело к образованию аденозина, а при частичном дегалогенировании (хлор в положении 8 более реакционноспособен, чем хлор в положении 2) получался 2-хлораденозин.

После дезаминирования продукта под действием азотистой кислоты образовывался 2-хлор-6-оксипуриновый нуклеозид, который при действии аммиака превращался в гуанозин.

Такие подходы для создания нуклеозидов, несмотря на то что они позволили осуществить синтез природных нуклеозидов, были несколько ограниченными, так как выходы обычно были низкими и, кроме того, они не применимы к пуринам, содержащим достаточно основную аминогруппу, способную реагировать с гликозилгалогенидом. Это препятствие было преодолено предварительным ацилированием аминогруппы, а применение хлормеркурипроизводных пуринов вместо серебряных солей позволило значительно увеличить выходы [253]. Усовершенствование методов получения три-О-ацилрибофуранозилгалогенидов также способствовало созданию наиболее удобного и эффективного пути синтеза как природных нуклеозидов, так и большого ряда их аналогов. Таким путем были

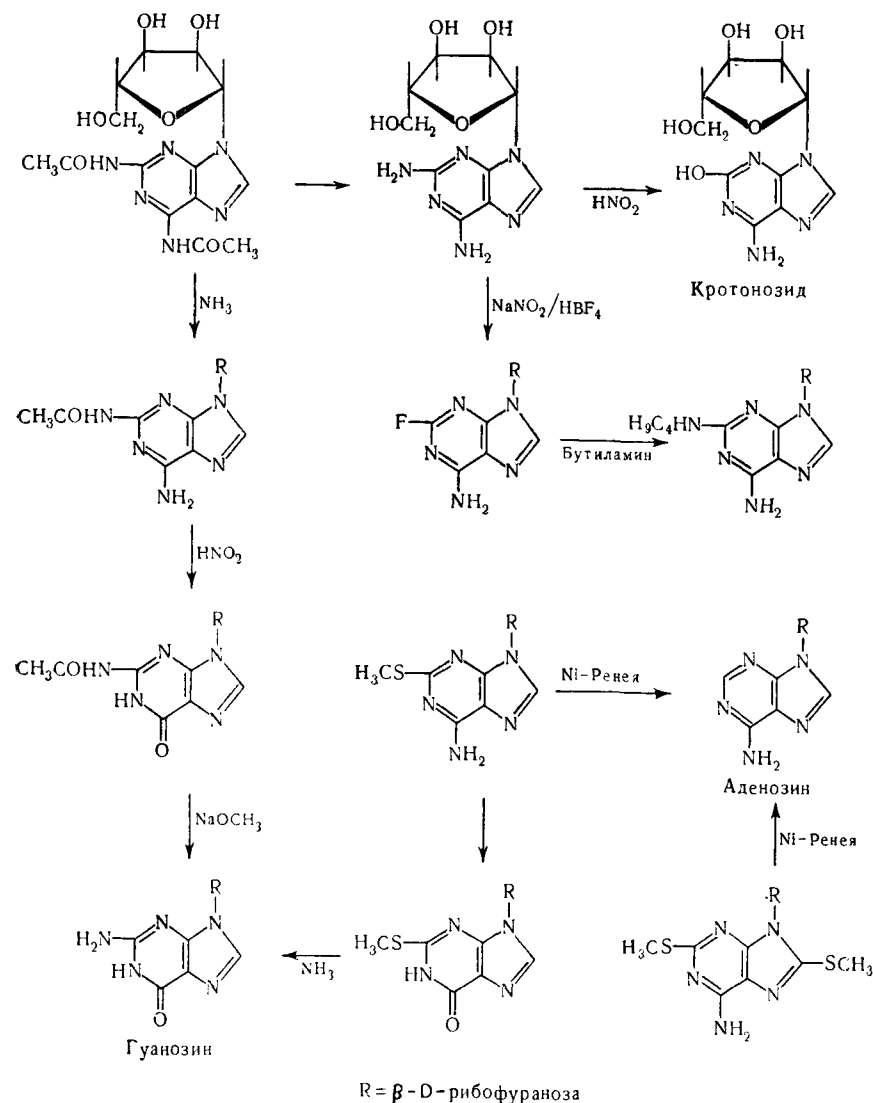


получены 9-гликозилпурины, производные D-рибофуранозы [254], D-глюкофуранозы [255], L-галактофуранозы [256], L-рамнопиранозы [257], L-рамнофуранозы [258], 6-дезоксид-глюкофуранозы [259], 6-дезоксид-L-идофуранозы [260], 6-дезоксид-D-аллофуранозы [261], тритилированной D-рибофуранозы [262], 5-дезоксид-D-рибофуранозы [263], 5-дезоксид-5-фтор-D-рибофуранозы [264], лактозы [265], мальтозы [266], целлобиозы [266], дигитоксозы [267],

2-дезоксиглюкозы [267]. Синтезирован также ряд аналогов аминокнуклеозида, производного пурицина [268, 269], например 3'-амино-3'-дезоксаденозин [270]. Таким же образом при действии на хлормеркурипроизводное 6-ацетаминопурина ациклического производного сахара 1-хлор-1-дезоксид-1-О-метил-пента-О-ацетил-альдегидо-D-галактозы с последующим удалением ацильных групп получают α - и β -аномеры 1-(9-аденил)-1-дезоксид-1-О-метилальдегидо-D-галактозы [271]. Кроме того, широко варьируя состав пуриновой части молекулы [272—274], были получены такие нуклеозиды, как 1- и 2- β -D-рибофуранозилпиразол-[3,4-*d*]-пиримидины и 8-аза-аналоги аденозина, гуанозина, инозина и ксантозина [276].

На основании различной устойчивости ацетамидной связи в реакции деацетилирования и аминогрупп к действию азотистой кислоты [253, 277] были проведены синтезы гуанозина и изогуанозина через стадию образования О-ацетилрибофуранозил-2,6-диацетаминопурина [253]. Были использованы различия в реакционной способности 2- и 6-хлорзамещенных пуринов [278, 279]. Диазотирование в соответствующих условиях 2,6-диамино-9- β -D-рибофуранозилпурина и тиогуанозина в присутствии фтороборной кислоты приводит к образованию 2-фторпроизводных. 2-Фторзамещенные нуклеозиды значительно более активны, чем соответствующие хлорзамещенные. При действии бутиламина 2-фтораденозин легко превращается в 2-бутиламиноаденозин [280]. В ряде случаев оказались полезными метилтиопроизводные пуринов, а в отдельных случаях, как, например, при реакции хлормеркурипроизводного 2,8-диметилтиоаденина с 2,3,5-три-О-бензоилрибофуранозилхлоридом, защита 6-аминогруппы оказывается ненужной. В результате отщепления метилтиогрупп от промежуточно образовавшегося 9- β -D-три-О-бензоилрибофуранозил-2,8-диметилтио-6-аминопурина в присутствии никеля Ренея с последующим удалением бензоильных групп был получен аденозин [281].

Тот факт, что стереохимия гликозидной связи в такого рода синтезах контролируется 2-ацилоксигруппой сахара, нашел свое отражение в очень ценном правиле, предложенном Бейкером с сотрудниками [282] в 1954 г. Согласно этому правилу, при конденсации пуринового (или пиримидинового) производного тяжелого металла с ацилированным гликозилгалогенидом будет образовываться нуклеозид с C_1 — C_2 -*транс*-конфигурацией сахара, независимо от первоначальной конфигурации атомов C_1 — C_2 . Обычно в реакциях галогеносахаров с C_1 — C_2 -*цис*-конфигурацией происходит простое вальденовское обращение; C_1 — C_2 -*транс*-галогеносахара реагируют с двойным вальденовским обращением, так как сначала конфигурация при C_1 обращается при участии соседней C_2 -ацилоксигруппы с образованием иона *орто*-эфира, а затем при

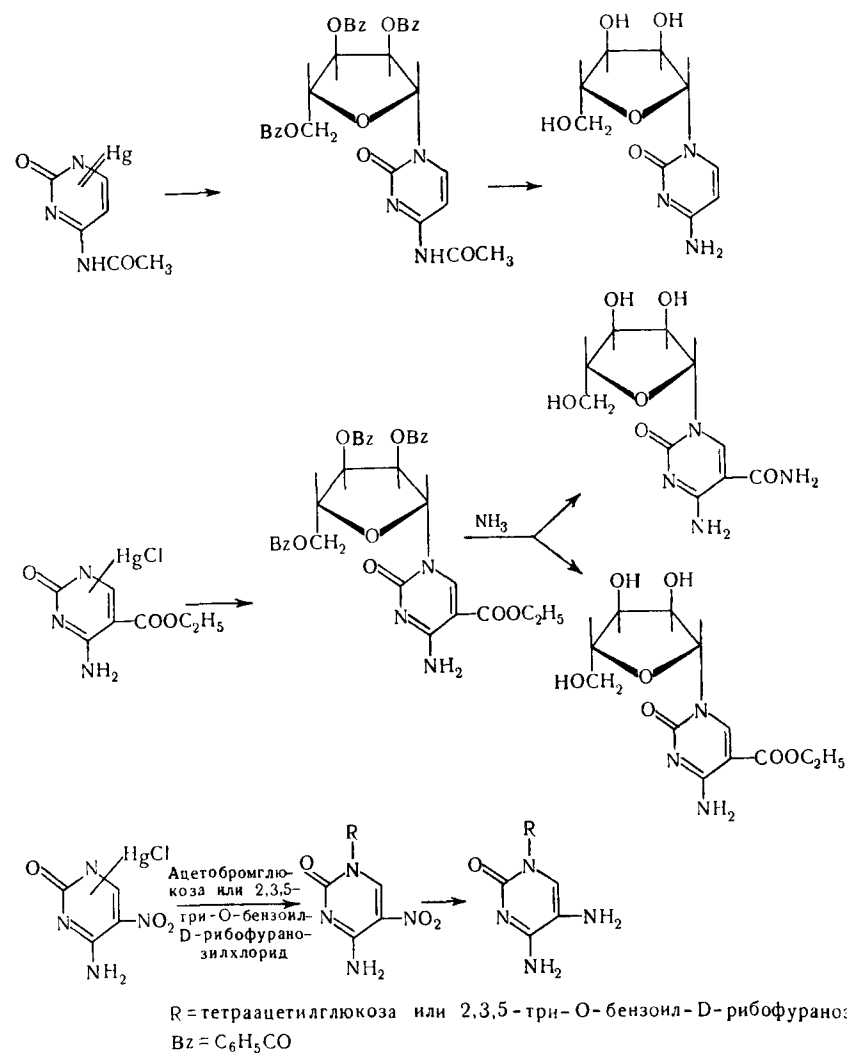


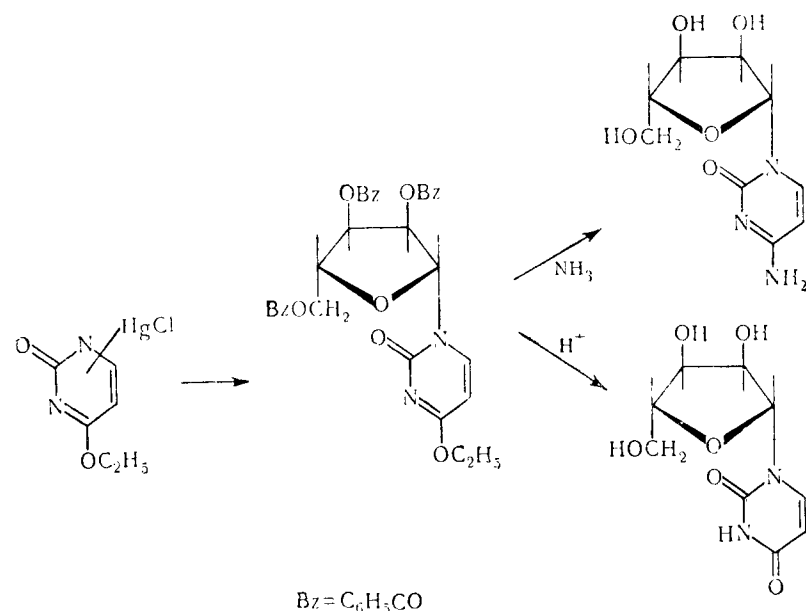
реакции с основанием происходит вторая инверсия. Как было показано, это правило является хорошо обоснованным и фактически применяется сейчас как доказательство конфигурации. Но иногда наряду с хорошим выходом ожидаемого изомера образуется небольшое количество аномера, а при использовании

ртути с ацилированным галогенсахаром с последующим удалением защитных групп приводила к образованию с хорошим выходом N³-гликозилпиримидина. Таким же образом были получены 3-β-D-рибофуранозилтимин и 3-β-D-ксилофуранозилтимин. Были синтезированы все четыре возможных 3-β-D-альдопентозофуранозилтимина. Соответствующие тиминовые производные β-арабинофуранозы и β-ликофуранозы получались в результате инверсии у атома C_{2'} в рибо- и ксилонуклеозидах соответственно. Определение конфигурации полученных продуктов обычными методами показало, что *транс*-правило применимо также и к синтезу пиримидиновых нуклеозидов. Значительные успехи были достигнуты при применении этого метода для синтеза N³-гликозилпиримидинов (урацила, цитозина и тимина), а также при использовании соответствующих галогенсахаров для синтеза 3'- и 5'-аминонуклеозидов [285] и 5'-фтор-5'-дезоксинуклеозидов [264]. Этим путем были получены рибофуранозильные (3-β-D-) производные 5-фторурацила [286], 6-деоксиурацила (2-оксо-2,3-дигидропиримидина) [287, 288] и изомерного 4-оксо-3,4-дигидропиримидина [288], 4-азатимина [289] и 4-азаурацила [290]. Из азапиримидинов образуется смесь 1- и 3-рибофуранозильных производных. Несколько лучший метод синтеза N³-гликозидов заключается в использовании N¹-дифенилметил-4-азаурацила (полученного при действии дифенилдиазометана на 3-ацетил-4-азаурацил и гидролизе затем ацетамидной связи) с последующим гидрогенолитическим удалением бензгидрильной группы [291]. Аналогично были синтезированы α- и β-аномеры 2-дезоксид-4-азауридина [292]. Этот метод был также применен для синтеза 3-β-D-лактозил- и 3-β-D-целлобиозилцитозинов с использованием ртутного производного N-ацетилцитозина и соответствующего галогенсахара. В результате кислотного гидролиза этих дисахариднуклеозидов был получен 3-β-D-глюкопиранозилцитозин [293].

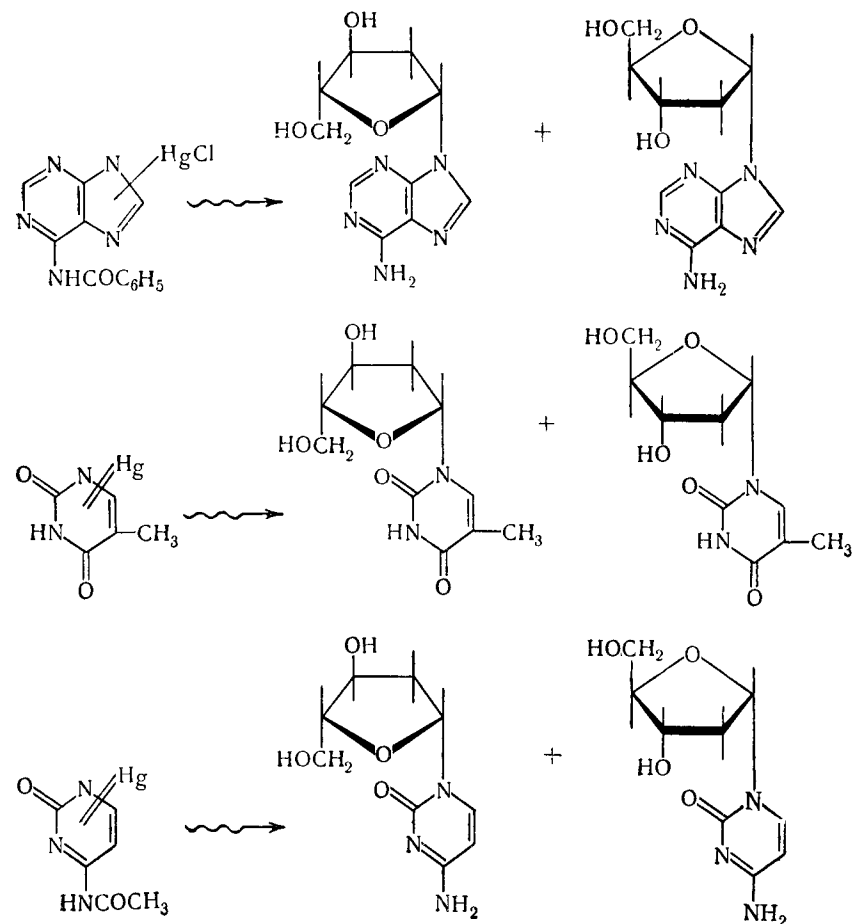
Хотя предварительное ацилирование аминогруппы самого цитозина является необходимым, в общем случае не всегда требуется защита аминопиримидинов. Так, например, хлормеркурипроизводные 5-карбэтоксцитозина [295] и 5-нитроцитозина [296] были непосредственно использованы для синтеза соответствующих 5-замещенных цитозиновых нуклеозидов; вероятно, в данном случае основность аминогруппы подавлена соседними заместителями, в результате чего исключается взаимодействие ее с галогенсахаром. Другой путь синтеза производных цитозина заключается в использовании хлормеркурипроизводного 6-этоксид-2-оксипиримидина. Промежуточный продукт конденсации его с галогенсахаром может быть превращен или в цитозиновый нуклеозид при действии аммиака, или после кислотного гидролиза в производное урацила [294].

Недавно ртутный метод был применен также для синтеза природных 2'-дезоксинуклеозидов. Ранние попытки осуществить синтез дезоксинуклеозидов с использованием защищенной 2-дезоксигалогенфуранозы оказывались в основном неудачными вследствие неустойчивости сахарной компоненты. Однако отщепления галогеноводорода удалось избежать, используя 3,5-ди-О-*n*-нитробензоил-2-дезоксид-D-рибофуранозилхлорид [297]. Он был получен





n-нитробензоилированием диизобутилдитиоацетала 2-дезоксид-рибозы до 5-О-*n*-нитробензоильного производного с последующим удалением тиогрупп и полным *n*-нитробензоилированием. Образующаяся в результате такой обработки смесь аномерных 1,3,5-три-О-*n*-нитробензоил-2-дезоксид-рибофураноз превращается в дезоксирибозилхлорид обычным путем. В результате конденсации этого галогенсахара с хлормеркурпроизводным 6-бензоиламинопурина в диметилсульфоксиде с последующим дезацелированием продукта была получена смесь 2'-дезоксиаденозина и неприродного α-аномера, которые можно разделить хроматографическим путем. Кроме того, были использованы кристаллические 3,5-ди-О-*n*-хлор- (или *n*-метил)бензоил-2-дезоксид-рибофуранозилхлориды [298—300]. Они получались с высоким выходом в результате ацилирования метил-2-дезоксид-(α,β)-D-рибофуранозиды с последующей обработкой полученного продукта раствором хлористого водорода и уксусной кислоты в эфире. При конденсации этого галогенсахара с соответствующими ртутными производными пиримидинов (моно-меркурпроизводные несколько более реакционноспособны, чем хлормеркур- или дипиримидилмеркурпроизводные) с последующим удалением защитных групп получают с отличными выходами тимидин и дезокситимидин, а также α-аномеры [300] в небольших количествах. Подобным образом были синтезированы аналоги



дезоксигуанидина и дезоксипуридина, содержащие фтор в положении 5 (как α-, так и β-нуклеозиды).

Описан синтез с очень низким выходом 2'-дезоксиаденозина и 2'-дезоксигуанозина (и соответственно дезоксинуклеозидов гипоксантина и ксантина) из серебряной соли 2,8-дихлораденина и 3,5-ди-О-ацетил-2-дезоксирiboфуранозилхлорида (1,3,5-три-О-ацетил-2-дезоксирибоза в эфирном растворе хлористого водорода) [301]. Обработка полученного 9-(3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксид-рибофуранозил)-2,8-дихлораденина методом, использованным ранее для синтеза аденозина и гуанозина из 2,8-дихлораденина, приводит к природным дезоксинуклеозидам. Кроме того, конденсацией хлормеркурпроизводного 6-бензоиламинопурина с диизопропил-

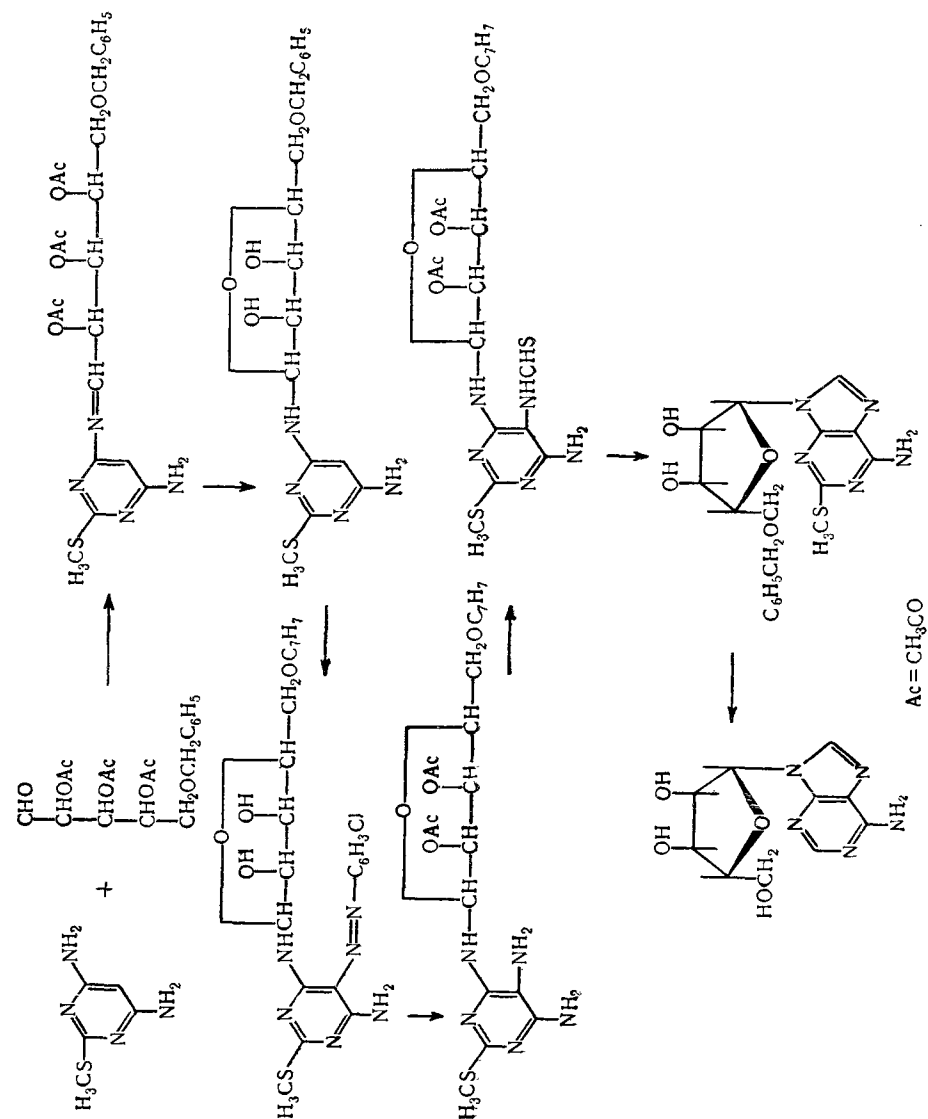
тиоацеталем 5-бензоил-2-дезоксид-Д-рибозы были получены α - и β -аномеры 2'-дезоксиаденозина [302].

Новый метод, который может быть использован для синтеза 2'-дезоксинуклеозидов, был применен при получении 9-(тетрагидро-2'-фурил)пуринов из 6-хлорпурина и 2,3-дигидрофурана в присутствии кислого катализатора [303]. Аналогично при взаимодействии 6-хлорпурина с 2,3-дигидропираном (в присутствии толуолсульфокислоты) образуется 6-хлор-9-(тетрагидро-2'-пиранил)пурин. При дальнейшем действии на этот «нуклеозид» аммиака, метиламина, диметиламина или меркаптанов получают соответствующие замещенные в положении 6; при действии этиленмина было получено 6-азиридилилпроизводное. Подобным образом из 2-ацетоксиметил-2,3-дигидропирана с последующим удалением ацетильной группы синтезированы 9-(2'-оксиметилтетрагидро-6'-пиранил)пурины [304].

Хорошим реагентом для синтеза нуклеозидов является этилполифосфат. Обработка смеси незащищенного пурина или пиримидина и полифосфатного эфира незащищенным сахаром приводит сразу к образованию с хорошим выходом природных нуклеозидов [305]. Например, из аденина и рибозы получается 9- β -Д-рибофуранозил-аденин; с помощью этой одностадийной реакции был синтезирован также дезоксиаденозин (из аденина и 2-деоксирибозы) с выходом около 30%. Ряд других природных и неприродных нуклеозидов был получен аналогичным путем, и, вероятно, полная разработка этого метода позволит объяснить преимущественное образование природных нуклеозидов (а не чрезвычайно сложной смеси, которую можно ожидать) и, следовательно, объяснит эволюционный биосинтез нуклеозидов со специфической структурой. Таким же путем были получены небольшие количества моноклеотидов.

Аналогично описанному синтезу триакантина (6-амино-3- γ , γ -диметилаллилпурина) алкилированием аденина при действии γ , γ -диметилаллилбромидом [365] обработка аденина 2,3,5-три-О-ацетил(или бензоил)рибофуранозилбромидом в диметилформамиде приводит к 3-рибофуранозиладенину (после удаления ацильных групп) наряду с другими продуктами [366].

Класс 2. Образование нуклеозида из простого гликозильного производного. Этот тип синтеза, впервые успешно примененный Тоддом с сотрудниками, послужил однозначным доказательством положения гликозильного остатка в природных пуриновых нуклеозидах. Кроме того, он представлял собой общий метод получения ряда 9-гликозилпуринов, включая аденозин [306]. По методу, использованному Тоддом, пуриновые нуклеозиды образуются из гликозил-аминопиримидинов путем создания имидазольного кольца. При действии на 4,6-диамино-2-метилтиопиримидин (2-метилтиозаместитель увеличивает реакционную способность аминопиримидина)



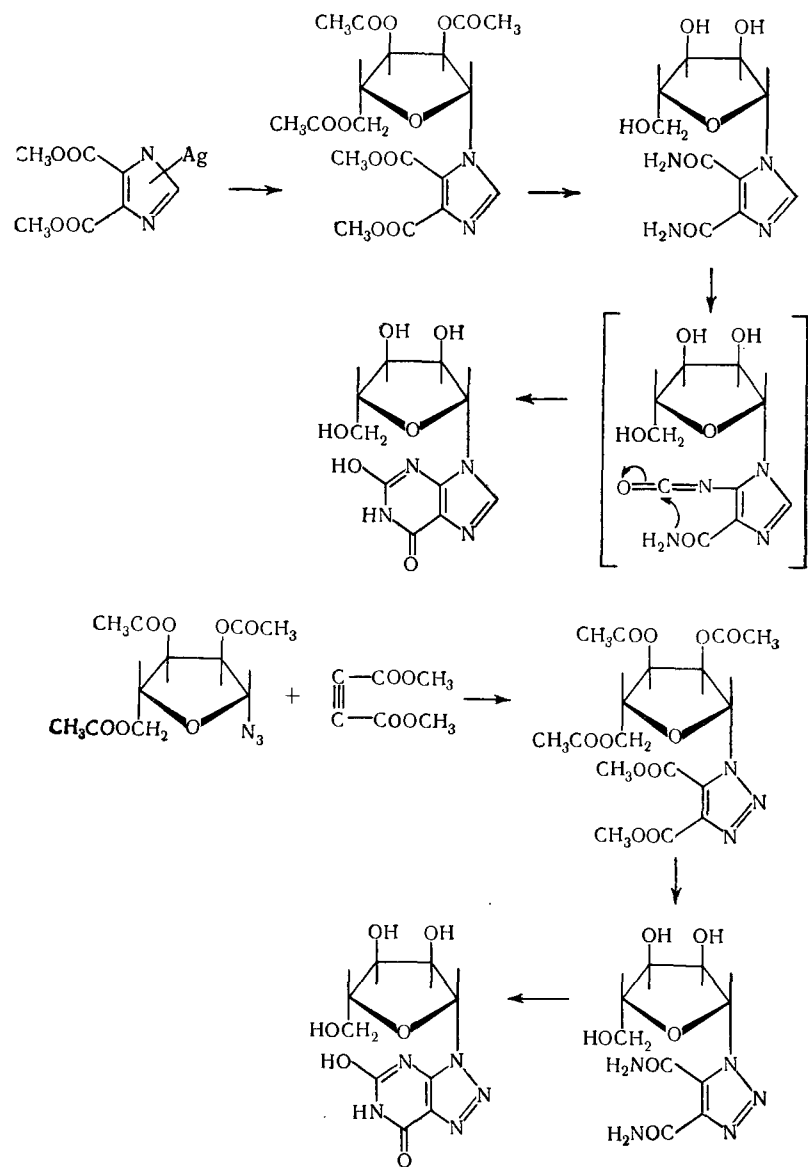
2,3,4-три-О-ацетил-5-О-бензил-D-рибозы (5-бензильная группа предотвращает фурано-пиранозную изомеризацию) получается шиффово основание, при дезацетилировании которого образуется 5'-О-бензил-D-рибофуранозильное производное; последнее сочетают с диазотированным 2,5-дихлоранилином. Неочищенное азосоединение ацетируют, затем очищают с помощью хроматографии, восстанавливают цинком в уксусной кислоте до 5-аминопроизводного, которое при последующем действии дитиомуравьиной кислоты дает тиоформильное производное. Под действием метилата натрия образовавшийся 2-метилтио-4-(5'-О-бензил-D-рибофуранозиламино)-5-тиоформамидо-6-аминопиримидин циклизуется, продукт вновь ацетируют и обрабатывают никелем Ренея для удаления 2-метилтио- и 5'-бензильной групп. После дезацетилирования получается аденозин, как и следовало ожидать, с довольно низким суммарным выходом.

Аналогичный прием был использован для получения 9-оксипуринов из 4,6-дихлор-5-аминопиримидина и α -амино- ω -оксипуринов с последующим замыканием цикла в присутствии уксусного ангидрида и этилортоформиата, в результате чего образуется 9-замещенный 6-хлорпурин [307]. По-видимому, этот метод пригоден для синтеза пуриновых нуклеозидов из рибозиламина (см. также стр. 91).

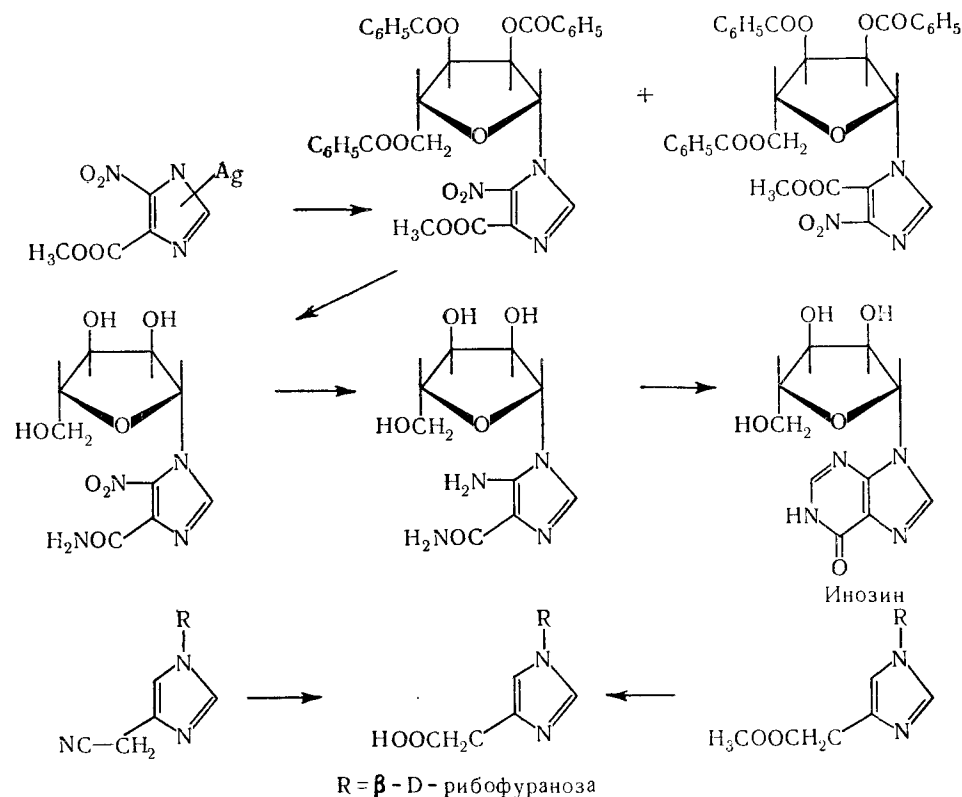
В другом методе синтеза в качестве исходного вещества используют гликозилимидазол, из которого, наращивая пиримидиновое кольцо, получают гликозилпурин.

Взаимодействие 2,3,5-три-О-ацетил-D-рибофуранозилхлорида и серебряной соли диметилового эфира имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты приводит к соединению, дальнейшая обработка которого аммиаком дает диамид 1-D-рибофуранозилимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты. Замыкание имидазольного кольца в этом соединении по модифицированной реакции Гофмана при действии щелочного гипобромита привело к образованию ксантозина [308]. Вариация этого метода была использована недавно для синтеза 7- и 9-гликозильных (включая β -D-рибофуранозильные) производных 8-азаксантина, исходя из гликозиламида и диметилового эфира ацетилендикарбоновой кислоты [309, 310]. Дополнительное исследование реакции, приводящей к замыканию кольца в диамиде 1- β -D-глюкопиранозилимидазол-4,5-дикарбоновой кислоты, показало, что, кроме 9- β -D-глюкопиранозилксантина, образуется также небольшое количество 7-гликозильного производного [310].

Подобным образом при действии 2,3,5-три-О-бензоил-D-рибофуранозилхлорида на серебряную или ртутную соль метилового эфира 5-нитроимидазол-4-карбоновой кислоты получается смесь рибозильных производных (гликозидная связь у любого из двух атомов азота кольца), которые в присутствии раствора аммиака



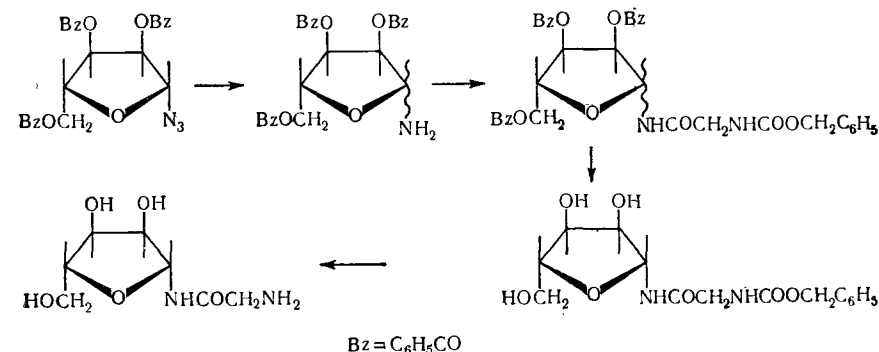
в метиловом спирте превращаются в соответствующие нитроамиды. Эти соединения разделяются с помощью противоточного распределения. Каталитическое восстановление 1-β-D-рибофуранозил-5-нитроимидазол-4-карбоксимида приводит к 1-рибозил-5-аминоимидазол-4-карбоксимиду, который через формильное производное может быть превращен далее в инозин [311].



Таким же путем был синтезирован метаболит гистамина, 1-β-D-рибофуранозилимидазол-4(5)-уксусная кислота, из хлормеркурипроизводного 4(5)-цианметилимидазола [312] [или метилового эфира имидазол-4(5)-уксусной кислоты] [313] и три-О-бензоил-β-D-рибофуранозилхлорида с последующим гидролизом полученного продукта в мягких условиях.

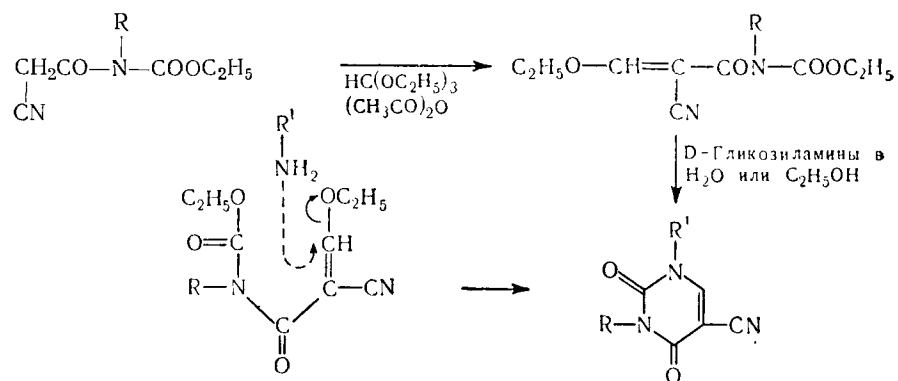
Применение гликозилазидных промежуточных соединений, о которых говорилось выше, было развито далее Беддиди с сотрудни-

ками при химическом исследовании, повторяющем процесс биосинтеза пуриновых нуклеозидов. При действии азидата натрия на 2,3,5-три-О-бензоил-β-D-рибофуранозилхлорид получался гликозил-β-азид, конфигурация которого была доказана периодатным окислением дебензоилированного соединения, в результате чего образовался диальдегид, идентичный диальдегиду, полученному из β-D-гликопиранозилазида. При каталитическом восстановлении 2,3,5-три-О-бензоил-β-D-рибофуранозилазида получается смесь аномеров рибозиламинов, которая при действии на нее хлорангидрида (или смешанного ангидрида с этиловым эфиром угольной кислоты) карбобензоксиглицина с последующим дебензоилированием метилатом натрия дает α- и β-аномеры N-(карбобензоксиглицил)-D-рибофуранозиламина. Эти вещества легко разделяются кристаллизацией. Гидрирование последних приводит к N-глицилрибофуранозиламинам, α- и β-аномеры которых относительно стабильны в противоположность легко подвергающимся мутаротации рибофуранозиламинам [314].



Для получения пиримидиновых нуклеозидов была использована реакция замыкания кольца в производном гликозиламина. При взаимодействии D-гликозиламинов с α-циан-β-этокси-N-этоксикарбониллакриламидом получают различные 6-циан-3-D-гликозилурацилы [315]; подобным образом из β-этокси-N-этоксикарбониллакриламида и три-О-бензоил-D-рибофуранозиламина (смесь α- и β-изомеров) с последующим дебензоилированием продукта был синтезирован уридин [316] (см. схему на стр. 88).

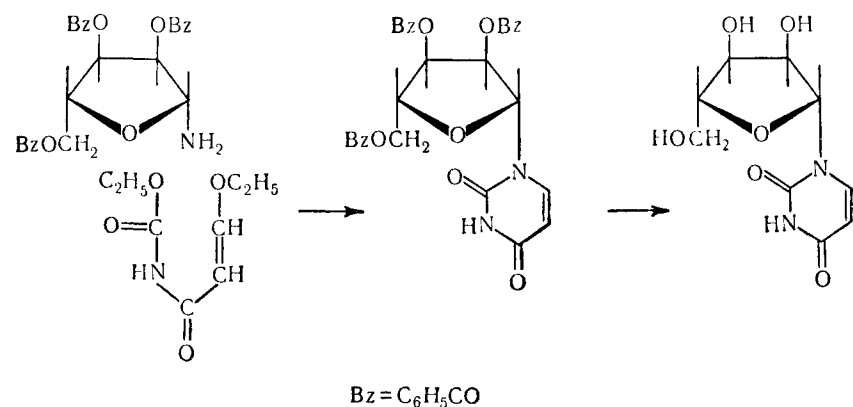
Аналогичная реакция три-О-бензоил-D-рибофуранозиламина с β-этоксикакрилоилизотиоцианатом или β-метокси-α-метилакрилоилизотиоцианатом после снятия бензоильных групп приводит к 2-тиоуридину (при действии водного раствора хлоруксусной кислоты



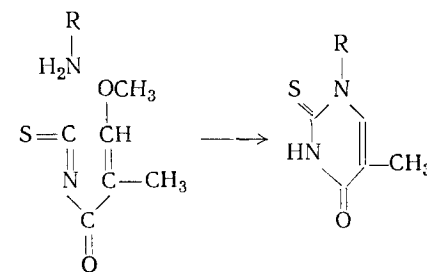
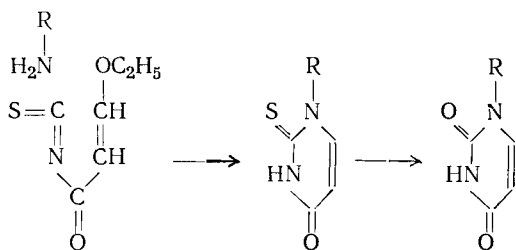
$R = H$, $R' =$ рибо-, ксило-, галакто-, глюко- и 2-дезоксиглюкопиранозилы

$R = H$, $R' =$ рибифуранозил

$R = CH_3$, $R' =$ рибо-, ксило-, галакто- и глюкопиранозилы

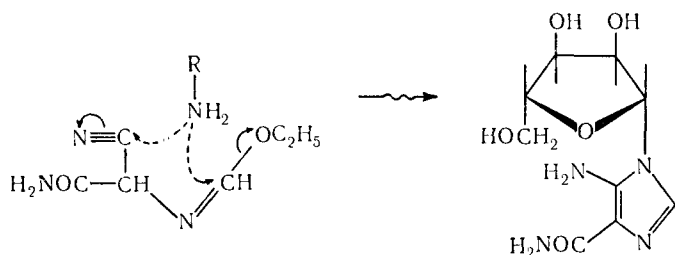


превращающемся в уридин) или соответственно к 5-метил-2-тио-уридину [316].



Во всех случаях был получен только β -нуклеозид, а изомерные α -соединения не были обнаружены. Вероятно, синтез пиридинового нуклеозидов через стадию образования линейных предшественников типа рибоза — $NHCH=CRCO-NHCOOC_2H_5$ протекает по общему правилу, давая соединения с 1,2-*транс*-конфигурацией при гликозидной связи; молекулярные модели свидетельствуют о том, что β -линейные формы будут циклизироваться легче, чем α -аномеры, в которых бензоильные группы оказывают стерические препятствия для NH-группы [316].

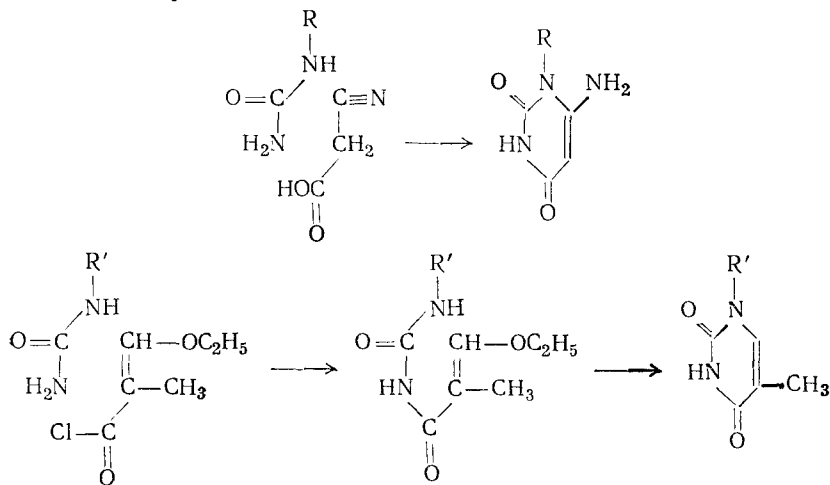
В другом методе синтеза 5-амино-1- β -D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамида также используется линейное производное рибифуранозиламина. При реакции иминоэфира этил-N-(карбамоилцианометил)формамида (легко получаемого из хлоргидрата этилформимида и α -амино- α -цианацетамида в водном растворе) с 2,3,5-три-O-бензоилрибофуранозиламином с последующим дебензоилированием получающегося соединения был выделен с хорошим выходом 5-амино-1- β -D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамида, структура которого была установлена превращением в инозин при действии на него муравьиной кислотой в уксусном ангидриде [317]. Подобно этому при реакции с формимидом, полученным из метилового эфира α -амино- α -циануксусной кислоты, вместо α -амино- α -цианацетамида образуется метиловый эфир 5-амино- β -D-рибофуранозилимидазол-4-карбоновой кислоты [318]. Он был превращен далее обычным путем в 5'-фосфат 5-амино-1- β -D-рибофуранозилимидазол-4-карбоновой кислоты. Аналогичным образом при обработке 5-амино-2',3'-O-изопропилиден-1- β -D-рибофуранозилимидазол-4-карбоновой кислоты диметилловым эфиром L-аспарагиновой кислоты и дидиклогексилкарбодиимидом с последующим фосфорилированием полученного соединения (2-цианэтилфосфатом в присутствии дидиклогексилкарбодиимида) и снятием защитных групп был получен с хорошим общим выходом 5'-фосфат N-(5-амино-1- β -D-рибофуранозил-4-имидазолилкарбонил)-L-аспарагиновой кислоты (т. е. сукциниламиноимидазолкарбоксамидрибонуклеотид, другое



$RNH_2 = 2,3,5$ -три-О-бензонлрибофуранозиламин

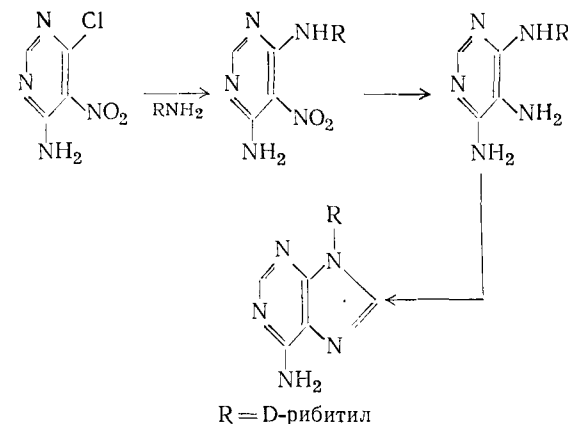
промежуточное соединение в биосинтезе пуриновых нуклеотидов) [319].

Описан синтез некоторых 3-D-гликозильных производных 4-аминоурацила по реакции Траубе между производными О-ацилгликозилмочевин и циануксусной кислотой [320]. Родственный этому метод был также использован для синтеза тимидина [321]. Мочевина конденсируется с 3,5-ди-О-бензоил(или *n*-толуил, анизоил, *n*-хлорбензоил или *n*-нитробензоил)-2-дезоксид-рибофуранозой, и получающийся продукт вводится в реакцию с хлорангидридом β-этилокси-α-метакриловой кислоты, в результате которой образуется 1-(β-этоксид-α-метакрилоил)-3-(3',5'-ди-О-бензоил-2'-дезоксид-рибофуранозил)мочевина. Циклизация последней приводит к 3',5'-ди-О-ацитимидину, из которого обычным путем получают свободный дезоксинуклеозид.



$R' = 3,5$ -ди-О-бензоил-2-дезоксид-рибофураноза

Различные глицилпурины и глицилтриазолпиримидины были синтезированы замыканием кольца в соответствующих 5-амино-4-глицилпиримидинах. Последние легко получают при действии на 4-хлор-5-нитропиримидин-глициламина в водном растворе с последующим восстановлением нитрогруппы [322]. Так, например, восстановление продукта, полученного из 6-амино-4-хлор-5-нитропиримидина и D-рибитамина, приводит к 5,6-диамино-4-D-рибитаминопиримидину, который после замыкания цикла дает 9-D-рибитаденин. Подобным образом из 2,5-диамино-6-окси-4-D-рибитаминопиримидина был получен 9-рибитилгуанин.

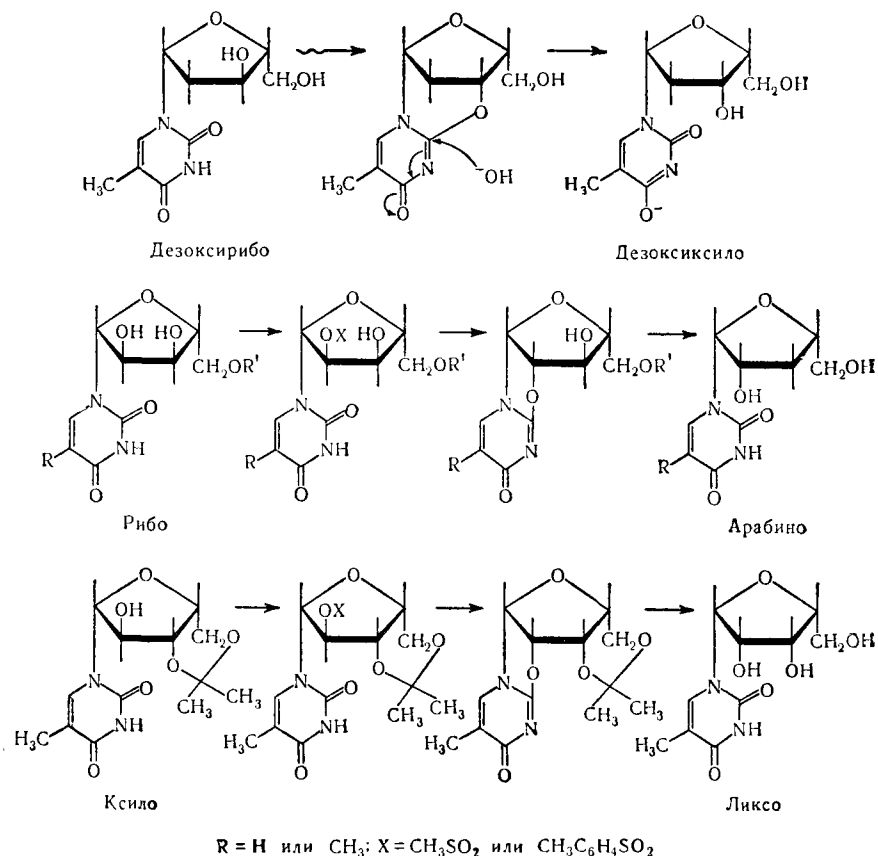


$R = D$ -рибитил

Класс 3. Модифицирование основания или сахара в готовом нуклеозиде. Инверсия гидроксильной группы сахара в результате образования циклонуклеозида впервые была отмечена для О²,3'-циклотимидина, который при щелочном гидролизе превращается в 3-β-D-2'-дезоксиксилофуранозилтимин [323]. Впоследствии подобные результаты были получены с рибонуклеозидами. Раскрытие кольца в О²,2'-циклонуклеозидах имеет большое значение для синтеза гликозильных аномеров, которые трудно получить описанными ранее методами ввиду действия C₁—C₂-транс-правила. Этим путем из соответствующих сульфилрибозильных (или ксилозильных) производных были получены спонгоурдин [324], 3-β-D-арабинофуранозилтимин (спонготимидин) [325], 3-β-D-арабинофуранозил-5-фторурацил [326] и 3-β-D-ликофуранозилтимин [327].

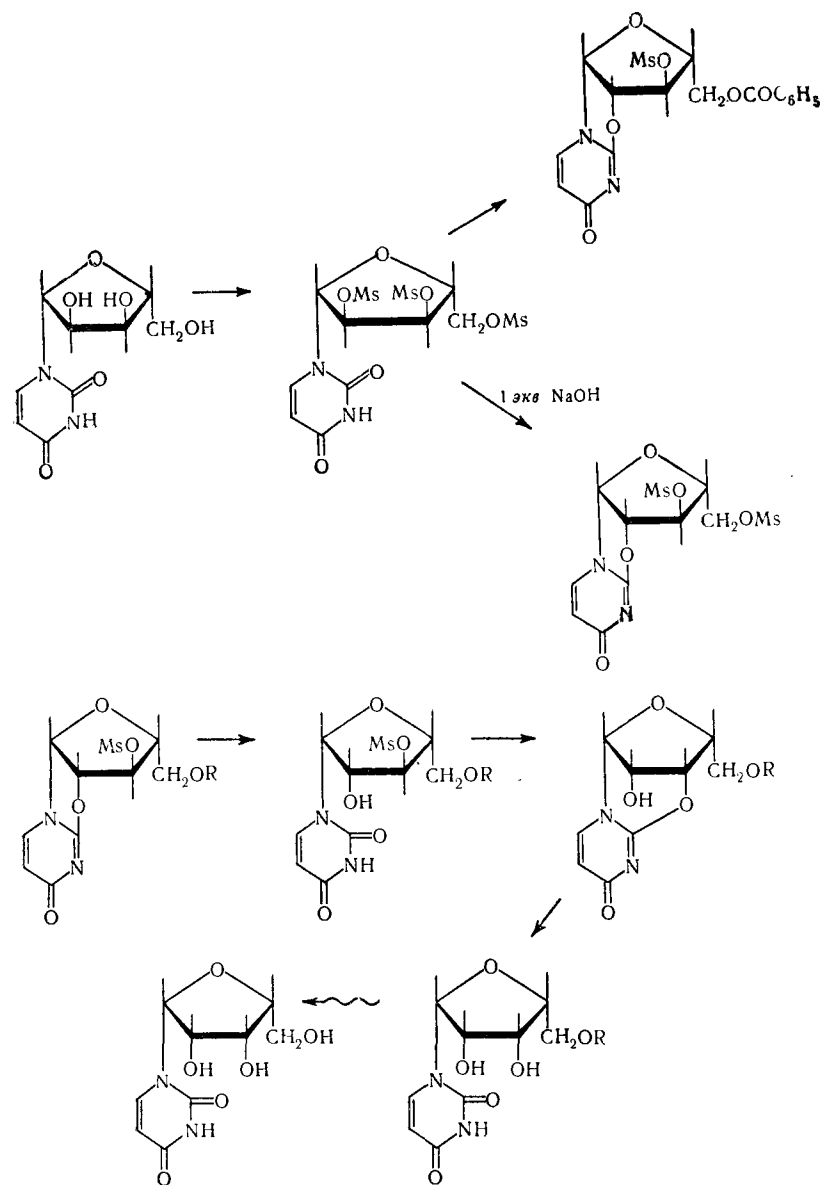
Подобным образом 3-β-D-ксилофуранозилурацил превращается в нуклеозид, содержащий ликсозу, через 2'-О-метансульфонил-3-β-D-ксилофуранозилурацил. Последний в присутствии одного эквивалента щелочи дает О²,2'-циклонуклеозид (с конфигурацией ликсозы), изомерный О²,2'-циклоуридину (с конфигурацией араби-

нозы). Дальнейшее действие щелочи приводит к образованию 3-β-D-ликсофуранозилурацила. При кипячении водного раствора 2'-О-метансульфонилнуклеозида также получается О²,2'-цикло-3-β-D-ликсофуранозилурацил; если продолжительность реакции увели-



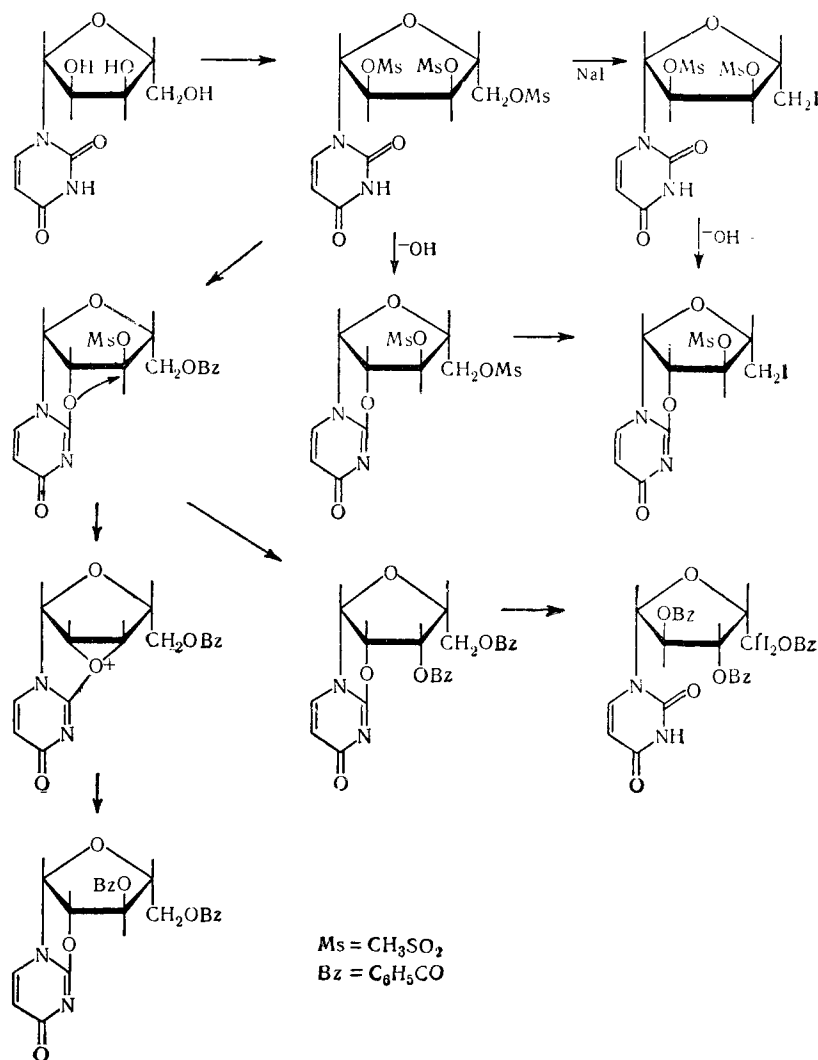
чить, то в результате освобождения метансульфокислоты будет происходить кислотный гидролиз циклонуклеозида и образуется 3-β-D-ликсофуранозилурацил [328].

Удобнее получать 3-β-D-ликсофуранозилурацил просто кипячением водного раствора 3',5'-ди-О-метансульфонил-О²,2'-циклоуридина (легко получающегося при обработке 2',3',5'-три-О-метансульфонилуридина одним эквивалентом едкого натра) или 5'-О-бензоил-3'-О-метансульфонил-О²,2'-циклоуридина. В ходе реакции промежуточными соединениями являются 3'-О-метансульфонил-3-β-D-арабинофуранозилурацил и О²,3'-циклоликсофуранозилура-

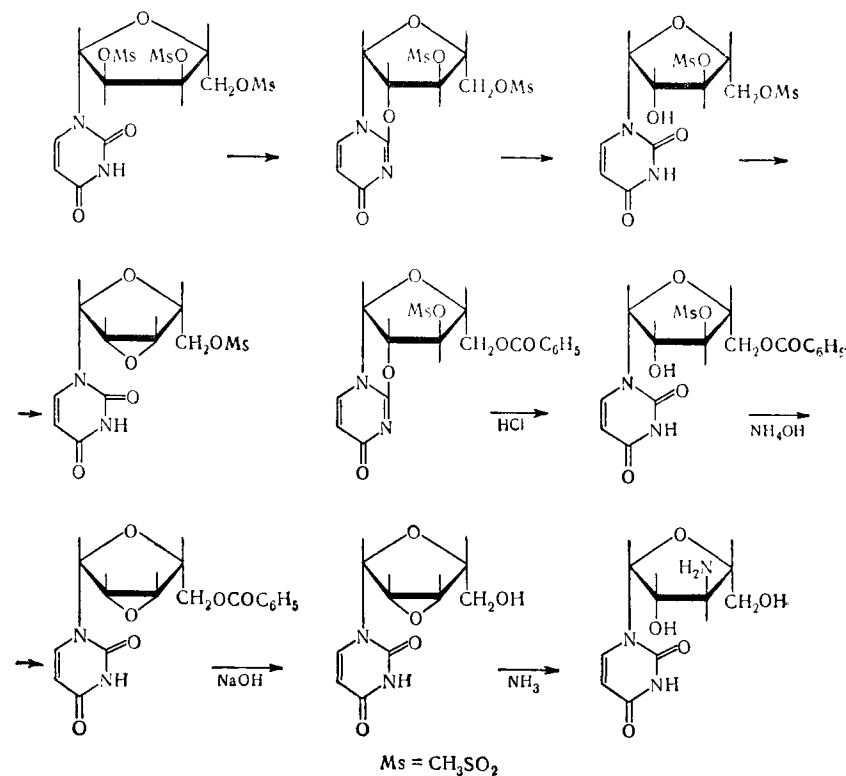


цил, причем последний гидролизуется в кислой среде (создающейся при освобождении метансульфокислоты) до производных ликсофуранозилурацила [329].

Универсальность 2',3',5'-три-О-метансульфонилируридина как промежуточного продукта для синтеза изомерных пентозофуранозилурацилов была показана достаточно полно [330]. Замещение всех трех сульфонилкислотных групп при нуклеофильной атаке может проте-

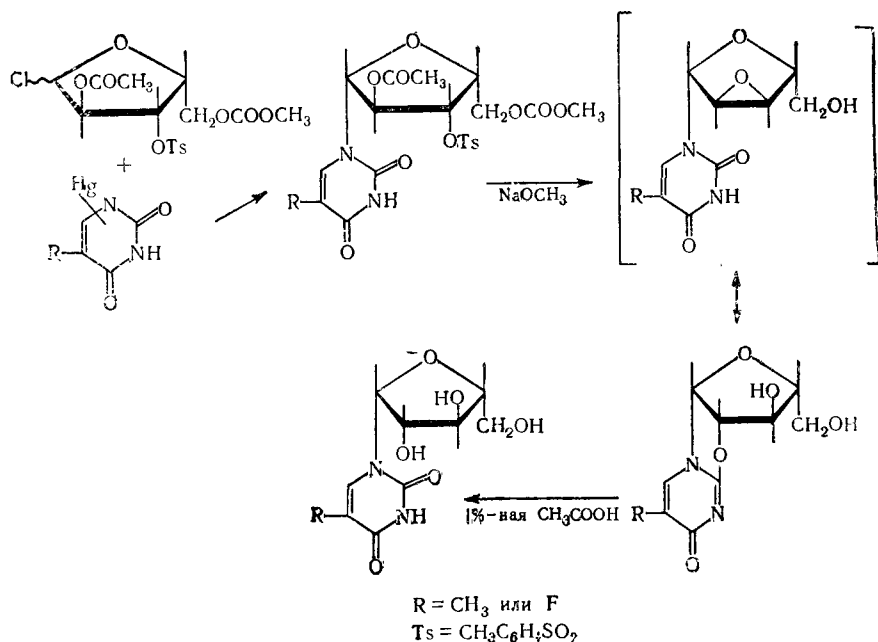


кать в мягких условиях. Обработка бензоатом натрия в диметилформамиде дает 3',5'-ди-О-бензоил-О²,2'-циклоуридин и 2',3',5'-три-О-бензоил-3-β-D-ксилофуранозилурацил; кроме того, щелочной гидролиз реакционной смеси (после удаления ранее названных соединений) приводит к получению всех четырех возможных 3-β-D-пентозофуранозилурацилов (рибозил-, арабинозил-, ксилозил- и ликсозилпроизводных). Предложены возможные механизмы образования этих соединений, среди которых следует упомянуть предположение об анхимерном эффекте кислорода в C₂—O—C_{2'}-группировке нуклеозида при образовании 3',5'-ди-О-бензоил-О²,2'-циклоуридина. В данном случае кислород оказывает нуклеофильное влияние на C_{3'}, участвуя в удалении 3'-метансульфонилкислотной группы и образуя быстро распадающееся циклическое оксониевое соединение. Последующая атака бензоат-иона (преимущественно у C_{3'}, а не у C_{2'} в соответствии с поведением 2',3'-эпоксипроизводных нуклеозидов) дает соединение, в котором в результате двух последовательных инверсий сохраняется исходная конфигурация у C_{3'} [330].



При действии на 2',3',5'-три-О-метансульфонилирудин трех эквивалентов водного раствора едкого натра получается нуклеозид-эпоксид, 5'-О-метансульфонил-2',3'-ангидро-3-β-D-лисофуранозилурацил, через стадии промежуточного образования 3',5'-ди-О-метансульфонил-О²,2'-циклоуридин и 3',5'-ди-О-метансульфонил-3-β-D-арабинофуранозилурацил [331]. Аналогично этому в результате кислотного гидролиза 5'-О-бензоил-3'-О-метансульфонил-О²,2'-циклоуридина получается бензоилметансульфониларабинозильный нуклеозид, который при действии разбавленным аммиаком дает 5'-О-бензоил-2',3'-ангидро-3-β-D-лисофуранозилурацил. Снятие бензоильной группы с последующей обработкой аммиаком приводит к аминонуклеозиду, 3'-амино-3'-дезоксид-3-β-D-арабинофуранозилурацилу [331].

Другой путь получения β-арабинозилпиримидиновых нуклеозидов состоит в синтезе О²,2'-циклонуклеозида через 2',3'-ангидрорибозильное производное. Конденсацией 2-О-ацетил-3-О-*n*-толуолсульфонил-5-О-метоксикарбонилксилофуранозилхлорида с дитиминртутью (или мономеркурпроизводным 5-фторурацила) получается β-нуклеозид, который при действии метилата натрия превращается в О²,2'-циклонуклеозид; при этом легко устанавливается под-



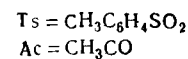
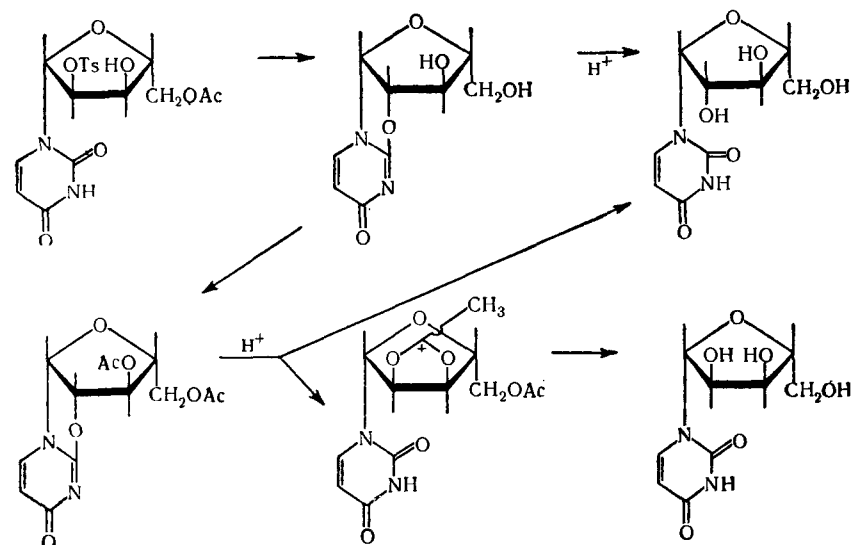
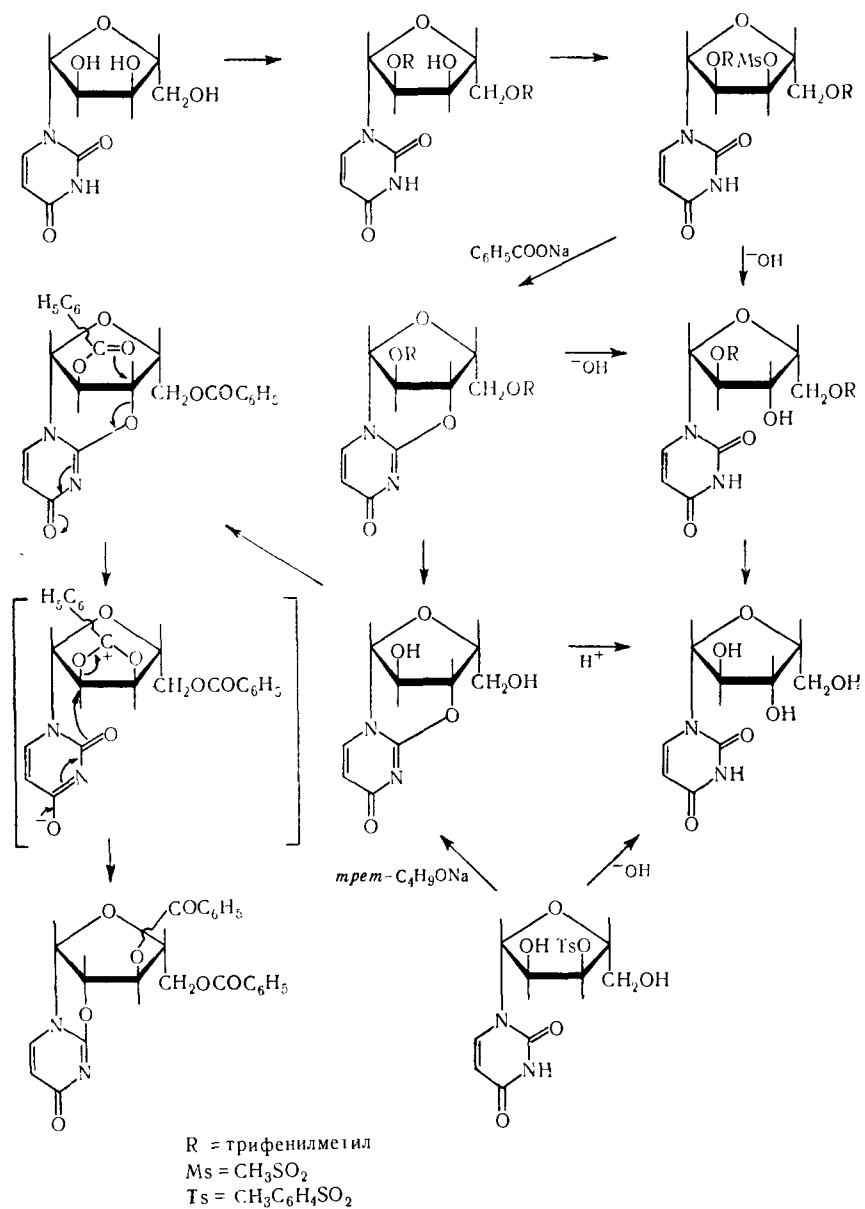
вижное равновесие между промежуточно образующимся 2',3'-ангидронуклеозидом и циклонуклеозидом [332]. Благодаря влиянию 2-кетогруппы пиримидина 2',3'-ангидрорибонуклеозид ведет себя не типично: при раскрытии эпексидного цикла атака проходит не по С₃, а по С₂, с образованием арабинозильного производного вместо нуклеозида, содержащего ксилозу.

Как было упомянуто выше, 3'-О-сульфонилтимидиновые производные легко превращаются в дезоксиксилофуранозильные нуклеозиды через О²,3'-циклонуклеозид, легко образующийся при действии слабых оснований [323]. Тот же метод был применен для производных уридина, хотя для получения этих циклонуклеозидов требуются несколько более сильные реагенты. Тритилирование уридина в соответствующих условиях приводит к 2',5'-ди-О-тритуридину (легко отделяемому кристаллизацией от изомерного 3',5'-дитритильного производного); дальнейшая обработка метансульфонилхлоридом приводит к 3'-О-метансульфонильному производному, которое при действии бензоата натрия в диметилформамиде превращается в 2',5'-ди-О-тритуридин-О²,3'-циклоуридин. После щелочного гидролиза этого защищенного циклонуклеозида (или непосредственно 2',5'-ди-О-тритуридин-3'-О-метансульфонуридина) с последующим снятием тритильных групп получается 3-β-D-ксилофуранозилурацил [328]. Интересно, что 3'-О-метансульфонуридин (полученный детритилированием защищенного производного) оказался устойчивым к действию бензоата натрия в диметилформамиде, и свободный циклонуклеозид был получен детритилированием дитритил-О²,3'-циклоуридина [328]. Несмотря на это, описано образование О²,3'-циклоуридина при действии на 3'-О-тозилуридин *трет*-бутилата натрия [333]. Прямой щелочной гидролиз этого сульфонильного производного дает 3-β-D-ксилофуранозилурацил [333]; он получается также при кислотном гидролизе О²,3'-циклоуридина [328].

Нагревание 2',5'-ди-О-бензоил-О²,3'-циклоуридина до температуры плавления вызывает быструю изомеризацию в 3',5'-ди-О-бензоил-О²,2'-циклоуридин, вероятно, через стадию образования иона ортоэфира. Таким образом, О²,3'-циклонуклеозид служит промежуточным соединением для получения как ксилофуранозильных, так и арабинозильных нуклеозидов [328].

Хотя О²,2'-циклоуридин гидролизуеться до 3-β-D-арабинофуранозилурацила (спонгоуридин), при кислотном гидролизе 3',5'-ди-О-ацетил-О²,2'-циклоуридина образуется смесь уридина и спонгоуридина, причем первый, по-видимому, получается благодаря вмешательству соседней ацильной группы и образованию промежуточного иона [334].

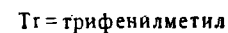
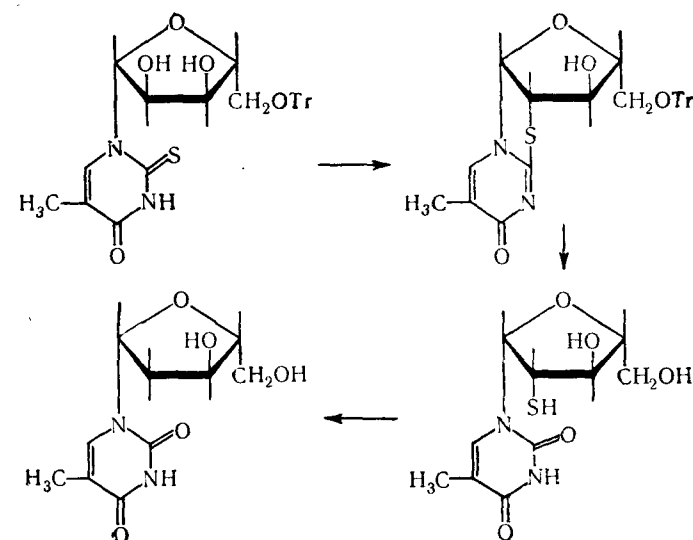
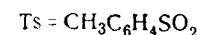
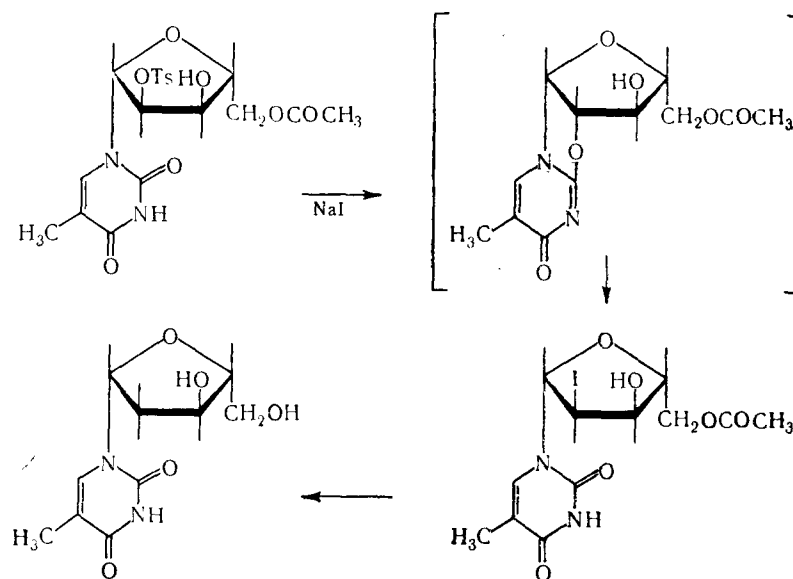
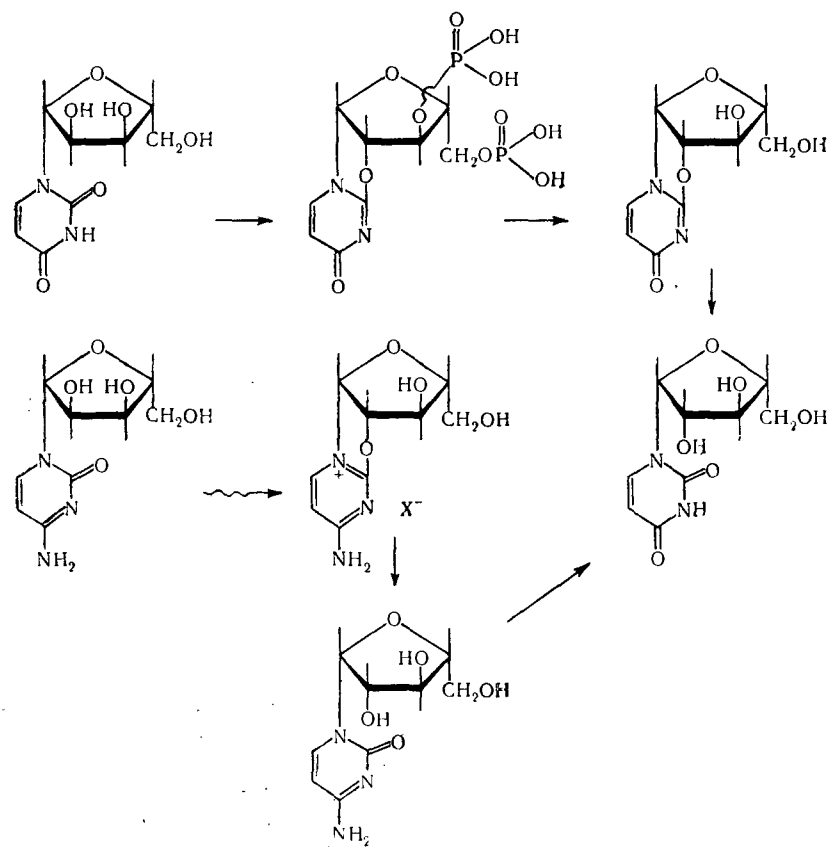
Продолжительная обработка цитидина полифосфорной кислотой с последующим дефосфорилированием продукта приводит к образо-



ванию O²,2'-циклоцитидина. Это соединение гидролизуеться щелочью до 3-β-D-арабинофуранозилцитозина, который после дезаминирования дает спонгоурин, получающийся также при аналогичной обработке уридина полифосфорной кислотой [335].

Помимо использования пиримидиновых O²,2'-циклонуклеозидов для специфической инверсии гидроксильных групп сахара, они оказались очень удобными промежуточными соединениями в синтезе 2'-дезоксинуклеозидов. Обработка 5'-O-ацетил-2'-O-тозилуридина иодидом натрия приводит к 5'-O-ацетил-2'-дезоксидуридину, из которого после гидрирования и дезацетилирования образуется 2'-дезоксиуридин [336]. Такое же иодпроизводное (с конфигурацией рибозы) было получено при действии иодида натрия и уксусной кислоты на 5'-O-ацетил-O²,2'-циклоуридин, который может снова образовываться из иодпроизводного при действии основания [334]. Вероятно, циклонуклеозид является промежуточным продуктом в реакции замещения *n*-толуолсульфонилоксигруппы на иод, причем конечный продукт образуется в результате двух замещений с инверсией у C_{2'}. Этим же методом из 5'-O-ацетил-3-β-D-рибофуранозилтимина был получен тимидин [336] (см. схему на стр. 101).

Подобное раскрытие кольца у O²,2'-циклоуридина (при котором имеет место нуклеофильная атака по C_{2'}) под действием безводного

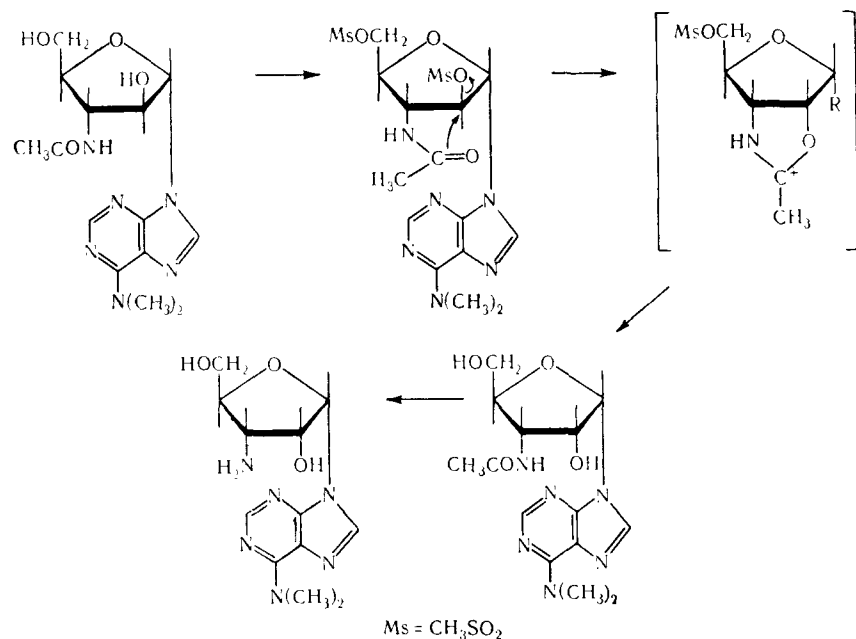


галогеноводорода приводит к образованию 2'-фтор-, 2'-хлор- и 2'-бром-2'-дезокситидинов, причем все имеют рибо-конфигурацию [337].

В другом методе 5'-О-триметил-5-метил-2-тиоуридин обрабатывается метансульфонилхлоридом в пиридине, и в этом случае непосредственно образуется циклонуклеозид. В результате кислотного гидролиза происходит раскрытие кольца, а после удаления тио-групп на никеле Ренея в щелочи образуется с небольшим выходом тимидин [338].

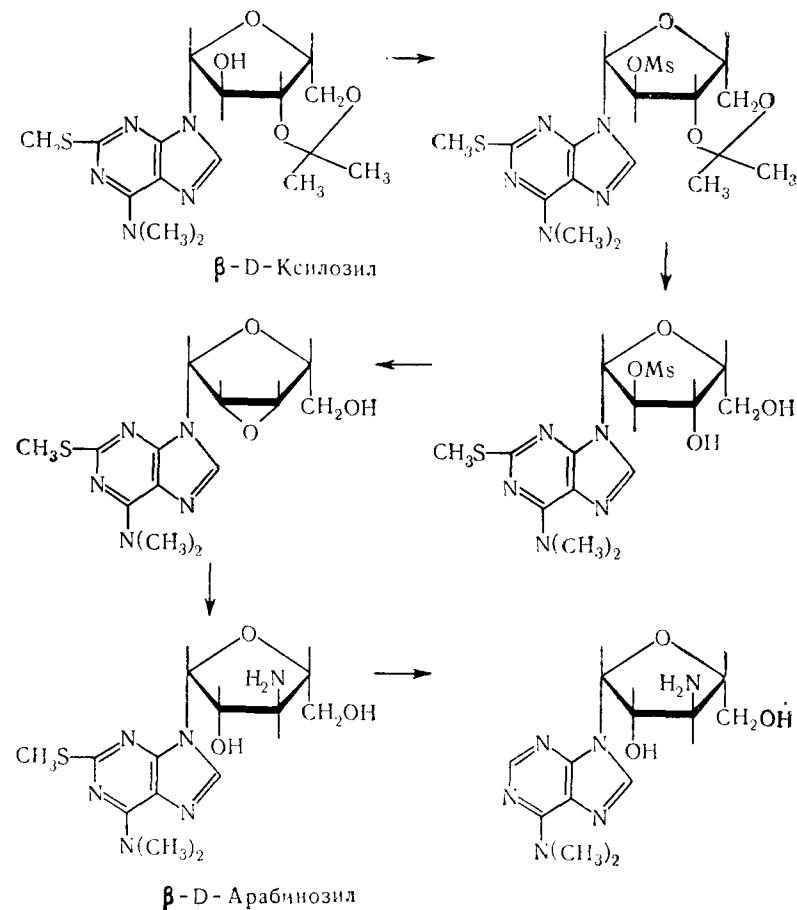
По стереохимическим соображениям гликозилпурины не могут образовывать циклонуклеозидов с гидроксильными группами в положении 2', и, во всяком случае, разрыв пуринового кольца прошел бы, по-видимому, как с солями N³,5'-циклонуклеозидов. Однако Бейкер и сотрудники весьма эффективно использовали реак-

ции, аналогичные образованию циклонуклеозида (и аналогичные превращению *транс*-2-бензамидоциклогексилтозилата в *цис*-2-аминоциклогексанол через стадию промежуточного образования *цис*-оксазолиновой соли) [339, 340], для синтеза изомеров аминонуклеозида, входящего в состав пурицина. В результате метансульфонирования 6-диметиламино-9-(3'-ацетиламино-3'-дезоксид- α -D-арабинофуранозил)пурина получается димезилат, который под действием ацетата натрия превращается в α -рибофуранозильное производное, причем инверсия у атома углерода в положении 2' происходит в результате атаки 3'-ацетамидной группы и образования промежуточного оксазолина [341].

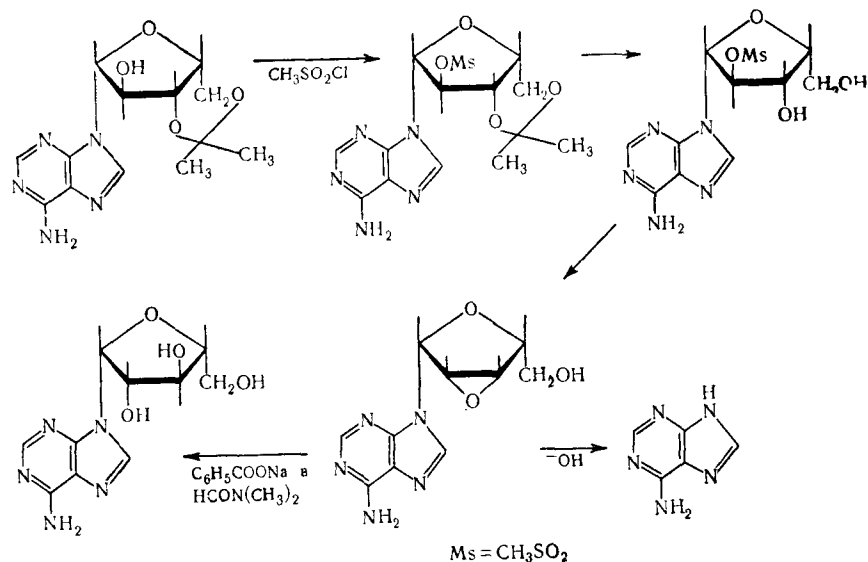


β -Арабинозильный аминонуклеозид был получен из 2-метилтио-6-диметиламино-9- β -D-ксилофуранозилпурина [342]. Метансульфонирование 3',5'-изопропилиденового производного с последующим снятием изопропилиденовой группы приводит к 2'-О-метансульфонилнуклеозиду (ксилофуранозильной природы), который под действием метилата натрия превращается в 2',3'-ангидро-D-ликсозильное производное. После раскрытия цикла при действии аммиака в метаноле с последующим удалением тиогруппы получается 6-диметиламино-9-(3'-амино-3'-дезоксид- β -D-арабинофуранозил)-пурин.

Подобные методы использовались для синтеза 9- β -D-арабинофуранозиладенина [343]. (Более прямой путь, исходя из галогенарабинозы и металлического производного пурина, приводит к α -аномеру.) Метансульфонирование 9-(3',5'-О-изопропилиден- β -D-ксилофуранозил)аденина с последующим снятием изопропилиденовой



группы дает 2'-О-метансульфонилнуклеозид, из которого при действии основания получается 9-(2',3'-ангидро- β -D-ликсозифуранозил)аденин. Однако при проведении обычного щелочного гидролиза происходит разрыв гликозильной связи и освобождается аденин. Ангидронуклеозид устойчив к горячей уксусной кислоте, но при действии на него сильного нуклеофильного реагента (бензоата натрия во влажном диметилформамиде) получается с хорошим выходом



дом 9-β-D-арабинофуранозиладенин и только в виде следов образуется ксилофуранозильное производное.

Эти последние примеры демонстрируют использование эпоксидов для изменения конфигурации сахара, входящего в нуклеозид, от ксилозы до арабинозы. Они также показывают, что при нормальном раскрытии кольца нуклеофильная атака направлена по положению C_3 сахара, а не по положению C_2 . На основании этого описанные пути превращений могут иметь значительную ценность для синтеза 3'-дезоксинуклеозидов, но не природных 2'-дезоксинуклеозидов [344]. Однако для синтеза 2'-дезоксиаденозина с большой изобретательностью были разработаны родственные методы, основанные на миграции этилтиогруппы от C_3 к C_2 и избирательности нуклеофильной атаки 2',3'-эписульфонию нуклеозида [345]. Так, хлормеркурпроизводное 6-бензоиламинопурина конденсировали с 2-О-ацетил-5-О-метоксикарбонил-3-О-тозил-β-D-ксилофуранозилхлоридом и полученный продукт обрабатывали метилатом натрия для удаления трех ацильных групп, при этом образовывался 2',3'-эпоксид. Более удобно это промежуточное 2',3'-ангидрорифофуранозильное производное получать из 3',5'-изопропилиденксилофуранозиладенина [346]. Ход реакции включает бензоилирование, удаление изопропилиденовой группы, тритилирование и затем метансульфонилирование с образованием N,N-дibenzoил-9-(2'-О-бензоил-3'-О-метансульфонил-5'-О-третил-β-D-ксилофуранозил)аденина, из которого удаляют третильную группу и затем, действуя метилатом

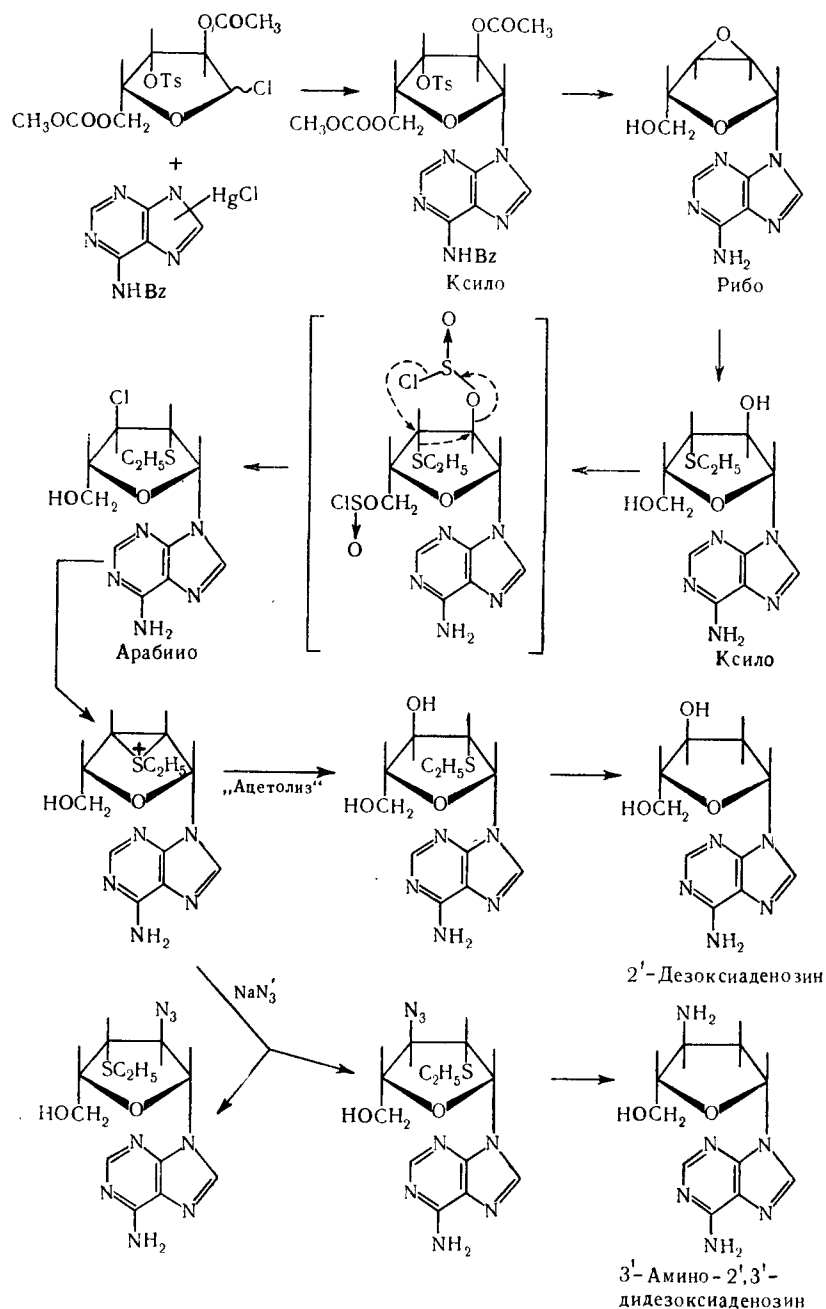
натрия, превращают этот продукт в незащищенный эпоксид. Полученный 6-амино-9-(2',3'-ангидро-β-D-рибофуранозил)пурин при действии этилмеркаптида натрия превращался в 6-амино-9-(3'-дезоксис-3'-этилтио-β-D-ксилофуранозил)пурин, который, реагируя с тионилхлоридом и затем с бикарбонатом натрия, давал 6-амино-9-(3'-хлор-2',3'-дидезокси-2'-этилтио-β-D-арабинофуранозил)пурин.

В результате «ацетолита» этого хлорнуклеозида ацетатом натрия в 95%-ном водном растворе метилцеллозольва был получен 6-амино-9-(2'-дезоксис-2'-этилтио-β-D-арабинофуранозил)пурин наряду с небольшим количеством изомерного 3'-этилтиоксилофуранозильного производного. После удаления из 2'-этилтиопроизводного тиогруппы над никелем Ренея был получен 2'-дезоксиаденозин, идентичный природному нуклеозиду [345]. Аналогичная обработка 3'-этилтио-3'-дезоксис-9-β-D-ксилофуранозиладенина приводила к 3'-дезоксиаденозину [347].

Этот метод (с образованием 2,3-эписульфонию иона) использовался также для синтеза 3-амино-2,3-дидезокси-β-D-рибофуранозильных производных [348], и в частности, для синтеза 3'-амино-2',3'-дидезоксиаденозина [347]. При действии азидата натрия на 3'-хлор-2',3'-дидезокси-2'-этилтио-9-β-D-арабинофуранозиладенин получалась смесь 2'-азидо-3'-этилтио- и 3'-азидо-2'-этилтионуклеозидов (в отношении 1 : 4). В результате разделения этих двух изомеров с последующим одновременным восстановлением и удалением тиогруппы в каждом изомере были получены 2'-амино- и 3'-амино-2',3'-дидезоксиаденозины. Структура каждого из них была установлена путем сравнения их спектров ядерного магнитного резонанса со спектрами 2'- и 3'-дезоксиаденозинов (см. схему на стр. 106).

В другом случае при синтезе 3'-дезоксиаденозина оказалось возможным осуществить прямое замещение вторичной сульфонилокси-группы [349]. В результате реакции 5'-О-ацетиладенозина с *n*-нитробензолсульфонилхлоридом с последующим удалением ацетильной группы была получена смесь 2'- и 3'-О-*n*-нитробензолсульфонил-аденозина. Их разделяли дробной кристаллизацией, причем 2'-эфир оказался плохо растворимым в изопропиловом спирте. Далее, в результате реакции 3'-О-*n*-нитробензолсульфонил-аденозина с иодидом натрия в довольно жестких условиях был получен 3'-иод-3'-дезоксинуклеозид (по-видимому, с конфигурацией ксилозы), который после гидрогенолиза превращался в 3'-дезоксиаденозин. Эти превращения не удалось осуществить в случае 2'-О-*n*-нитробензолсульфонил-аденозина, вероятно, вследствие стерических препятствий.

Как и в случае изменения структуры сахара, модификация заместителей в пуриновом или пиримидиновом основании тесно связана

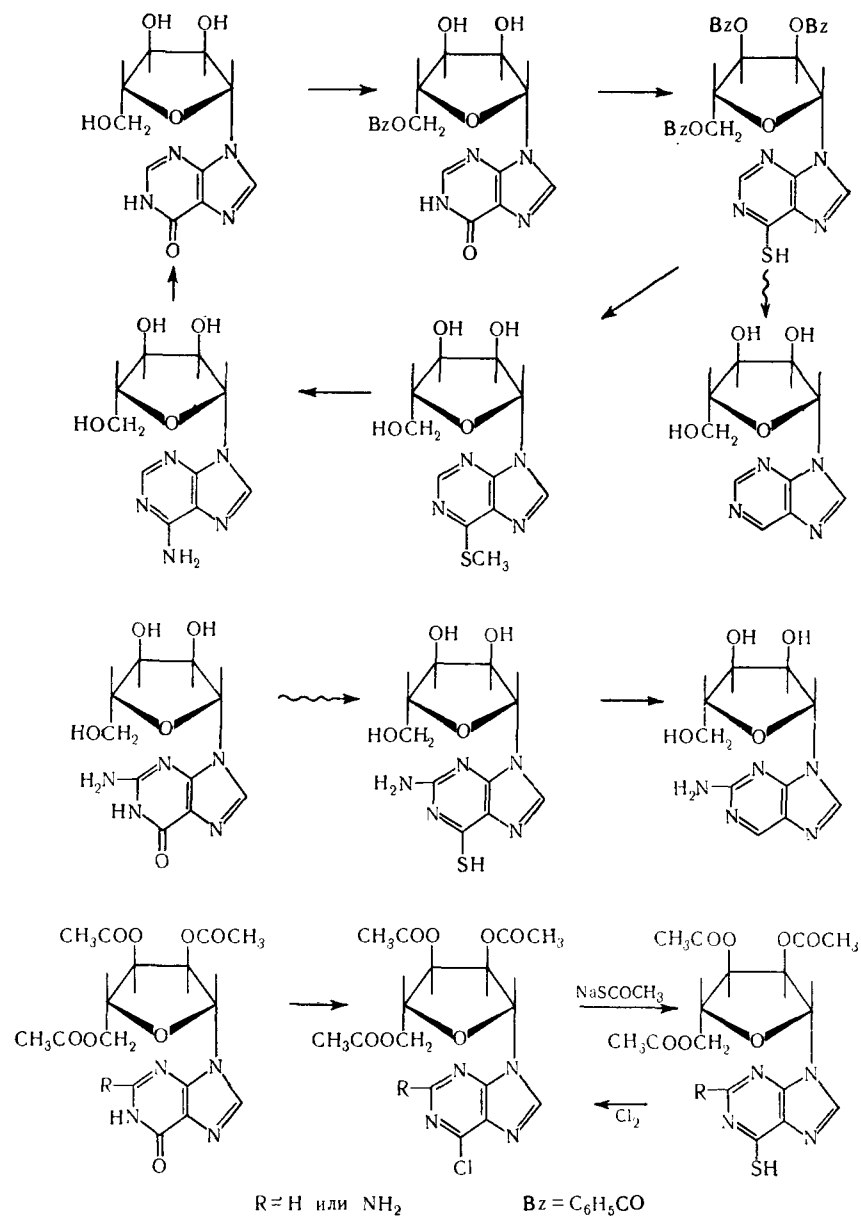


с описанными синтетическими приемами, и в частности с ртутным методом. В настоящем разделе, однако, будут обсуждаться химические методы изменения структуры основания только природных нуклеозидов.

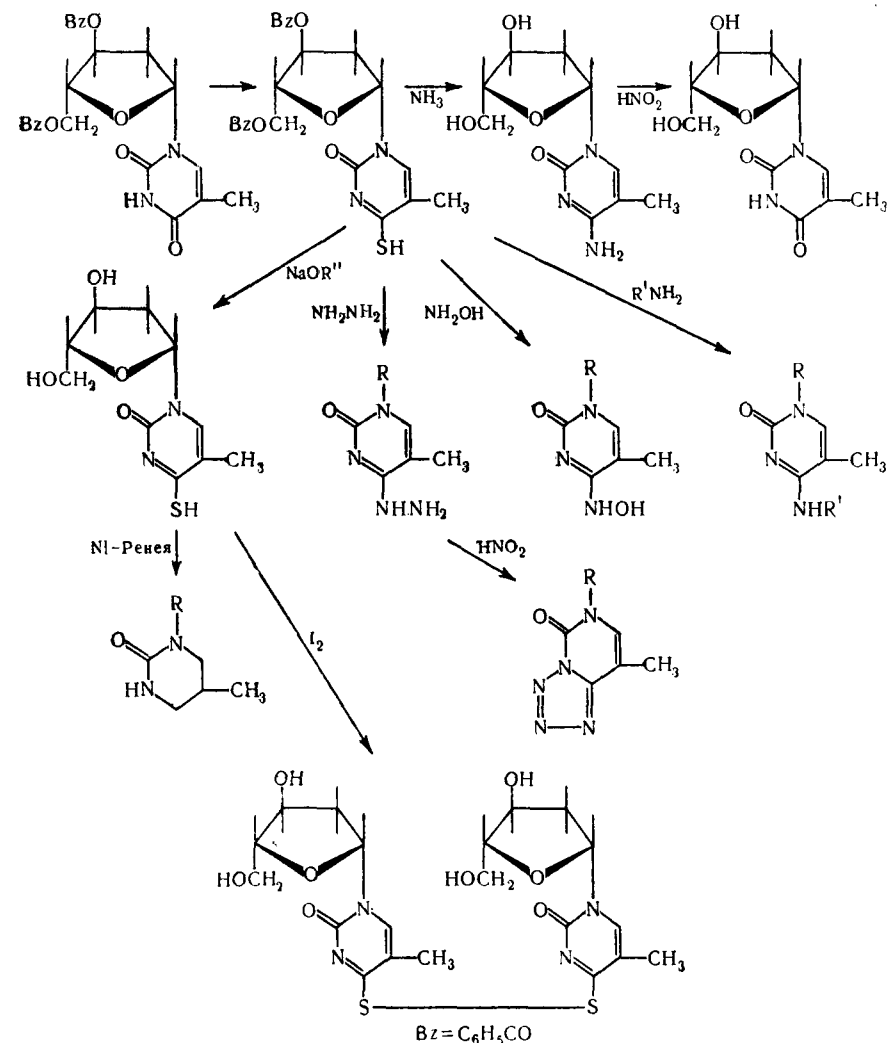
Прямое превращение инозина и гуанозина соответственно в тиоинозин (9- β -D-рибофуранозил-6-меркаптопурин) и в тиогуанозин (9- β -D-рибофуранозил-2-амино-6-меркаптопурин) введением тиогрупп, аналогичное тому, как в случае пуринов и пиримидинов, представляет собой простой путь получения веществ, которые могут найти применение в качестве противоопухолевых агентов и антагонистов роста бактерий [350]. При обработке 2',3',5'-три-О-бензоилинозина пятисернистым фосфором в пиридине получается 6-меркаптопроизводное, которое после снятия бензоильных групп превращается в тиоинозин. При восстановлении тиоинозина образуется небуларин, в то время как действие на него иодистого метила приводит к 6-метилмеркаптопроизводному, из которого в результате обработки спиртовым раствором аммиака получается аденозин. Таким же образом после превращения гуанозина в тиогуанозин и последующего удаления тиогруппы получается 2-амино-9- β -D-рибофуранозилпурин [350]. Меченый тиоинозин легко образуется в результате обменной реакции, протекающей при кипячении нуклеозида с элементарной серой S^{35} в пиридине [351].

Хлорирование 2',3',5'-три-О-ацетилюанозина и 2',3',5'-три-О-ацетилгуанозина приводит к соответствующим 6-хлорзамещенным, из которых после реакции с тиацетатом натрия и снятия ацетильных групп можно получить 6-тиосоединение [352]. Действие хлора при низких температурах легко вызывает обратное превращение 6-тио- и 6-мети.тиопуриннуклеозидов в соответствующие 6-хлорпроизводные [353].

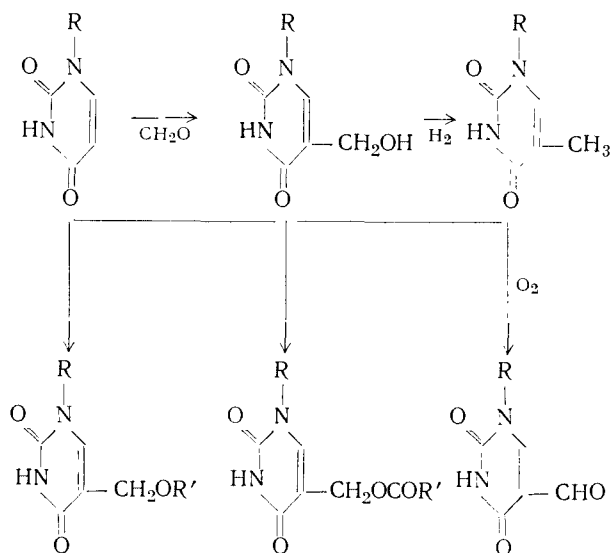
В результате введения тиогрупп в рибо- и дезоксирибопиримидиновые нуклеозиды образуются реакционноспособные промежуточные соединения, из которых получают не только основные природные нуклеозиды, но также различные 6-замещенные аналоги [354]. Так, например, из 3',5'-ди-О-бензоилтимидина было получено 6-тиосоединение, которое под действием спиртового раствора аммиака превращается в 5-метил-2'-дезокситидин. Таким же образом уридин и 3- β -D-рибофуранозилтимин были превращены в цитидин и 5-метилцитидин соответственно; аналогично из 5-фторуридина и 5-фтор-2'-дезоксйуридина были получены соответствующие гликозил-5-фторцитозины [355]. Подобно этому 4-азацитидин образуется при введении в три-О-бензоил-4-азауридин тиогруппы с последующим аминированием и дебензоилированием [356, 357]. При обработке ацилированных 6-тионуклеозидов (включая 2'-дезоксипроизводные) соответствующими реагентами образуются 6-алкиламино-, 6-гидразино-, 6-гидроксиламино- и другие аналоги [354].



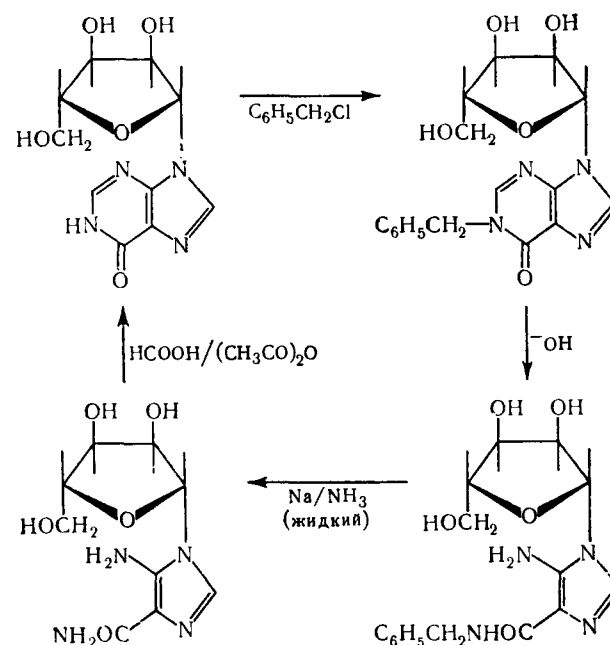
Если удаление тиогруппы в 6-тиотимидине и 6-тиоуридине проводят над активированным никелем Ренея, то происходит полное гидрирование гетероциклического ядра с образованием 2-оксогексагидропиримидиновых нуклеозидов. Такое легко протекающее глубокое восстановление является характерным для 6-тиоурацилов и 2-оксипиримидинов и не характерно для 2-тиоурацила и 6-оксипиримидинов [358].



Важной реакцией в метаболизме нуклеиновых кислот является присоединение формальдегида к пиримидиновым нуклеотидам, в результате которой образуются 5-оксиметильные и 5-метильные производные. Реакция урацилнуклеозидов с формальдегидом, а также с другими электрофильными реагентами протекает избирательно по атому углерода, находящемуся в положении 5 пиримидинового кольца. В результате обработки уридина или 2'-дезоксидеоксиуридина формальдегидом в присутствии соляной кислоты образуются 5-оксиметильные производные, которые после гидрирования превращаются в 3-β-D-рибофуранозилтимин (5-метилуридин) или тимидин соответственно [359]. Легко протекает конденсация 5-оксиметилнуклеозидов с кислотами и спиртами, а в результате каталитического окисления образуются 5-формильные производные.



Аналогичные приемы использовались для аминометилирования и хлорметилирования урацила; вероятно, они могут быть распространены на пиримидиновые нуклеозиды и дезоксинуклеозиды. Так, например, в результате реакции урацила с морфолином и формалином образуется 5-морфолинометилурацил; аналогичная обработка урацила формалином и соляной кислотой приводит к 5-хлорметилурацилу. Оба эти соединения при гидрогенолизе превращаются в тимин. Атом хлора в 5-хлорметилурациле обладает исключительной реакционной способностью, и при действии карбоната серебра это соединение превращается в 5-оксиметилурацил [360].



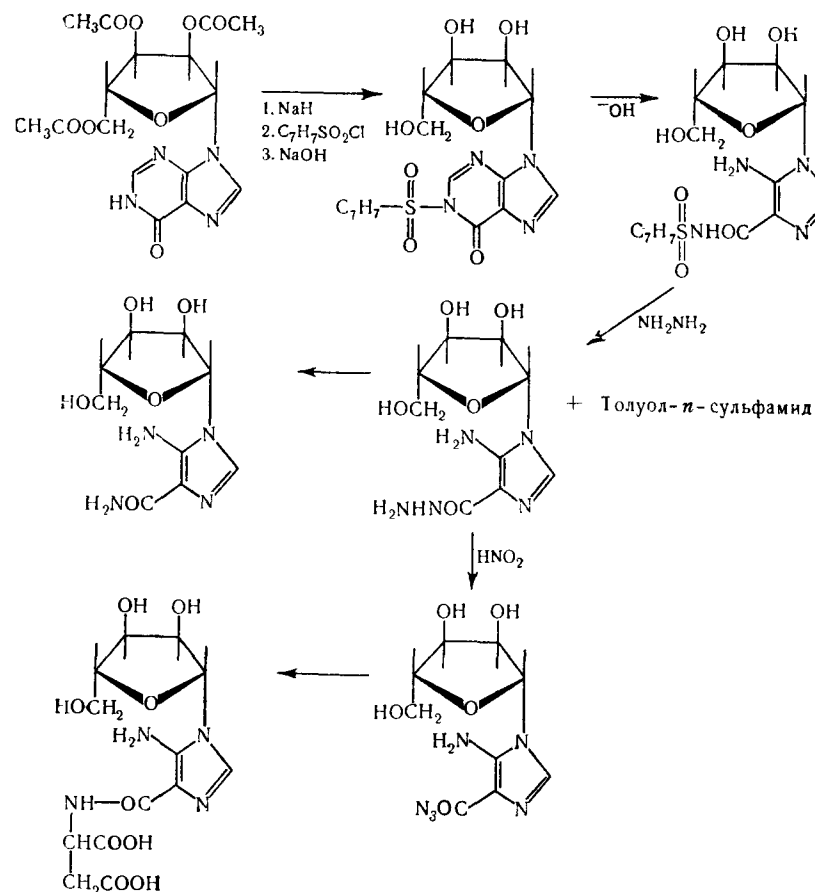
Существует другой метод превращения дезоксиуридина в тимидин. Действуя на 5-бром-2'-дезоксидеоксиуридин бутиллитием, получали 5-литиевое производное, которое при реакции с иодистым метилом давало тимидин. Общий выход составлял около 10% [361]. Этот тип реакции был также использован для синтеза псевдоуридина.

Выше (стр. 31) было описано превращение пиримидиновых циклонуклеозидов в O²-алкил- и 2-аминопроизводные.

Описан синтез пуриновых нуклеозидов через рибозилимидазолы; но возможен и обратный путь: получение 5-амино-1-β-D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамида из легко доступного рибонуклеозидов. В результате введения бензильной группы в инозин получается N¹-бензилинозин, при щелочном гидролизе которого легко удаляется C₂ и образуется 5-амино-1-β-D-рибофуранозилимидазол-4-N-бензилкарбоксамида. Удаление бензильной группы достигается действием натрия в жидком аммиаке [362].

Рибозил-5-аминоимидазол-4-карбоксамида и его производные удобнее получать из N¹-тозилинозина [363]. При действии гидрида натрия на 2',3',5'-три-O-ацетилинозин получается натриевое производное, которое, реагируя с тозилхлоридом, превращается в N¹-тозилнуклеотид. В результате щелочного гидролиза образуется 1-β-D-рибозил-5-аминоимидазол-4-(N-тозил)карбоксамида, из кото

рого после обработки гидразином получается карбоксигидразид. Последующий гидронолиз 1-рибозил-5-аминоимдазол-4-карбоксигидразида дает карбоксамидное производное [363]. При обработке 1-рибозил-5-аминоимдазол-4-карбоксигидразида одним эквивалентом азотистой кислоты протекает избирательная реакция по гидразидной группе и образуется азид. Последующая реакция с L-аспарагиновой кислотой приводит к 1-β-D-рибозил-5-аминоимдазол-4-карбонил-L-аспарагиновой кислоте [364].



Родственный этому метод использовался для синтеза 1-β-D-рибофуранозил-5-аминоимдазол-4-карбоксамид-5'-фосфата. В результате алкилирования по атому азота, находящемуся в положении 1 в 2',3'-изопропилиденинозин-5'-ди-(*n*-нитрофенил)фосфате, под дей-

ствием монохлордиметилового эфира с последующим раскрытием пиримидинового кольца под действием щелочи (в этих условиях протекает также побочный гидролиз метоксиметильной группы) образуется промежуточное соединение, которое после снятия всех защитных групп превращается в свободный нуклеотид [364].

Практическое значение описанных в этом разделе взаимопревращений можно оценить, если представить, что синтез, например, уридина представляет собой первую стадию синтеза 2'-дезоксидиридина, цитидина, 2'-дезоксидитидина, 5-метилуридина, тимидина, 5-метилцитидина, 5-метилдезоксидитидина, а также 5-оксиметилпроизводных. Эти реакции наряду с реакцией дезаминирования основных нуклеозидов и методом синтеза нуклеозидов (например, аденозина и гуанозина) вследствие общего для них промежуточного соединения убедительно подтверждают принятое для природных нуклеозидов строение.

Литература

1. Levene P. A., Jacobs W. A., Chem. Ber., **42**, 2475 (1909).
2. Levene P. A., Jacobs W. A., Chem. Ber., **43**, 3150 (1910).
3. Brederick H., Martini A., Richter F., Chem. Ber., **74**, 694 (1941).
4. Allen F. W., Bacher J. E., J. Biol. Chem., **188**, 59 (1951).
5. Hayes D. H., J. Chem. Soc., **1960**, 1184.
6. Elmore D. T., J. Chem. Soc., **1950**, 2084.
7. Schindler O., Helv. Chim. Acta, **32**, 979 (1949).
8. Andersen W., Dekker C. A., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 2721.
9. Dunn D. B., Biochim. et Biophys. Acta, **34**, 286 (1959).
10. Smith J. D., Dunn D. B., Biochim. et Biophys. Acta, **31**, 573 (1959).
11. Biswas B. B., Myers J., Nature, **186**, 238 (1960).
12. Wyatt G. R., Cohen S. S., Biochem. J., **55**, 774 (1953).
13. Dekker C. A., Elmore D. T., J. Chem. Soc., **1951**, 2864.
14. Wyatt G. R., Biochem. J., **48**, 581, 584 (1951).
15. Dunn D. B., Smith J. D., Biochem. J., **68**, 627 (1958).
16. Dekker C. A., Todd A. R., Nature, **166**, 557 (1950).
17. Levene P. A., London E. S., J. Biol. Chem., **83**, 793 (1929).
18. Levene P. A., Jacobs W. A., Chem. Ber., **44**, 746 (1911).
19. Levene P. A., La Forge F. B., Chem. Ber., **45**, 608 (1912).
20. Barker G. R., Farrar K. R., Gulland J. M., J. Chem. Soc., **1947**, 21.
21. Levene P. A., Mori T., J. Biol. Chem., **83**, 803 (1929).
22. Levene P. A., Mikeska L. A., Mori T., J. Biol. Chem., **85**, 785 (1930).
23. Kent P. W., Nature, **166**, 442 (1950).
24. Vischer E., Zamenhof S., Chargaff E., J. Biol. Chem., **177**, 429 (1949).
25. Burke D. C., Chem. and Ind., **1954**, 1393.
26. Laland S. G., Roth E., Acta Chem. Scand., **10**, 1058 (1956).
27. Haavaldsen L., Laland S. G., McKee J. M., Roth E., Biochim. et Biophys. Acta, **33**, 201 (1959).
28. Walker I. G., Butler G. C., Canadian J. Chem., **34**, 1168 (1956).

29. Levene P. A., J. Biol. Chem., **55**, 437 (1923).
30. Gulland J. M., Holiday E. R., J. Chem. Soc., **1936**, 765.
31. Gulland J. M., Story L. F., J. Chem. Soc., **259**, 692 (1938).
32. Gulland J. M., Holiday E. R., Macrae T. F., J. Chem. Soc., **1934**, 1639.
33. Lythgoe B., Smith H., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1947**, 355.
34. Levene P. A., J. Biol. Chem., **63**, 653 (1925).
35. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **104**, 385 (1934).
36. Brederick H., Müller G., Berger E., Chem. Ber., **73**, 1058 (1940).
37. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **94**, 809 (1932); **97**, 491 (1932); **101**, 529 (1933).
38. Levene P. A., Stillier E. T., J. Biol. Chem., **102**, 187 (1933).
39. Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1944**, 592.
40. Brown D. M., Lythgoe B., J. Chem. Soc., **1940**, 1990.
41. Levene P. A., Tipson R. S., Z. physiol. Chem., **234**, V (1935).
42. Makino K., Biochem. Z., **282**, 263 (1935).
43. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1946**, 833.
44. Clark V. M., Todd A. R., Zussman J., J. Chem. Soc., **1951**, 2952.
45. Furberg S., Acta Chem. Scand., **4**, 751 (1950).
46. Miles H. T., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 247 (1956); **27**, 46 (1958).
47. Angell C. L., J. Chem. Soc., **1951**, 504.
48. Littlefield J. W., Dunn D. B., Biochem. J., **70**, 642 (1958).
49. Smith J. D., Dunn D. B., Biochem. J., **72**, 294 (1959).
50. Kemp J. W., Allen F. W., Biochim. et Biophys. Acta, **28**, 51 (1958).
51. Amos H., Korn M., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 444 (1958).
52. Davis F. F., Carlucci A. F., Rouben I. F., J. Biol. Chem., **234**, 1525 (1959).
53. Adler M., Weissmann B., Gutman A. B., J. Biol. Chem., **230**, 717 (1958).
54. Cohn W. E., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 569 (1959).
55. Cohn W. E., J. Biol. Chem., **235**, 1488 (1960).
56. Yu C., Allen F. W., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 393 (1959).
57. Scannell J. P., Crestfield A. M., Allen F. W., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 406 (1959).
58. Lis A. W., Allen F. W., Biochim. et Biophys. Acta, **49**, 190 (1961).
59. Shapiro R., Chambers R. W., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3920 (1961).
60. Michelson A. M., Cohn W. E., J. Biochem., **1**, 490 (1962).
61. Mudd S. H., Jamieson G. A., Cantoni G. I., Biochim. et Biophys. Acta, **38**, 164 (1960).
62. Andersen W., Hayes D. H., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1954**, 1882.
63. Baker B. R., Joseph J. P., J. Am. Chem. Soc., **77**, 15 (1955).
64. Chambers R. W., Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3747 (1957).
65. Walwick E. R., Roberts W. K., Dekker C. A., Proc. Chem. Soc., **1959**, 84.
66. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 816.
67. Brown D. M., Todd A. R., Varadarajan S., J. Chem. Soc., **1957**, 868.
68. Brown D. M., Todd A. R., Varadarajan S., J. Chem. Soc., **1956**, 2388.
69. Fox J. J., Yung N. C., Bendich A., J. Am. Chem. Soc., **79**, 2775 (1957).

70. Fox J. J., Codington J. F., Yung N. C., Kaplan L., Lampen J. O., J. Am. Chem. Soc., **80**, 5155 (1958).
71. Shaw G., Warren R. N., J. Chem. Soc., **1959**, 50.
72. Letters R., Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1961**, 1410.
73. Yung N. C., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3060 (1961).
74. Neilson A. H., Todd A. R., неопубликованные данные.
75. Michelson A. M., неопубликованные данные.
76. Brown D. M., Parihar D. B., Todd A. R., Varadarajan S., J. Chem. Soc., **1958**, 3028.
77. Hayes D. H., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 808.
78. Brown D. M., Fasman G. D., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1954**, 1448.
79. Michelson A. M., Tetrahedron, **2**, 333 (1948).
80. Michelson A. M., Szabo L., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1956**, 1546.
81. Wieland T., Jaenicke F., Merz H., Ossorio M., Ann., **613**, 95 (1958).
82. Wieland T., Merz H., Pfeleiderer G., Chem. Ber., **93**, 1816 (1960).
83. Zachau H. G., Chem. Ber., **93**, 1822 (1960).
84. Zachau H. G., Karau W., Chem. Ber., **93**, 1830 (1960).
85. Brederick H., Chem. Ber., **66**, 198 (1933).
86. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **105**, 419 (1934).
87. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **121**, 131 (1937).
88. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 2476.
89. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **105**, 419 (1934).
90. Lipkin D., McElheny G. C., Nature, **167**, 238 (1951).
91. Lipkin D., Phillips B., Hunter W. H., Tetrahedron Letters, № 21, 18 (1959).
92. Hampton A., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3640 (1961).
93. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **106**, 113 (1934).
94. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 2476.
95. Baker B. R., Schaub R. E., J. Am. Chem. Soc., **77**, 5900 (1955).
96. Hampton A., Magrath D. I., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3250 (1957).
97. Andrews K. J. M., Barber W. E., J. Chem. Soc., **1958**, 2768.
98. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **105**, 419 (1934).
99. Wempfen I., Doerr I. L., Kaplan L., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **82**, 1624 (1960).
100. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1954**, 34.
101. Khorana H. G., Turner A. F., Vizsolyi J. P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 686 (1961).
102. Gilham P. T., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6212 (1958).
103. Shapiro H. S., Chargaaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 596 (1957); **39**, 62 (1960).
104. Kenner G. W., Ciba Foundation Symposium, Chemistry and Biology of Purines, **1957**, 312.
105. Dekker C. A., Ann. Revs. Biochem., **29**, 463 (1960).
106. Fukuhashi T. K., Visser D. W., J. Am. Chem. Soc., **77**, 2393 (1955).
107. Frisch D. M., Visser D. W., J. Am. Chem. Soc., **81**, 1756 (1959).
108. Prusoff W. H., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 295 (1959).
109. Michelson A. M., Dondon J., Grunberg-Monago M., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 529 (1962).
110. Roberts N., Visser D. W., J. Am. Chem. Soc., **74**, 668 (1952).
111. Beltz R. E., Visser D. W., J. Biol. Chem., **226**, 1035 (1957).
112. Ueda T., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **8**, 455 (1960).

113. Levene P. A., La Forge F. B., Chem. Ber., **45**, 608 (1912).
114. Cohn W. E., Doherty D. G., J. Am. Chem. Soc., **78**, 2863 (1956).
115. Green M., Cohen S. S., J. Biol. Chem., **228**, 601 (1957).
116. Cline R. E., Fink R. M., Fink K., J. Am. Chem. Soc., **81**, 2521 (1959).
117. Cohen S. S., Green M., Barner H. D., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 210 (1956).
118. Levene P. A., La Forge F. B., Chem. Ber., **45**, 615 (1912).
119. Cohn W. E., Biochem. J., **64**, 28P (1956).
120. Wang S. Y., Nature, **180**, 91 (1957).
121. Moore A. M., Anderson S. M., Canadian J. Chem., **37**, 590 (1959).
122. Bannister B., Kagan F., J. Am. Chem. Soc., **82**, 3363 (1960).
123. Moore A. M., Thompson C. H., Science, **122**, 594 (1955); Canadian J. Chem., **35**, 163 (1957).
124. Wang S. Y., Apicella M., Stone B. R., J. Am. Chem. Soc., **78**, 4180 (1956).
125. Wang S. Y., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6196 (1958).
126. Scholes G., Weiss J., Wheeler C. M., Nature, **178**, 157 (1956).
127. Ekert B., Monier R., Nature, **184**, 58 (1959).
128. Scholes G., Weiss J., Nature, **185**, 305 (1960).
129. Levene P. A., Bass L. W., J. Biol. Chem., **71**, 167 (1926).
130. Miles H. T., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 247 (1956); J. Am. Chem. Soc., **79**, 2565 (1957).
131. Szer W., Shugar D., Biokhimiya, **26**, 840 (1961).
132. Шабарова З. А., Соколова Н. И., Бойкова Л. А., Прокофьев М. А., ЖОХ, **29**, 2917 (1959).
133. Шабарова З. А., Прокофьев М. А., ДАН СССР, **109**, 340 (1956).
134. Шабарова З. А., Соколова Н. И., Прокофьев М. А., ЖОХ, **27**, 2891 (1957); **29**, 539 (1959).
135. Прокофьев М. А., Шабарова З. А., Соколова Н. И., Вестник МГУ, серия мат. мех., астр. физ., хим., **12**, 215 (1957).
136. Huber G., Angew. Chem., **69**, 642 (1957).
137. Gordon M. P., Weliky V. S., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3245 (1957).
138. Magrath D. I., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3252 (1957).
139. Brown G. B., Gordon M. P., Magrath D. I., Hampton A., Ciba Foundation Symposium, Chemistry and Biology of Purines, **1957**, 192.
140. Порай-Кошнц Б. А., Муравич К. Л., ЖОХ, **26**, 2487 (1956).
141. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1961**, 3923.
142. Hems G., Nature, **181**, 1721 (1958).
143. Hems G., Nature, **185**, 525 (1960).
144. Shaw E., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3899 (1958).
145. Shaw E., J. Am. Chem. Soc., **81**, 6021 (1959).
146. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1960**, 539.
147. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 450 (1957).
148. Lawley P. D., Wallick C. A., Chem. and Ind., **1957**, 633.
149. Reiner B., Zamenhof S., J. Biol. Chem., **228**, 475 (1957).
150. Pullman B., J. Chem. Soc., **1959**, 1621.
151. Windmueller H. G., Kaplan N. O., J. Biol. Chem., **236**, 2716 (1961).
152. Stevens M. A., Magrath D. I., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **80**, 2755 (1958).
153. Stevens M. A., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **81**, 1734 (1959).

154. Klenow H., Frederiksen S., Biochim. et Biophys. Acta, **52**, 384 (1961).
155. Stevens M. A., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **82**, 3189 (1960).
156. Khyr J. X., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., **82**, 6380 (1960).
157. Reese C. B., Schofield K., Shapiro R., Todd A. R., Proc. Chem. Soc., **1960**, 290.
158. Vizsolyi J. P., Tener G. M., Chem. and Ind., **1962**, 263.
159. Jones A. S., Williamson A. R., Chem. and Ind., **1960**, 1624.
160. Shugar D., Fox J. J., Biochim. et Biophys. Acta, **9**, 199 (1952).
161. Fox J. J., Shugar D., Biochim. et Biophys. Acta, **9**, 369 (1952).
162. Fox J. J., Praag D. V., Wempfen I., Doerr I. L., Cheong L., Knoll J. E., Eidinoff M. L., Bendich A., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **81**, 178 (1959).
163. Wierzchowski K. L., Shugar D., Biochim. et Biophys. Acta, **25**, 355 (1957).
164. Grossman L., Levine S. S., Allison W. S., J. Mol. Biol., **3**, 47 (1961).
165. Tsuboi M., Kyogoku Y., Shimanouchi T., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 1 (1962).
166. Jardetzky C. D., Jardetzky O., J. Am. Chem. Soc., **82**, 222 (1960).
167. Jardetzky C. D., J. Am. Chem. Soc., **82**, 229 (1960).
168. Jardetzky C. D., J. Am. Chem. Soc., **84**, 62 (1962).
169. Jardetzky C. D., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2919 (1961).
170. Frieden E., Alles J., J. Biol. Chem., **230**, 797 (1958).
171. Baddiley J., Buchanan J. G., Stephenson J. E., Arch. Biochem. Biophys., **83**, 54 (1959).
172. Carter C. E., J. Biol. Chem., **223**, 139 (1956).
173. Baddiley J., Buchanan J. G., Hawker F. J., Stephenson J. E., J. Chem. Soc., **1956**, 4659.
174. King M. E., Carter C. E., Biochim. et Biophys. Acta, **44**, 232 (1960).
175. Perrin D. D., J. Am. Chem. Soc., **82**, 5642 (1960).
176. Lansford E. M., Hill I. D., Shive W., J. Biol. Chem., **235**, 3551 (1960).
177. Cunningham K. G., Hutchinson S. A., Manson W., Spring F. S., J. Chem. Soc., **1951**, 2299.
178. Bentley H. R., Cunningham K. G., Spring F. S., J. Chem. Soc., **1951**, 2301.
179. Kredich N. M., Guarino A. J., J. Biol. Chem., **236**, 3300 (1961).
180. Lufgren N., Luning B., Acta Chem. Scand., **7**, 225 (1953).
181. Isono K., Suzuki S., J. Antibiotics (Japan), **13A**, 270 (1960).
182. Brown G. B., Weliky V. S., J. Biol. Chem., **204**, 1019 (1953).
183. Waller C. W., Patrick J. B., Fulmor W., Meyer W. E., J. Am. Chem. Soc., **79**, 1011 (1957).
184. Flynn E. H., Hinman J. W., Caron E. L., Woolf D. O., J. Am. Chem. Soc., **75**, 5867 (1953).
185. Stevens C. L., Gasser R. J., Mukherjee T. K., Haskell T. H., J. Am. Chem. Soc., **78**, 6212 (1956).
186. Yünsten H., J. Antibiotics (Japan), **11A**, 77, 79, 233 (1958).
187. Yünsten H., J. Antibiotics (Japan), **11A**, 244 (1958).
188. Schroeder W., Hoeksema H., J. Am. Chem. Soc., **81**, 1767 (1959).
189. Slechta L., Biochem. Biophys. Research Commun., **3**, 596 (1960).
190. Garrett E. R., J. Am. Chem. Soc., **82**, 827 (1960).

191. Nishimura H., Katagiori K., Sato K., Mayama M., Shimooka N., *J. Antibiotics (Japan)*, **9A**, 60 (1956).
192. Ohkuma K., *J. Antibiotics (Japan)*, **13A**, 361 (1960).
193. Waller C. W., Fryth P. W., Huttings B. L., Williams J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2025 (1953).
194. Baker B. R., Schaub R. E., Williams J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 7 (1955); Baker B. R., Schaub R. E., Joseph J. P., Williams J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 12 (1955).
195. Cherbuliez E., Bernhard K., *Helv. Chim. Acta*, **15**, 464 (1932).
196. Davoll J., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3174 (1951).
197. Davis A. R., Hewton E. B., Benedict S. R., *J. Biol. Chem.*, **54**, 595 (1922).
198. Forrest H. S., Hatfield D. L., Lagowski J. M., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 963.
199. Heller J., Jezewska M. M., *Acta Biochim. Polon.*, **7**, 469 (1960).
200. Falconer R., Gulland J. M., *J. Chem. Soc.*, **1939**, 1369.
201. Michelson A. M., Drell W., Mitchell H. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **37**, 396 (1951).
202. Fox J. J., Yung N., Wempen I., *Biochim. et Biophys. Acta*, **23**, 295 (1957).
203. Ritthausen H., *Chem. Ber.*, **29**, 894, 2108 (1896).
204. Bendich A., Clements G. C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **12**, 462 (1953).
205. Bergmann W., Feeney R. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2809 (1950).
206. Bergmann W., Stempien M. F., *J. Org. Chem.*, **22**, 1575 (1957).
207. Hampton A., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 503 (1957).
208. Ballio A., Delfini C., Russi S., *Nature*, **186**, 968 (1960).
209. Al-Khalidi U., Greenberg G. R., *J. Biol. Chem.*, **236**, 189 (1961).
210. Al-Khalidi U., Greenberg G. R., *J. Biol. Chem.*, **236**, 192 (1961).
211. Lenhert P. G., Hodgkin D. C., *Nature*, **192**, 937 (1961).
212. Hogenkamp H. P. C., Barker H. A., *J. Biol. Chem.*, **236**, 3097 (1961).
213. Johnson A. W., Shaw N., *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 447.
214. Mandel J. A., Dunham E. K., *J. Biol. Chem.*, **11**, 85 (1912).
215. Levene P. A., Sobotka H., *J. Biol. Chem.*, **65**, 551 (1925).
216. Wendt G., *Z. physiol. Chem.*, **272**, 152 (1942).
217. Satoh K., Makino K., *Nature*, **165**, 769 (1950).
218. Weyand F., Trauth O., Löwenfeld R., *Chem. Ber.*, **83**, 563 (1950).
219. Falconer R., Gulland J. M., *J. Chem. Soc.*, **1937**, 1912.
220. Baddiley J., *J. Chem. Soc.*, **1951**, 1348.
221. Satch K., Makino K., *Nature*, **167**, 238 (1951).
222. Kuhn R., Henkel K., *Z. physiol. Chem.*, **269**, 41 (1941).
223. Baddiley J., Jamieson G. A., *J. Chem. Soc.*, **1954**, 4280.
224. Kanazawa T., *Nippon Kagaku Zasshi*, **81**, 516 (1960).
225. Lavine T. F., Floyd N. F., Cammaroti M. S., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **1**, 156 (1959).
226. Remy C. N., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1485 (1959).
227. Tabor H., Rosenthal S. M., Tabor C. W., *J. Biol. Chem.*, **233**, 907 (1958).
228. Cantoni G. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2942 (1952); *J. Biol. Chem.*, **204**, 403 (1953).
229. Baddiley J., Cantoni G. L., Jamieson G. A., *J. Chem. Soc.*, **1953**, 2662.

230. Baddiley J., Jamieson G. A., *J. Chem. Soc.*, **1955**, 1085.
231. Shunk C. H., Richter J. W., *nar. CSHA 2969353*, Jan. 24th, 1961 [C.A., **55**, 14490 (1961)].
232. de la Haba G., Jamieson G. A., Mudd S. H., Richards H. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3975 (1959).
233. Parks L. W., Schlenk F., *J. Biol. Chem.*, **230**, 295 (1958).
234. Frank W., Wiczotkowski J., Hughes N. A., Baddiley J., *Proc. Chem. Soc.*, **1961**, 449; *J. Chem. Soc.*, **1962**, 1999.
235. Mudd S. H., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1784 (1959).
236. Cantoni G. L., Durell J., *J. Biol. Chem.*, **225**, 1033 (1957).
237. Miller C. O., Skoog F., von Saltz M. H., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1392 (1955).
238. Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., von Saltz M. H., Strong F. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2662 (1955).
239. Baizer M. M., Clark J. R., Dub M., Loter A., *J. Org. Chem.*, **21**, 1276 (1956).
240. Hull R., *J. Chem. Soc.*, **1958**, 2746.
241. Whitehead C. W., Traverso J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3971 (1960).
242. Kissman H. M., Weiss M. J., *J. Org. Chem.*, **21**, 1053 (1956).
243. Hampton A., Bieseke J. J., Moore A. E., Brown G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5695 (1956).
244. Fischer E., Helferich B., *Chem. Ber.*, **47**, 210 (1914).
245. Gulland J. M., Holiday E. R., Macrae T. F., *J. Chem. Soc.*, **1934**, 1639.
246. Gulland J. M., Story L. F., *J. Chem. Soc.*, **1938**, 259.
247. Fischer E., *Chem. Ber.*, **47**, 1377 (1914).
248. Levene P. A., Sobotka H., *J. Biol. Chem.*, **65**, 469 (1925).
249. Hilbert G. E., Johnson T. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 4489 (1930).
250. Hilbert G. E., Jansen E. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 60 (1936).
251. Howard G. A., Lythgoe B., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, **1947**, 1052.
252. Davoll J., Lythgoe B., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, **1967**, 1685 (1948).
253. Davoll J., Lowy B. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1650 (1951).
254. Viscontini M., Huwyler S., *Helv. Chim. Acta*, **43**, 782 (1960).
255. Reist E. J., Spencer R. R., Baker B. R., *J. Org. Chem.*, **23**, 1958 (1958).
256. Reist E. J., Goodman L., Baker B. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5775 (1958).
257. Baker B. R., Hewson K., *J. Org. Chem.*, **22**, 959 (1957).
258. Baker B. R., Hewson K., *J. Org. Chem.*, **22**, 966 (1957).
259. Reist E. J., Spencer R. R., Baker B. R., *J. Org. Chem.*, **23**, 1753 (1958).
260. Reist E. J., Spencer R. R., Baker B. R., *J. Org. Chem.*, **23**, 1757 (1958).
261. Reist E. J., Goodman L., Spencer R. R., Baker B. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3962 (1958).
262. Gordon M. P., Intrieri O. M., Brown G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5161 (1958).
263. Kissman H. M., Baker B. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5534 (1957).
264. Kissman H. M., Weiss M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5559 (1958).
265. Wolfrom M. L., McWain P., Shafizadeh F., Thompson A., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6080 (1959).

266. Wolfrom M. L., McWain P., Thompson A., J. Am. Chem. Soc., **82**, 4353 (1960).
267. Zorbach W. W., Durr G. J., Abstr. 138th Am. Chem. Soc. Meeting, 2D (1960).
268. McEvoy F. J., Weiss M. J., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., **82**, 205 (1960).
269. McEvoy F. J., Baker B. R., Weiss M. J., J. Am. Chem. Soc., **82**, 209 (1960).
270. Reist E. J., Baker B. R., J. Org. Chem., **23**, 1083 (1958); Baker B. R., Schaub R. E., Kissman H. M., J. Am. Chem. Soc., **77**, 5911 (1955).
271. Wolfrom M. L., Foster A. B., McWain P., von Bebenburg W., Thompson A., Abstr. 137th Am. Chem. Soc., Meeting, 3D (1960).
272. Davoll J., Lowy B. A., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1563 (1952).
273. Johnson J. A., Thomas H. J., J. Am. Chem. Soc., **78**, 3863 (1956).
274. Schaeffer H. J., Thomas H. J., J. Am. Chem. Soc., **80**, 4896 (1958).
275. Davoll J., Kerridge K. A., J. Chem. Soc., **1961**, 2589.
276. Davoll J., J. Chem. Soc., **1958**, 1593.
277. Montgomery J. A., Hewson K., J. Am. Chem. Soc., **79**, 4559 (1957).
278. Brown G. B., Weliky V. S., J. Org. Chem., **23**, 125 (1958).
279. Schaeffer H. J., Thomas H. J., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3738 (1958).
280. Montgomery J. A., Hewson K., J. Am. Chem. Soc., **82**, 463 (1960).
281. Blackburn G. M., Johnson A. W., J. Chem. Soc., **1960**, 4347.
282. Baker B. R., Joseph J. P., Schaub R. E., Williams J. H., J. Org. Chem., **19**, 1786 (1954). См. также Howard G. A., J. Chem. Soc., **1950**, 1045.
283. Wright R. S., Tener G. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 2004 (1958).
284. Fox J. J., Yung N., Davoll J., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **78**, 2117 (1956).
285. Kissman H. M., Weiss M. J., J. Am. Chem. Soc., **80**, 2575 (1958).
286. Duschinsky R., Plevan E., Malbica J., Heidelberger C., Abstr. 132nd Am. Chem. Soc. Meeting, 19C (1957).
287. Ikehara M., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **8**, 308 (1960).
288. Funakoshi R., Irie M., Ukita C., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **9**, 406 (1961).
289. Hall R. H., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1145 (1958).
290. Handschumacher R. E., J. Biol. Chem., **235**, 764 (1960).
291. Prystas M., Gut J., Sorm F., Chem. and Ind., **1961**, 947.
292. Pliml J., Sorm F., Chem. and Ind., **1962**, 655.
293. Blumbergs P., Stevens C. L., Abstr. 139th Am. Chem. Soc. Meeting, 30N (1961).
294. Fox J. J., Yung N., Wempen I., Doerr I. L., J. Am. Chem. Soc., **79**, 5060 (1957).
295. Fox J. J., Yung N., Praag D. V., Federation Proc., **16**, 182 (1957).
296. Fox J. J., Praag D. V., J. Org. Chem., **26**, 526 (1961).
297. Ness R. K., Fletcher H. G., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4752 (1959); **82**, 3434 (1960).
298. Hoffer M., Duschinsky R., Fox J. J., Yung N., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4112 (1959).
299. Hoffer M., Chem. Ber., **93**, 2777 (1960).

300. Fox J. J., Yung N. C., Wempen I., Hoffer M., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4066 (1961).
301. Venner H., Chem. Ber., **93**, 140 (1960).
302. Pedersen C., Fletcher H. G., J. Am. Chem. Soc., **82**, 5210 (1960).
303. Robins R. K., Lewis L. R., Abstr. 138th Am. Chem. Soc. Meeting, 16P (1960).
304. Robins R. K., Godefroi E. F., Taylor E. C., Lewis L. R., Jackson A., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2574 (1961).
305. Schramm G., Grötsch H., Pollmann W., Angew. Chem., **73**, 619 (1961).
306. Kenner G. W., Taylor C. W., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 1620, а также более ранние работы Тодда и сотрудников.
307. Ikehara M., Ohtsuka E., Kitagawa S., Yagi K., Tonomura Y., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2679 (1961).
308. Howard G. A., McLean A. C., Newbold G. T., Spring F. S., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 232.
309. Baddiley J., Buchanan J. G., Osborne G. O., J. Chem. Soc., **1958**, 1651.
310. Baddiley J., Buchanan J. G., Osborne G. O., J. Chem. Soc., **1958**, 3606.
311. Baddiley J., Buchanan J. G., Hardy F. E., Stewart J., J. Chem. Soc., **1959**, 2893.
312. Bauer H., Biochim. et Biophys. Acta, **30**, 219 (1958); J. Org. Chem., **27**, 167 (1962).
313. Baddiley J., Buchanan J. G., Hayes D. H., Smith P. A., J. Chem. Soc., **1958**, 3743.
314. Baddiley J., Buchanan J. G., Hodges R., Prescott J. F., J. Chem. Soc., **1957**, 4769.
315. Ralph R. K., Shaw G., J. Chem. Soc., **1956**, 1877.
316. Shaw G., Warrenner R. N., Maguire M. H., Ralph R. K., J. Chem. Soc., **1958**, 2294.
317. Shaw G., Warrenner R. N., Butler D. N., Ralph R. K., J. Chem. Soc., **1959**, 1648.
318. Shaw G., Wilson D. V., Proc. Chem. Soc., **1961**, 381; J. Chem. Soc., **1962**, 2937.
319. Shaw G., Wilson D. V., Proc. Chem. Soc., **1962**, 115.
320. Goodman I., Federation Proc., **15**, 264 (1956).
321. Hoffer M., nar. CHIA 2949449, Aug. 16, 1960 [C. A., **55**, 586 (1961)].
322. Davoll J., Evans D. D., J. Chem. Soc., **1960**, 5041.
323. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 816.
324. Brown D. M., Todd A. R., Varadarajan S., J. Chem. Soc., **1956**, 2388.
325. Fox J. J., Yung N., Bendich A., J. Am. Chem. Soc., **79**, 2775 (1957).
326. Yung N. C., Burchenal J. H., Fecher R., Duschinsky R., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4060 (1961).
327. Fox J. J., Codington J. F., Yung N. C., Kaplan L., Lampen J. O., J. Am. Chem. Soc., **80**, 5155 (1958).
328. Yung N. C., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3060 (1961).
329. Fecher R., Codington J. F., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **83**, 1889 (1961).
330. Codington J. F., Fecher R., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., **82**, 2794 (1960).
331. Codington J. F., Fecher R., Fox J. J., J. Org. Chem., **27**, 163 (1962).
332. Reist E. J., Osiecki J. H., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2208 (1961).

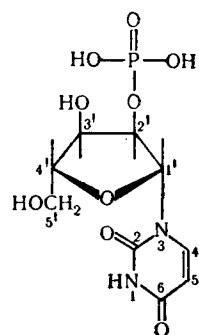
ХИМИЯ НУКЛЕОТИДОВ

333. Letters R., Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1961, 1410.
334. Brown D. M., Parihar D. B., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1958, 4242.
335. Walwick E. R., Roberts W. K., Dekker C. A., Proc. Chem. Soc., 1959, 84.
336. Brown D. M., Parihar D. B., Reese C. B., Todd A. R., J. Am. Chem. Soc., 1958, 3035.
337. Codington J. F., Doerr I., Praag D. V., Bendich A., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., 83, 5030 (1961).
338. Shaw G., Warrenner R. N., J. Chem. Soc., 1959, 50.
339. McCasland G. E., Clark R. K., Carter H. E., J. Am. Chem. Soc., 71, 637 (1949).
340. Winstein S., Goodman L., Boschan R., J. Am. Chem. Soc., 72, 2311 (1950).
341. Baker B. R., Schaub R. E., J. Am. Chem. Soc., 77, 2396 (1955).
342. Baker B. R., Schaub R. E., J. Am. Chem. Soc., 77, 5900 (1955).
343. Lee W. W., Benitez A., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., 82, 2648 (1960).
344. Davoll J., Lythgoe B., Trippett S., J. Chem. Soc., 1951, 2230.
345. Anderson C. D., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., 81, 3967 (1959).
346. Benitez A., Crews O. P., Goodman L., Baker B. R., J. Org. Chem., 25, 1946 (1960).
347. Lee W. W., Benitez A., Anderson C. D., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., 83, 1906 (1961).
348. Anderson C. D., Lee W. W., Goodman L., Baker B. R., J. Am. Chem. Soc., 83, 1900 (1961).
349. Todd A. R., Ulbricht T. L. V., J. Chem. Soc., 1960, 3275.
350. Fox J. J., Wempen I., Hampton A., Doerr I. L., J. Am. Chem. Soc., 80, 1669 (1958).
351. Moravsek J., Nejedly Z., Chem. and Ind., 1960, 530.
352. Goodman L., Federation Proc., 18, 933 (1959).
353. Robins R. K., J. Am. Chem. Soc., 82, 2654 (1960).
354. Fox J. J., Praag D. V., Wempen I., Doerr I. L., Cheong L., Knoll J. E., Eidinoff M. L., Bendich A., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 81, 178 (1959).
355. Wempen I., Duschinsky R., Kaplan L., Fox J. J., J. Am. Chem. Soc., 83, 4755 (1961).
356. Sorm F., Smrt J., Cernickij V., Experientia, 17, 64 (1961).
357. Шорм Ф., Чернецкий В. П., Гладик С., Весели Ж., Смрт Ж., ДАН СССР, 137, 1393 (1961).
358. Fox J. J., Praag D. V., J. Am. Chem. Soc., 82, 486 (1960).
359. Cline R. E. et al., J. Am. Chem. Soc., 81, 2521 (1959).
360. Burckhalter J. H., Seiwald R. J., Scarborough H. C., J. Am. Chem. Soc., 82, 991 (1960).
361. Ulbricht T. L. V., Tetrahedron, 6, 225 (1959).
362. Shaw E., J. Am. Chem. Soc., 80, 3899 (1958).
363. Shaw E., J. Am. Chem. Soc., 81, 6021 (1959).
364. Shaw E., J. Am. Chem. Soc., 83, 4770 (1961).
365. Leonard N. J., Deyrup J. A., J. Am. Chem. Soc., 84, 2148 (1962).
366. Leonard N. J., Laursen R. A., неопубликованная работа.
367. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., 1962, 1348.
368. Hogenkamp H. P. C., Ladd J. N., Barker H. A., J. Biol. Chem., 237, 1950 (1962).
369. Marmur J., Cordes S., Symposium on Informational Macromolecules, Rutgers University, Sept. 1962.

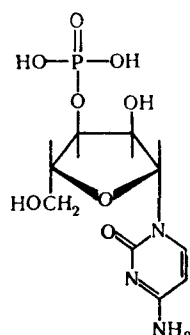
Название *нуклеотид* было введено в 1908 г. Левиным и Манделем [1] для соединений, выделенных из кислотных гидролизатов нуклеиновой кислоты зубной железы телят. Еще до недавнего времени фосфаты нуклеозидов часто характеризовали по названию сырья; так, например, для описания двух различных изомеров аденинового нуклеотида употребляли выражения «дрожжевая адениловая кислота» и «мышечная адениловая кислота». В настоящее время эта терминология утратила в какой-то мере свое значение, и если известно положение фосфорного остатка, то его обозначают обычно, как в данном примере: аденозин-2'-фосфат. Для монофосфатов природных рибонуклеозидов возможно существование трех изомеров (2'-; 3'- или 5'-фосфаты), а в ряду дезоксирибонуклеозидов возможны как 3'-фосфаты, так и 5'-фосфаты. Все они были выделены.

ВЫДЕЛЕНИЕ

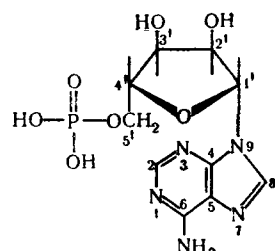
Первый нуклеотид, инозиновая кислота (по-гречески — мышечная ткань), был выделен Либихом [2] в 1847 г. из мясного экстракта (отчасти как результат полемики, поднятой Берцелиусом по поводу наличия креатина в сыром и вареном мясе). С тех пор было выделено большое число мононуклеотидов, как правило, 5'-фосфаты, хотя в яде тигровых змей и родственных видов был найден также аденозин-3'-фосфат [3]. Эти соединения выделяют прямой экстракцией тканей или организмов [4—9], в которых они обычно присутствуют в небольших количествах в качестве промежуточных соединений обмена. Однако основным источником мононуклеотидов являются их полимерные производные, нуклеиновые кислоты. При щелочном гидролизе в мягких условиях [10, 11] рибонуклеиновой кислоты образуется смесь 2'- и 3'-фосфатов нуклеозидов, которую можно легко разделить с помощью ионообменной хроматографии [12]. Для выделения аналогичных 5'-эфиров требуется применение ферментативного гидролиза, как правило, с использованием фосфодиэстеразы змеиного яда [13, 14]. Подобная ферментативная обработка дезоксирибонуклеиновой кислоты после предварительной обработки дезоксирибонуклеазой приводит к дезоксинуклеозид-5'-фосфатам [15—17]. Очищенная диэстераза змеиного яда значи-



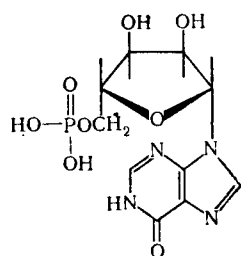
Уридин-2'-фосфат



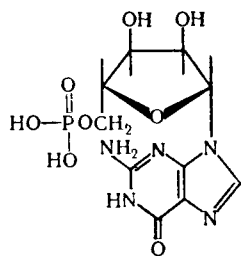
Цитидин-3'-фосфат



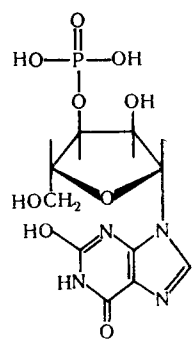
Аденозин-5'-фосфат



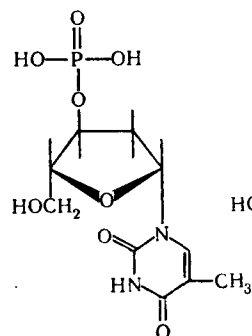
Инозин-5'-фосфат



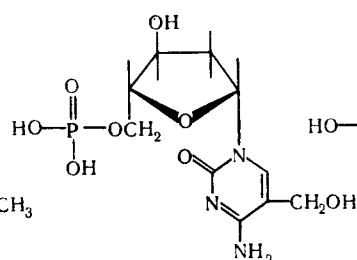
Гуанозин-5'-фосфат



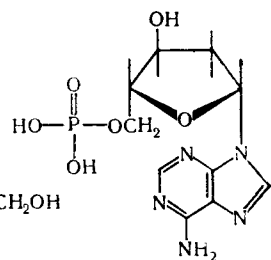
Ксантозин-3'-фосфат



Тимидин-3'-фосфат



5-Оксиметилдезоксигуанозин-5'-фосфат



Дезоксиаденозин-5'-фосфат

Нуклеотиды

тельно превосходит по своим качествам препараты сырой фосфатазы поджелудочной железы, с помощью которых были получены первые дезоксинуклеотиды в присутствии арсената, ингибирующего действия моноэстеразы [18, 19]. Недавно было показано, что при обработке дезоксирибонуклеиновой кислоты ферментом, продуцируемым *Staphylococcus aureus*, также могут быть получены дезоксинуклеозид-3'-фосфаты [20]. Дезоксирибонуклеиновая кислота относительно устойчива к действию щелочи. В результате кислотного гидролиза в мягких условиях образуются в небольших количествах 3'- и 5'-фосфаты пиримидиновых дезоксинуклеозидов наряду с 3',5'-дифосфатами пиримидиновых дезоксинуклеозидов и олигонуклеотидами [21—24]. Благодаря большой чувствительности гликозидной связи во всех 2'-дезоксипуриннуклеозидах к кислоте в кислой среде они полностью расщепляются до свободных оснований.

Так как основную структуру нуклеиновых кислот составляют 3',5'-фосфодиэфиры нуклеозидов, то ясно, что нуклеотиды, представляющие собой производные нуклеозидов, присутствующих в нуклеиновых кислотах, могут быть выделены, что, в общем, и было сделано.

СТРУКТУРА

Все нуклеотиды (за исключением псевдоуридилевой кислоты) можно прогидролизовать кислотой в соответствующих условиях до свободных оснований, а посредством химического или ферментативного дефосфорилирования можно перейти к нуклеозидам. Вследствие этого ниже будут обсуждаться только те вопросы строения нуклеотидов, которые касаются положения фосфорного остатка.

НУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФАТЫ

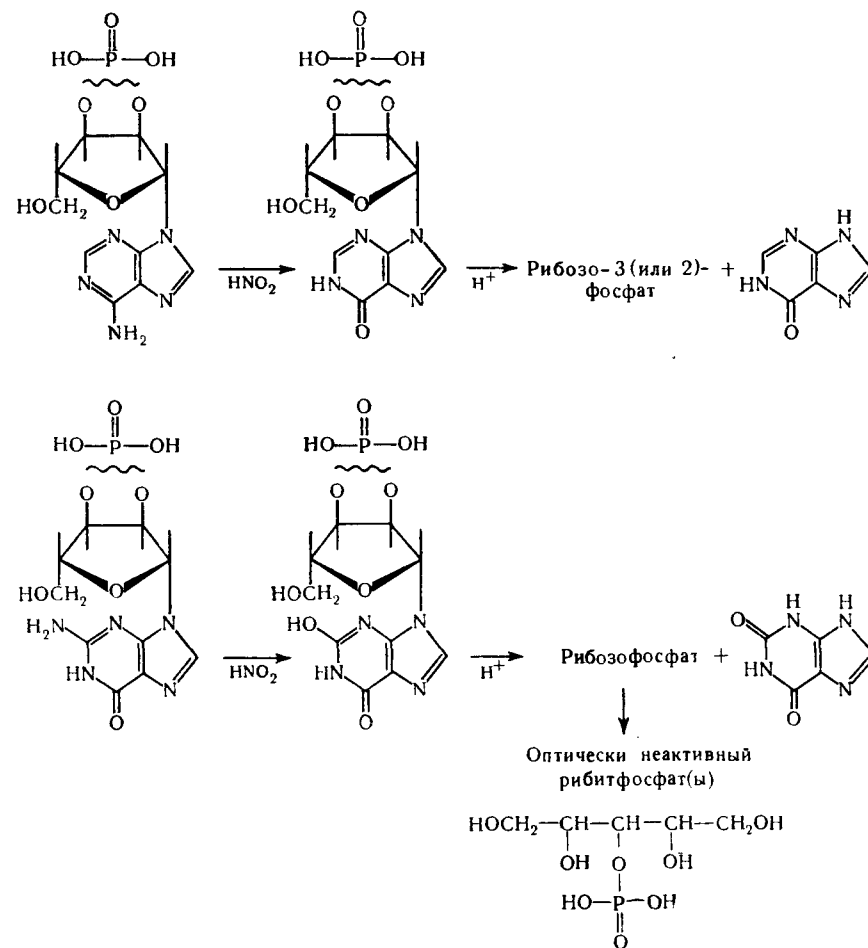
В результате кислотного гидролиза в мягких условиях инозиновой кислоты, выделенной из мяса, получается рибозофосфат, при окислении которого азотной кислотой образуется 5-фосфат рибоновой кислоты, но не фосфат триоксиглutarовой кислоты; следовательно, инозиновая кислота представляет собой инозин-5'-фосфат [25, 26]. Строение выделенного рибозо-5'-фосфата было полностью подтверждено синтезом этого эфира из метилгликозида 2,3-О-изопропилиденрибофуранозы [27, 28]. Тот факт, что мышечная адениловая кислота легко дезаминируется до инозин-5'-фосфата под действием ферментных препаратов, выделенных из мышц (аденозин-5'-фосфатдеаминаза), свидетельствует, что фосфорный остаток, очевидно, находится у первичной 5'-гидроксильной группы [29]. Более общими методами идентификации 5'-фосфатов являются следующие: во-первых, использование нуклеотидаз, специфичных для

нуклеозид-5'-фосфатов [30], во-вторых, периодатное окисление [31, 32] или комплексообразование с борной кислотой [33] (в ряду рибозы), которые позволяют обнаружить наличие незамещенной 2',3'-*цис*-гликольной группировки, и, в-третьих, сравнение с синтетическими нуклеотидами. В случае дезоксинуклеозид-5'-фосфатов представляет также интерес сравнение этих соединений с соответствующими рибонуклеотидами по их поведению при ионообменной хроматографии [34]. Предварительное восстановление основания в пиримидиновых нуклеотидах облегчает разрыв гликозидной связи [35]. Строение нуклеотидной части молекулы уридиндифосфатглюкозы было подтверждено при действии на этот кофермент гидразингидрата; при этом происходила деструкция пиримидинового основания и выделялся рибозо-5-фосфат [36].

Применение вышеупомянутых общих методов помогло установить место фосфоэфирной связи во всех основных нуклеозид-5'-фосфатах и во многих минорных нуклеотидах, производных как рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот, так и многих природных нуклеотидангидридов. Методом рентгеноструктурного анализа были выявлены дополнительные детали геометрического строения и установлены длины связей на примере кальциевых солей тимидин-5'-фосфата и аденозин-5'-фосфата [38].

НУКЛЕОТИД-2'- И НУКЛЕОТИД-3'-ФОСФАТЫ

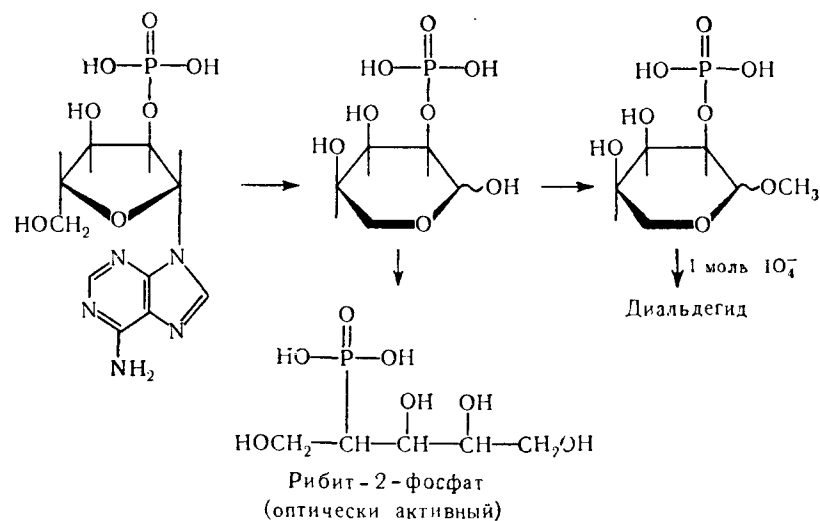
В течение многих лет считалось, что при щелочном гидролизе рибонуклеиновых кислот в мягких условиях образуется смесь только 3'-фосфатов аденозина, цитидина, гуанозина и уридина. Это ошибочное представление существовало главным образом из-за несовершенства методов классической органической химии применительно к идентификации и характеристике нуклеотидов. Многие в ранних работах Левина и его сотрудников, касающихся определения положения фосфорного остатка, противоречиво, вероятно, вследствие того, что нуклеотиды, с которыми они работали, представляли собой смеси 2'- и 3'-изомеров. Кроме того, они выделяли оптически неактивный рибитфосфат в результате восстановления рибозофосфата, полученного из гуаниловой кислоты (через продукт дезаминирования — ксантиловую кислоту). Однако при использовании условий, в которых проходит миграция фосфорного остатка, такое выделение не имеет никакого смысла. Тем не менее уже это исследование показало, что именно 2'- или 3'-гидроксильная группа сахара в таких нуклеозидах этерифицирована фосфатом. Так, дезаминирование адениловой кислоты приводило к инозиновой кислоте, дающей при гидролизе гипоксантин и рибозофосфат, который не был рибозо-5-фосфатом [40]. Фосфорилирование 5'-О-три-тилуридина приводит к уридилловой кислоте, которая оказалась



идентичной (с точки зрения доступных в то время методов) уридилловой кислоте, полученной из рибонуклеиновой кислоты [41].

Однако в 1949 г. Кон, применив ионообменную хроматографию, выделил из щелочных гидролизатов дрожжевой рибонуклеиновой кислоты две изомерные адениловые кислоты [42, 43]. Затем и для других нуклеотидов было обнаружено существование подобных пар изомеров [44—46]. Для всех этих нуклеотидов менее кислый изомер (в отношении ионообменной хроматографии) называли «а»-изомером, а другой — «b»-изомером; будучи довольно устойчивыми к щелочам, эти изомеры в кислых условиях легко превращались

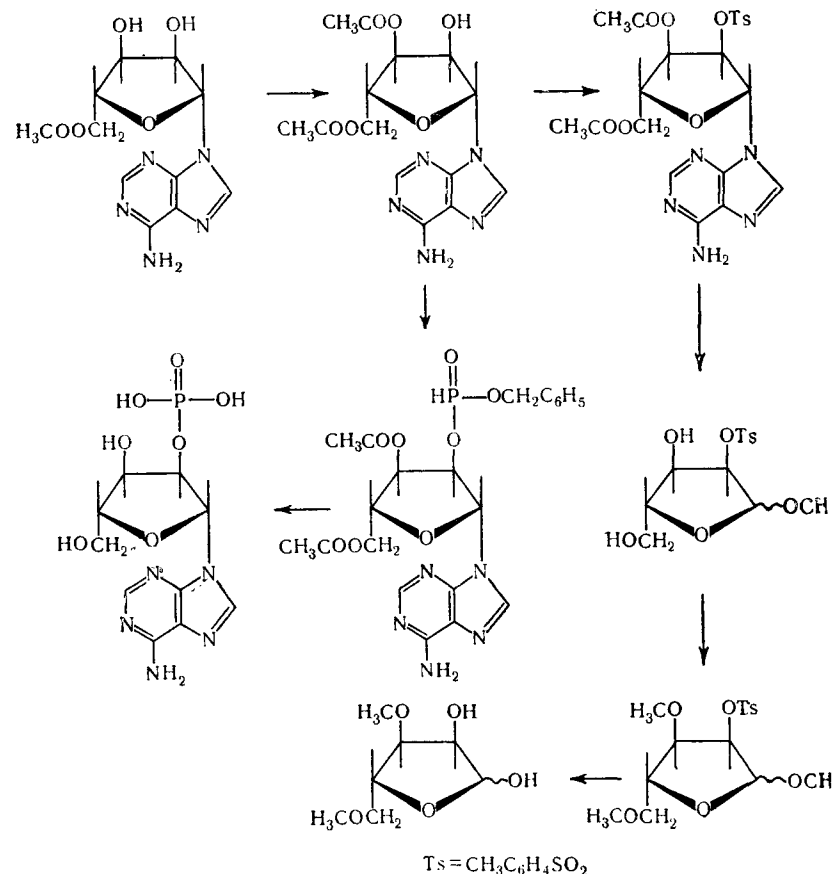
друг в друга, образуя равновесную смесь [47, 48]. Как «а»-, так и «b»-адениловые кислоты можно было дефосфорилировать до аденозина [49], и обе кислоты оказались устойчивыми к периодатному окислению [50]. При фосфорилировании 5'-О-трифтилуридина получалась смесь этих двух изомеров [47], и любой изомер давал один и тот же нуклеозидциклофосфат [51], который при щелочном или кислотном гидролизе образовывал смесь «а»- и «b»-фосфатов [51, 52]. Аналогичными свойствами обладали изомеры цитидиловой кислоты, а дезаминирование «b»-цитидиловой кислоты приводило к «b»-уридилиловой кислоте [53]. Ферментативное дефосфорилирование нуклеотидов специфической «b»-нуклеотидазой свидетельствовало о том, что все «b»-изомеры идентичны по структуре, и, следовательно, «а»-изомеры представляют собой отличный от них ряд [54]. Наконец, установили, что эти изомеры есть не что иное, как 2'- и 3'-фосфаты, но в то время еще не было возможности для проведения дальнейшей идентификации этих изомеров.



После быстрой обработки «а»- и «b»-изомеров адениловой и гуаниловой кислот смолой в сульфокислотной форме (для сведения к минимуму миграции фосфатной группы) с последующей ионообменной хроматографией образовавшихся фосфатов рибозы были получены следующие результаты: в случае «а»-изомеров было выделено большое количество рибозо-2-фосфата и гораздо меньше 3-фосфата, а в случае «b»-изомеров был получен главным образом 3-фосфат и значительно меньше 2-фосфата. При восстановлении рибозо-3-фосфата образовывался оптически неактивный рибит-3-фосфат,

тогда как из рибозо-2-фосфата было получено оптически активное соединение. Принятые для фосфатов рибозы структуры были подтверждены периодатным окислением их метилгликозидов [55, 56].

Однозначный синтез аденозин-2'-фосфата оказался решающим фактором в доказательстве, сводящем «а»-адениловую кислоту к аденозин-2'-фосфату, а «b»-изомер к аденозин-3'-фосфату [57]. Частичным ацелированием 5'-О-ацетиладенозин превращался в диацетиладенозин, из которого после тозилрования и метанолиза был



получен метил-О-тозилрибозид. Это соединение метилировали и толуолсульфонильную группу удаляли восстановительным расщеплением в присутствии амальгамы натрия. В результате последующего кислотного гидролиза получилась смесь метилированных сахаров, диметильная фракция которой состояла в основном из 3,5-

ди-О-метилрибозы. Аналогично дезацетилирование промежуточно образующегося тозилди-О-ацетиладенозина с последующим метилированием, восстановлением и кислотным гидролизом приводит к 3-О-метилрибозе и 3,5-ди-О-метилрибозе. Следовательно, исходное диацетильное производное представляло собой 3',5'-ди-О-ацетиладенозин. После обработки диацетиладенозина ангидридом бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот и окисления получившегося нуклеозидфосфита с последующим снятием защитных групп была получена «а»-адениловая кислота, не содержащая примеси «b»-изомера. Так как на протяжении всего синтеза устранялась возможность миграции фосфатной группы, «а»-адениловая кислота представляет собой аденозин-2'-фосфат [57].

Физические методы также использовались для идентификации «а»- и «b»-изомеров адениловой и цитидиловой кислот. Очень точными измерениями плотности водных растворов нуклеотидов было показано, что для любого нуклеотида раствор «b»-изомера обладает более высокой плотностью (вследствие электрострикции), так как в дипольных ионах этих соединений имеется большее разделение заряда. Кроме того, известно, что отрицательно заряженная группа действует на аминогруппу таким образом, что значения pK аминной группы тем больше, чем меньше расстояние между этими заряженными группами. Измерения констант диссоциации (табл. 3-1) аминогрупп, входящих в состав аденинового и цитозинового колец, подтверждают тот факт, что «а»-изомеры представляют собой 2'-фосфаты, а «b»-изомеры — 3'-фосфаты [58].

Таблица 3-1

Соединения	pK (NH_2^+)	pK второго гидроксила фосфорного остатка
Аденозин	3,5	
«а»-Адениловая кислота . . .	3,81	6,15
«b»-Адениловая кислота . . .	3,74	5,92
Цитидин	4,2	
«а»-Цитидиловая кислота . . .	4,44	6,19
«b»-Цитидиловая кислота . . .	4,31	6,04

Изменения в ультрафиолетовых спектрах поглощения цитидиловых кислот в интервале pH от 12 до 14 (в значительной степени обусловленные ионизацией 2'-гидроксильной группы сахара) также подтверждают отнесение «а»-изомеров к 2'-фосфатам, а «b» — к 3'-

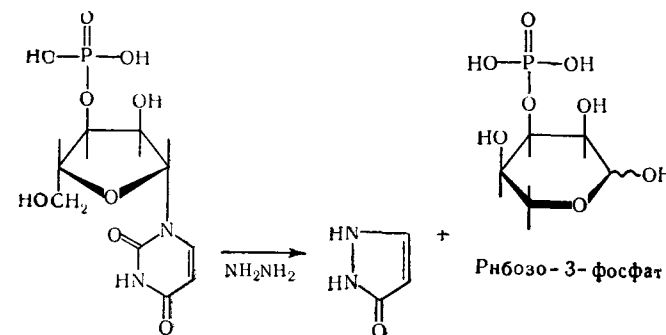
фосфатам [59]. Этот же результат был получен при сравнении инфракрасных [60, 61] и ультрафиолетовых спектров поглощения, а также оптического вращения 2'-, 3'- и 5'-изомеров цитидиловой кислоты с такими же данными для синтетических дезоксицитидин-3'- и дезоксицитидин-5'-фосфатов [61].

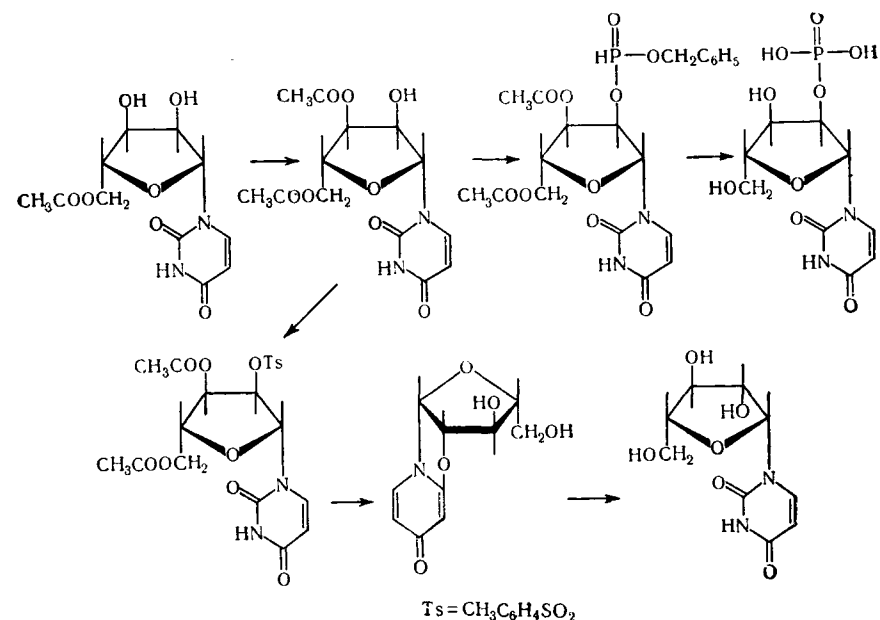
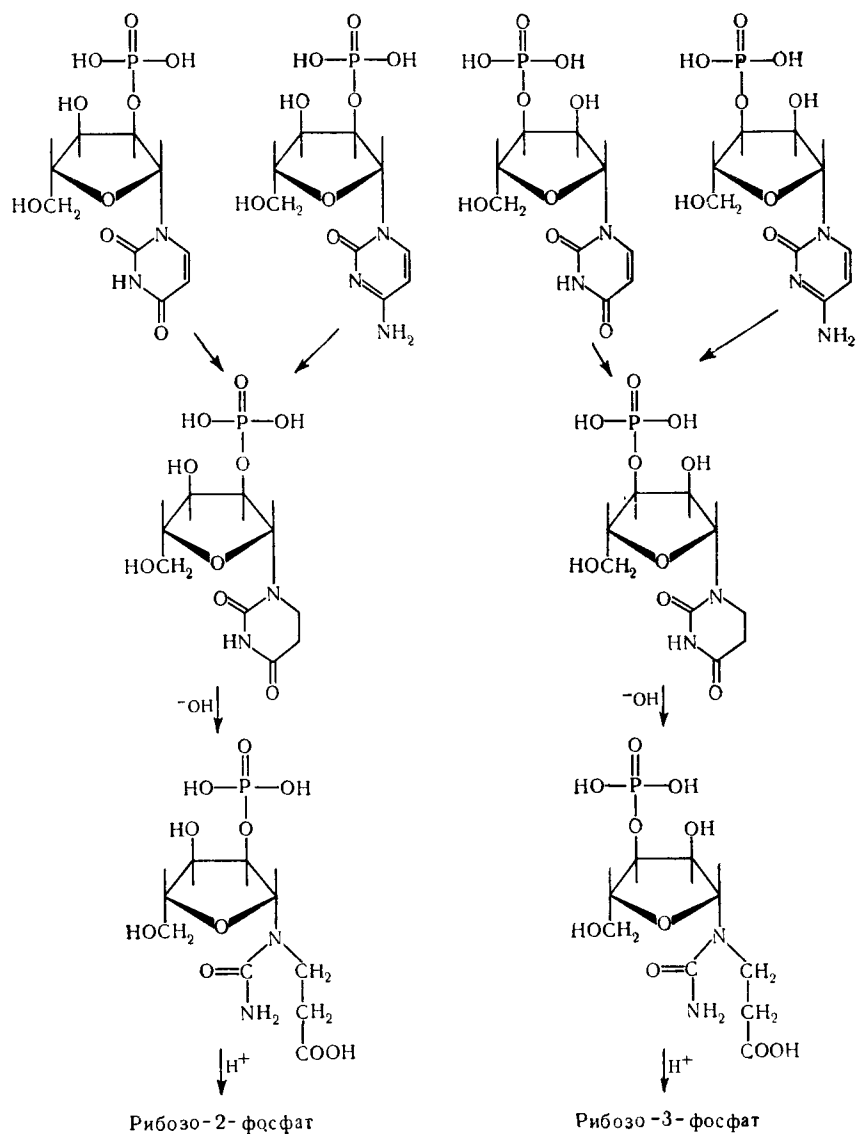
Химическое доказательство строения «а»- и «b»-изомеров цитидиловой кислоты было получено расщеплением этих нуклеотидов гидразингидратом с образованием 3-аминопиразола и 2- или 3-фосфатов рибозы (образуются с низким выходом) соответственно из «а»- или «b»-изомеров. Таким же образом «b»-уридиловая кислота превращалась в пиразолон и рибозо-3-фосфат [62]. В другом методе дигидроуридиловые кислоты, полученные гидрированием на родиевом катализаторе [35, 63] как цитидиновых, так и уридиновых нуклеотидов, под действием разбавленной щелочи расщеплялись с образованием N-рибозилфосфатов β -уреидопропионовой кислоты. Последние гидролизвались разбавленной щелочью при комнатной температуре до фосфатов рибозы без заметной миграции фосфатной группы. И снова «а»- и «b»-нуклеотиды соответствовали 2'- и 3'-фосфатам [35].

Дальнейшее химическое доказательство структуры этих пиримидиннуклеотидов было представлено однозначным синтезом уридин-2'-фосфата из 3',5'-ди-О-ацетилуридина, структура которого была доказана его превращением в 3- β -D-арабинофуранозилурацил через 2'-О-тозилат и O²,2'-циклонуклеозидное производное [64].

Рентгеноструктурный анализ подтвердил полностью строение аденозин-3'-фосфата [65] и цитидин-3'-фосфата [66].

Строение дезоксинуклеозид-3'-фосфатов, выделенных из ферментативных гидролизатов дезоксирибонуклеиновой кислоты, было легко установлено благодаря устойчивости, проявленной этими нуклеотидами к 5'-нуклеотидазе, а также непосредственным сравнением их с синтетическими соединениями [67].



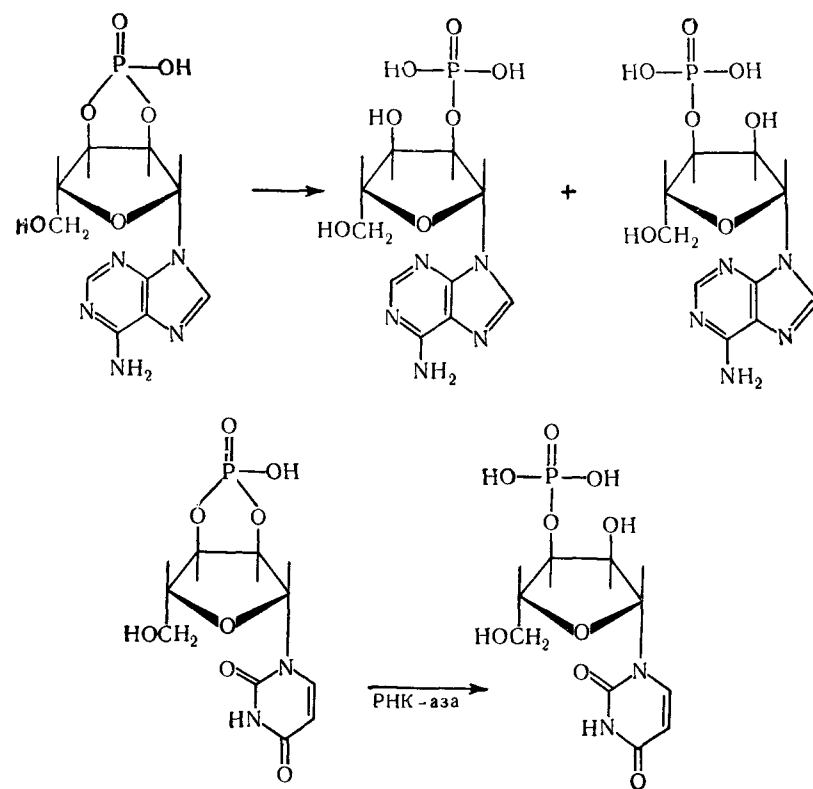


НУКЛЕОЗИДЦИКЛОФОСФАТЫ

Часть промежуточных продуктов, образующихся при действии рибонуклеазы на рибонуклеиновые кислоты, составляют пиримидиновые нуклеозид-2',3'-циклофосфаты, которые при дальнейшей обработке рибонуклеазой дают исключительно 3'-фосфаты [68, 69]. При гидролизе рибонуклеиновой кислоты под действием карбоната бария [68] или лучше *трет*-бутилата калия [70] были выделены пуриновые и пиримидиновые нуклеозид-2',3'-циклофосфаты. Они образуются также при нагревании раствора нуклеиновой кислоты в формамиде с аммиаком [71]. На основании данных титрования этих веществ, их поведения при хроматографировании на бумаге и электрофорезе, кислотного и щелочного гидролиза их до 2'- и 3'-фосфатов, а также из сравнения их с синтетическими образцами этим соединениям было приписано строение 2',3'-циклофосфатов [52, 53].

Эти циклофосфаты сыграли важную роль в выяснении механизма миграции фосфатного остатка, а также механизма химического и ферментативного (рибонуклеаза) гидролиза рибонуклеиновой кислоты [69].

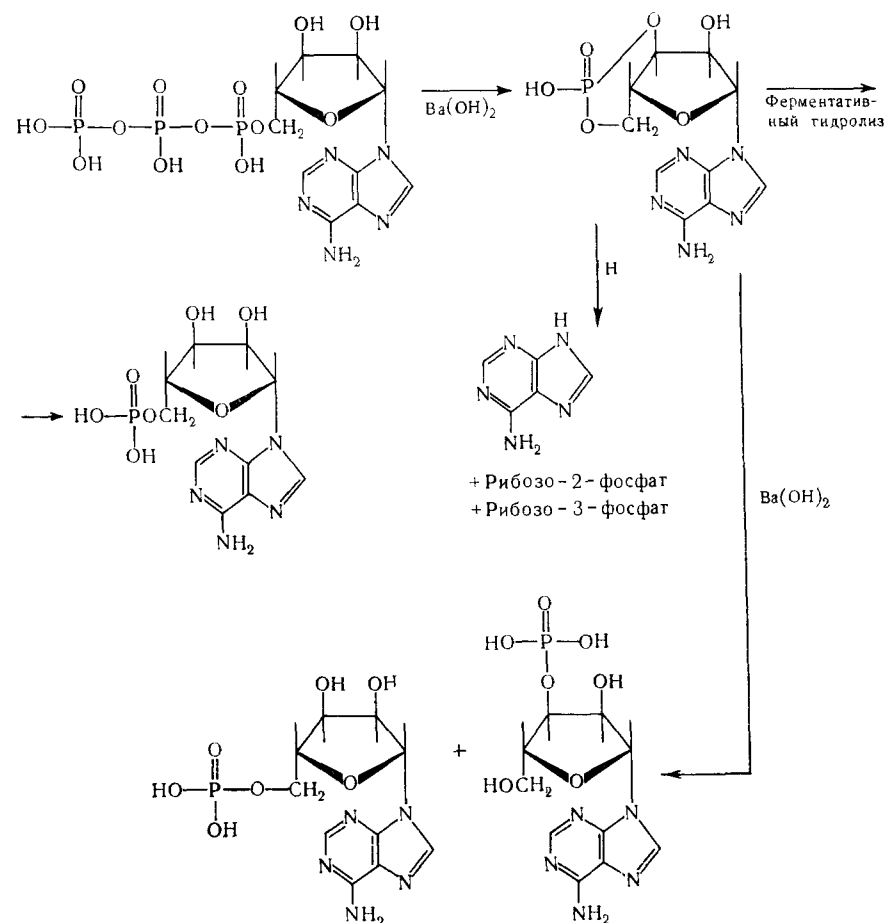
Несмотря на прогнозы, отрицавшие возможность образования рибонуклеозид-3',5'-циклофосфатов, недавно был выделен адено-



зин-3',5'-циклофосфат при действии на аденозин-5'-трифосфат гидроокиси бария [72]. Этот циклофосфат получается в результате внутримолекулярного фосфорилирования и идентичен адениннуклеотиду, образуемому из аденозин-5'-трифосфата при особом приготовлении его из печени собаки, сердца, скелетных мышц или мозга [73]. С помощью меченых атомов было показано, что при ферментативном синтезе происходит атака α -атома фосфора со стороны 3'-гидроксильной группы с отщеплением неорганического пирофосфата [239]. Биологическая роль этого нуклеотида заключается в стимулировании превращения неактивной гликогенфосфорилазы в активную форму в препаратах печени. Он служит также посредником в процессе активации фосфорилазы надпочечников, вызванном адренокортикотропным гормоном, и, кроме того, стимулирует выработку кортикостероидов [74, 75].

Определение молекулярного веса методом седиментации в ультрацентрифуге свидетельствует о моонуклеотидной структуре

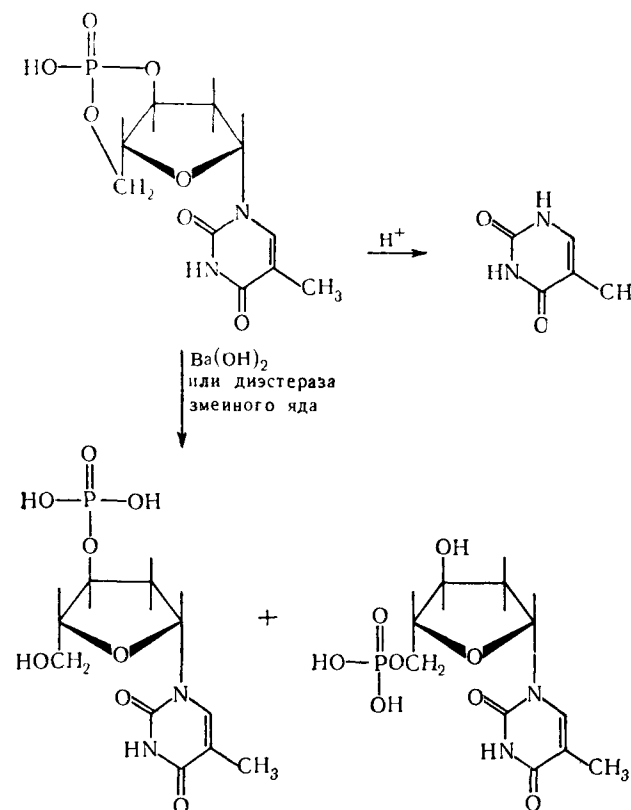
этого соединения. Наличие диэтерифицированной фосфатной группы, обнаруженное с помощью титрования щелочью, а также вытекающее из устойчивости этого эфира к действию фосфомоноэстераз, находится в соответствии с данными электрофореза, ионообменной хроматографии и хроматографии на бумаге. Этот нуклеотид не окисляется периодатом и дезаминируется до инозинового аналога (образующегося также при действии гидроокиси бария на инозин-5'-трифосфат). Несмотря на устойчивость к действию фосфодиэстераз кишечника и селезенки, а также рибонуклеазы, это соединение медленно гидролизуются до аденозина и аденозин-3'-фосфата при высоких концентрациях фермента змеиного яда. Очищенная диэсте-



раза дает смесь аденозин-3'- и аденозин-5'-фосфатов, а частично очищенный фермент, выделенный из сердца, осуществляет быстрый гидролиз с образованием только аденозин-5'-фосфата. В результате гидролиза катионитом в кислотной форме или соляной кислотой образуются аденин и равновесная смесь 2- и 3-фосфатов рибозы, поскольку гликозидная связь в этом нуклеозидциклофосфате (в противоположность другим адениловым кислотам) разрывается только в таких условиях, при которых происходит миграция фосфорного остатка. При обработке нуклеотида жидкой безводной фтористоводородной кислотой образуется рибоза, тогда как метилирование, за которым следует реакция с фтористоводородной кислотой, приводит к метилрибозе (отличной от 3-О-метилрибозы и 5-О-метилрибозы), сходной по свойствам с 2-О-метилрибозой [76]. В результате щелочного гидролиза едким натром образуется аденин и небольшое количество аденозина. Однако при гидролизе разбавленным раствором гидроокиси бария получается смесь аденозин-3'- и аденозин-5'-фосфатов в отношении 5 : 1, но 2'-фосфат не образуется [73, 76]. Молекулярные модели также свидетельствуют о том, что нуклеотид существует в 3',5'-циклической форме, а не изомерной 2',5'-форме [76]. В дальнейшем синтезом аденозин-3',5'-циклофосфата (и других рибо- и дезоксирибонуклеозид-3',5'-циклофосфатов) на основе нуклеозид-5'-фосфата было подтверждено сохранение β -конфигурации в этих циклофосфатах [76—78].

При обработке тимидин-3',5'-циклофосфата водным раствором едкого натра в жестких условиях образуется смесь тимидин-3'- (~80%) и тимидин-5'-фосфатов (~20%). Гидролиз под действием диэстеразы змеиного яда протекает довольно медленно, но и в этом случае образуются оба изомерных нуклеотида. В противоположность тимидин-5'-фосфату гликозидная связь в тимидин-3',5'-циклофосфате легко разрывается при кислотном гидролизе. Был также обнаружен гипсохромный сдвиг максимума в ультрафиолетовом спектре поглощения [77].

Наличие шестичленного фосфатного цикла стабилизирует пуриногликозидные связи к действию кислых агентов. В этих условиях особенно неустойчивой оказывается гликозидная связь в уридин-3',5'-циклофосфате и в соответствующем производном тимидина (но не в цитидин-3',5'-циклофосфате). При щелочном гидролизе едким натром рибонуклеозид-3',5'-циклофосфатов происходит сильное общее разложение, включая и разрыв гликозидной связи. Это особенно характерно для пуриновых производных, но с тимидин-3',5'-циклофосфатом и, вероятно, с другими 2'-дезоксипроизводными этого не происходит. При действии гидроокиси бария образуются нуклеозид-3'- и нуклеозид-5'-фосфаты в отношении 5 : 1. При гидролизе пириимидиновых рибо- и дезоксирибонуклеозид-3',5'-циклофосфатов, катализируемом ионами бария, полу-

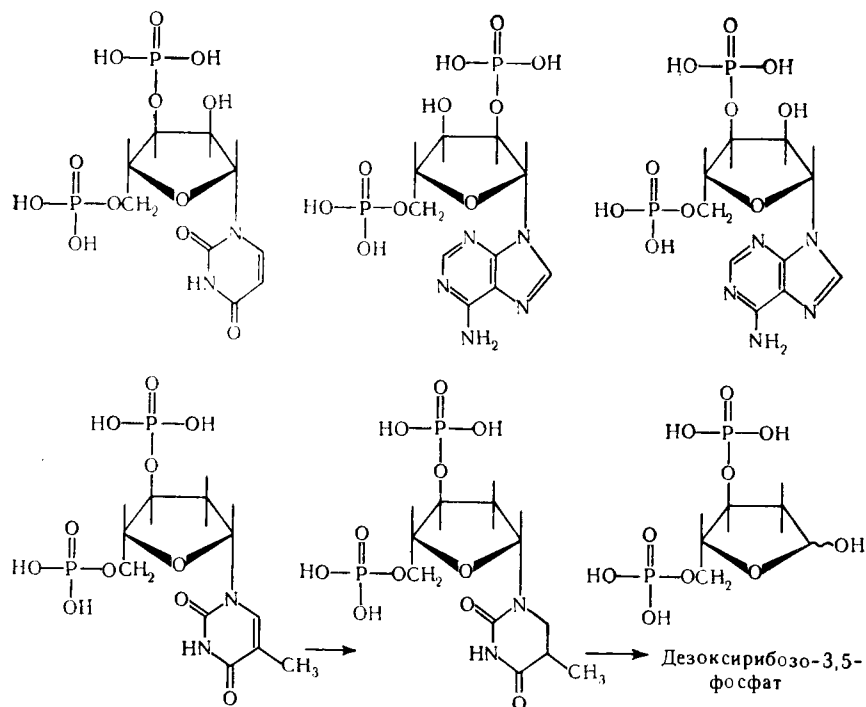


чается также небольшое количество вещества, являющегося, по-видимому, ксилофуранозильным производным. Возможно, это следствие нуклеофильной атаки C_3' со стороны пириимидин-2-карбонильной группы [78].

НУКЛЕОЗИД-2'(ИЛИ 3'), 5'-ДИФОСФАТЫ

Аденозин-3',5'-дифосфат был выделен из ферментативных гидролизатов кофермента А и «активного сульфата»; он является кофактором в биolumинесценции, проявляемой *Renilla reniformis* [242]. Изомерное 2',5'-производное было обнаружено в никотинамидадениндинуклеотидфосфате. Более удобным источником получения таких соединений в данном случае служит рибонуклеиновая кислота и, в частности, полученные расщеплением рибонуклеиновой кислоты препараты с короткой цепью. В результате гидролиза ферментом змеиного яда (или очищенной диэстеразой) получается

нуклеозид-3',5'-дифосфат, образующийся из концевго нуклеозида, имеющего 3'-фосфатную группу. Если условия способствуют миграции фосфатной группы, то образуются смеси 2',5'- и 3',5'-дифосфатов [79]. Аналогичным образом щелочной гидролиз любого полирибонуклеотида, имеющего концевую 5'-фосфатную группу, дает смесь 2',5'- и 3',5'-дифосфатов, образующуюся из этого концевго нуклеозида. Для изучения структуры нуклеотидов такого типа особенно полезным оказалось применение моноэстераз, специфичных для гидролиза 2'- и 3'-фосфатов.



С помощью ионообменной хроматографии [22] из кислотных гидролизатов дезоксирибонуклеиновой кислоты были выделены родственные 3',5'-дифосфаты тимидина, 2'-дезокситидина [22, 80—83] и 5-метил-2'-дезокситидина. Образующийся при каталитическом гидрировании тимидин-3',5'-дифосфата дигидротимидин-3',5'-дифосфат подвергался кислотному гидролизу в мягких условиях, в результате которого были получены дигидротимин и обладающий восстановительными свойствами дифосфат сахара, что подтверждает установленное для этого соединения строение [80].

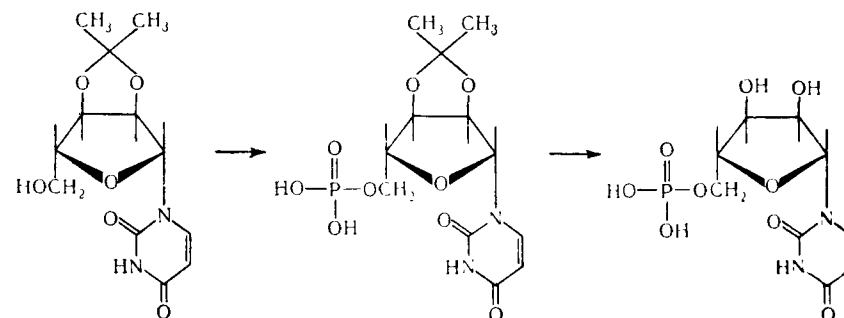
СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ

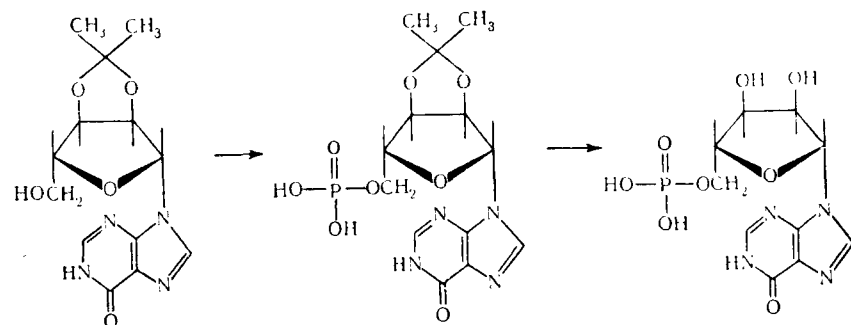
В принципе возможно синтезировать нуклеотиды любым из описанных для синтеза нуклеозидов методом с той разницей, что в данном случае сахар заменяется на фосфат сахара, защищенный соответствующим образом. Однако, за редким исключением, этот метод [241] гораздо менее удобен, чем методы фосфорилирования готовых нуклеозидов. Вообще говоря, успех синтеза нуклеотида зависит от применения хорошего фосфорилирующего агента, причем функциональные группы, не подлежащие фосфорилированию, должны быть блокированы, хотя в некоторых случаях может быть достигнуто избирательное фосфорилирование незащищенного нуклеозида. Ввиду неустойчивости некоторых нуклеотидов очень важно так защитить функциональные группы сахара и фосфорилирующего агента, чтобы эти защитные группировки можно было легко удалить затем в относительно мягких условиях. По этой причине многие из старых методов фосфорилирования имеют ограниченное применение. Кроме того, при использовании этих методов, как правило, образуются довольно сложные смеси продуктов.

РИБОНУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФАТЫ

Впервые нуклеотид был синтезирован в 1914 г. Э. Фишером фосфорилированием глюкозилтеофиллина хлорокисью фосфора в водном растворе гидроксида бария [84]. Полученный кристаллический фосфорный эфир при гидролизе образовывал фосфат глюкозы. Точное положение фосфатного остатка в последней осталось неизвестным.

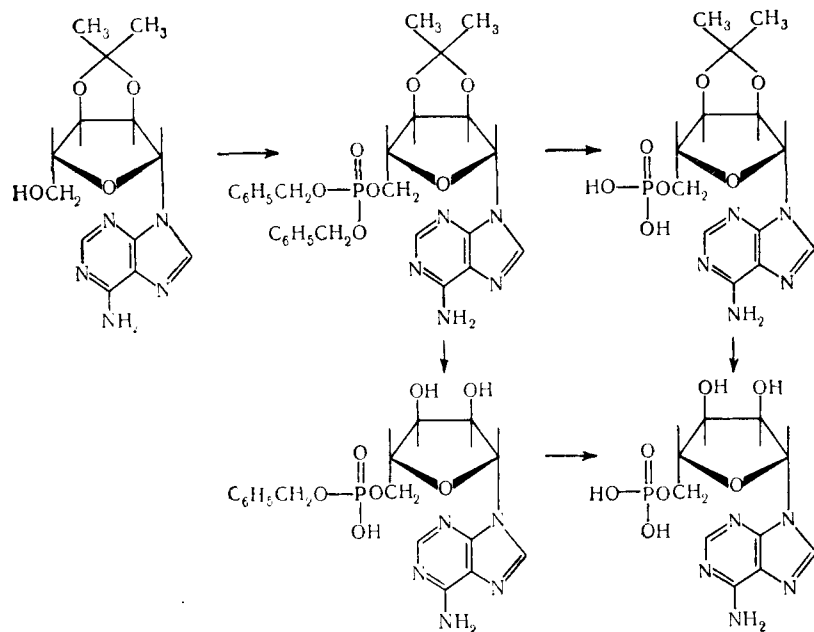
Позднее этот реагент был использован Левиным и Типсоном для (частичного) синтеза нуклеотидов, производных природных нуклеозидов. 2',3'-О-Изопропилиденуридин обрабатывали хлорокисью фосфора в пиридине, изопропилиденную группу удаляли





кислотным гидролизом и получали уридин-5'-фосфат [85]. 5'-Фосфаты инозина [86] и аденозина [87] были получены аналогично из соответствующих изопропилиденнуклеозидов с довольно низким выходом, особенно в случае адениловой кислоты. Этим же методом из 2',3'-О-бензилиденцитидина (ошибочно описанного как 3',5'-производное) был получен цитидин-5'-фосфат [88], а из 2',3'-О-изопропилиденгуанозина — гуанозин-5'-фосфат [89], содержащий примеси пирофосфатного и трифосфатного производных [90].

При непосредственном фосфорилировании незащищенных нуклеозидов хлорокисью фосфора в пиридине [91—93] образуются

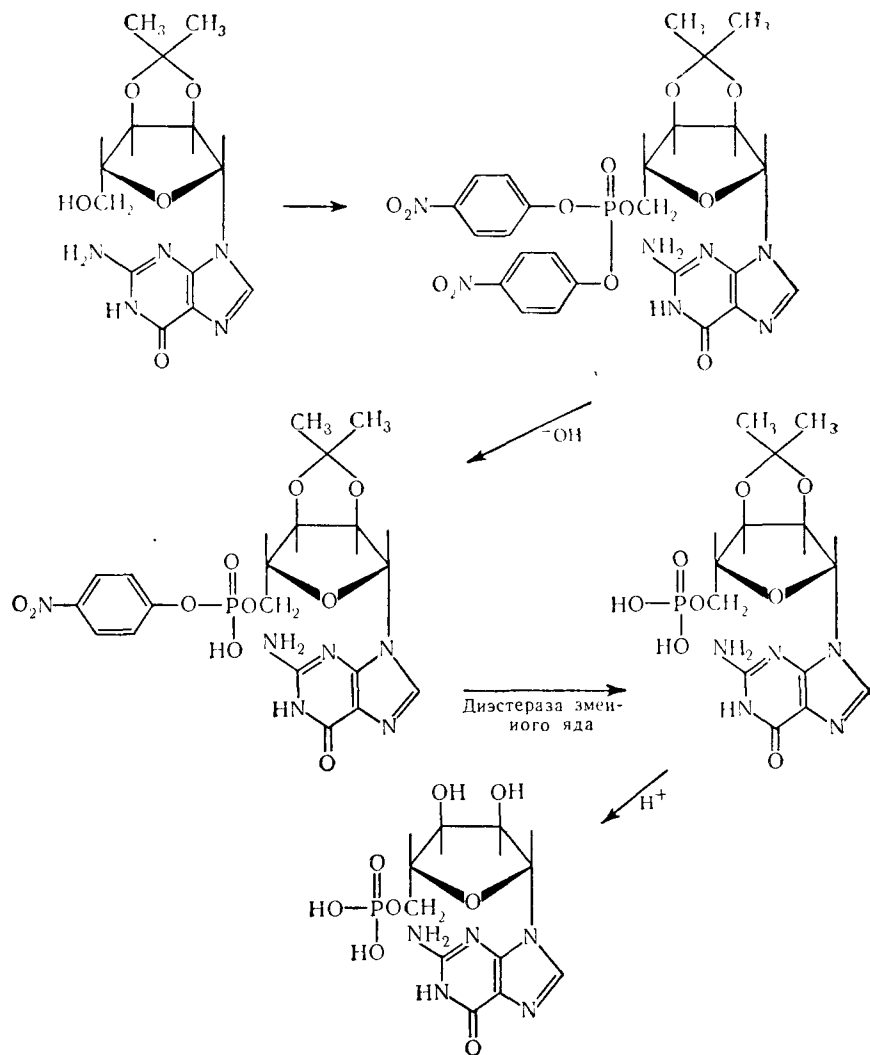


все три монофосфата (2', 3' и 5'), молярное соотношение которых зависит в некоторой степени от присутствия или отсутствия воды [94]. И в этом случае выходы неудовлетворительны.

При использовании хлорокиси фосфора вследствие его полифункциональной структуры возникают определенные трудности. Их удалось избежать, заменив этот агент диалкил(или диарил)-хлорфосфатами, такими, как дибензил- [95] и дифенилхлорфосфаты [96].

Для фосфорилирования производных нуклеозидов дибензилхлорфосфат более удобен вследствие того, что бензильные группы легко удаляются рядом методов, включая гидрогенолиз, кислотный и щелочной гидролиз и анионное расщепление [97]. При обработке 2',3'-О-изопропилиденаденозина дибензилхлорфосфатом образуется 5'-дибензилфосфат, из которого каталитическим гидрогенолизом удаляются бензильные группы. При действии разбавленной кислоты отщепляется изопропилиденный остаток и образуется с хорошим выходом аденозин-5'-фосфат [98]. В другом случае использовали кислотный гидролиз 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-дибензилфосфата в мягких условиях, в результате которого образовывался аденозин-5'-бензилфосфат, из которого гидрогенолизом получали свободный нуклеотид [98].

Фосфорилирование 2',3'-О-изопропилиденных производных уридина, цитидина [89] и 9-β-D-рибофуранозилпурина [99] дибензилхлорфосфатом с последующим удалением защитных групп приводит к соответствующим 5'-фосфатам. Производные гуанозина оказались несколько более устойчивыми к действию реагентов такого типа. В этом случае удобнее применять тетраалкил- или тетраарилпирофосфаты, являющиеся вследствие ангидридного строения фосфорилирующими агентами [100, 101]. Так, например, при действии на 2',3'-О-изопропилиденгуанозин тетра-*n*-нитрофенилпирофосфата (образуется непосредственно в процессе реакции в результате взаимодействия ди-*n*-толилкарбодиимида и ди-*n*-нитрофенилфосфорной кислоты) получается 2',3'-О-изопропилиденгуанозин-5'-ди-*n*-нитрофенилфосфат, причем реагент является достаточно мощным и не требует присутствия катализатора. При щелочном гидролизе в мягких условиях удаляется одна *n*-нитрофенильная группа; для удаления второй группы требуются более жесткие условия, при которых может происходить дефосфорилирование в качестве побочного процесса. Обработка моноарилнуклеотида змеиным ядом (диэстеразой) оказалась более эффективным средством, причем присутствующая в яде 5'-моноэстераза была неактивна и не расщепляла получающийся нуклеотид вследствие наличия в нем 2',3'-О-изопропилиденной блокирующей группировки. Эта группировка, в свою очередь, была удалена обычным образом, и в результате был получен с хорошим общим выходом гуанозин-5'-фосфат [90].



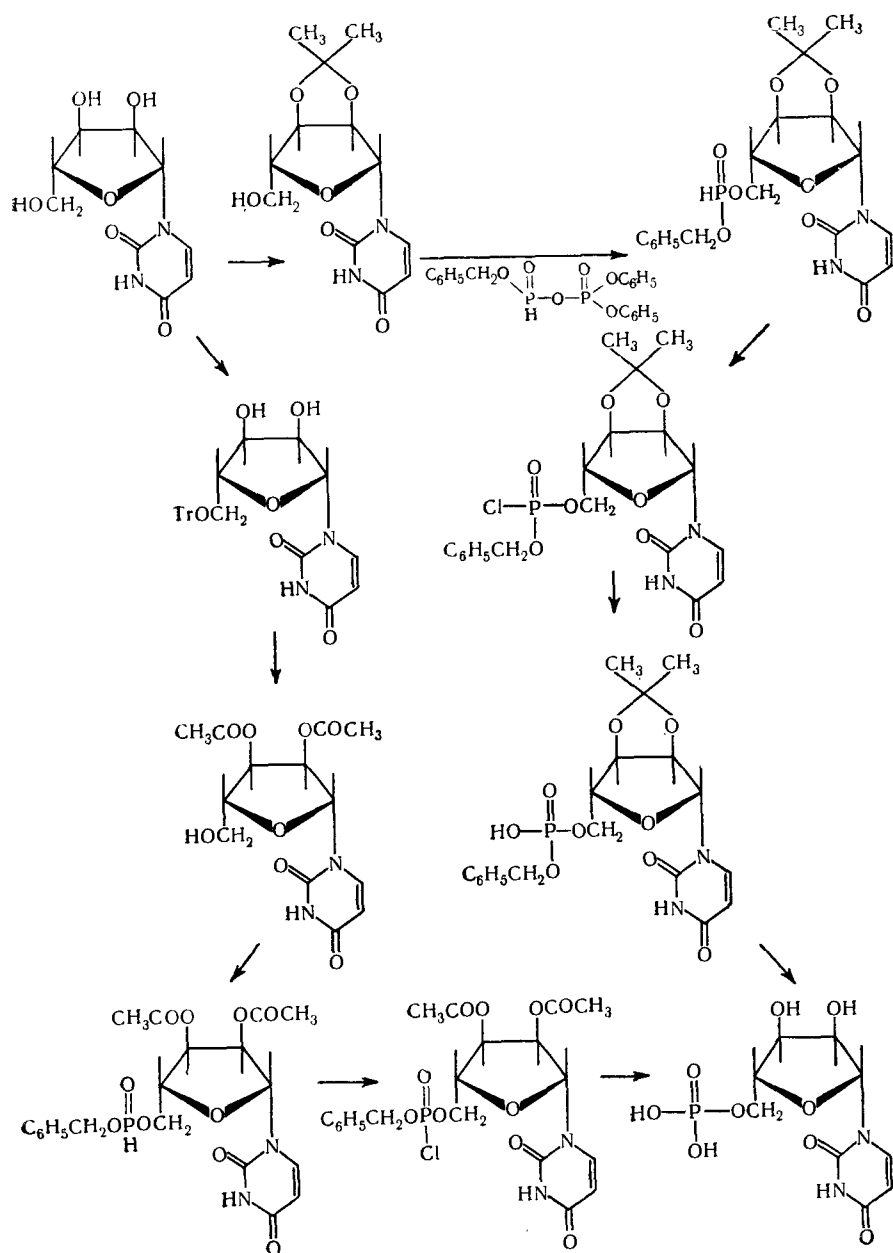
Кроме того, этот реагент применялся для фосфорилирования 9- β -D-2',3'-O-изопропилиденрибофуранозильных производных 6-хлорпурина, 6-меркаптопурина и 2-амино-6-меркаптопурина [102], а также для синтеза 3- β -D-рибофуранозил-4-азаурацил-5'-фосфата [103] и 2'-дезоксинуридин-5'-фосфата [104].

Другим фосфорилирующим реагентом, родственным хлорангиридам фосфорной кислоты, является смешанный ангидрид бен-

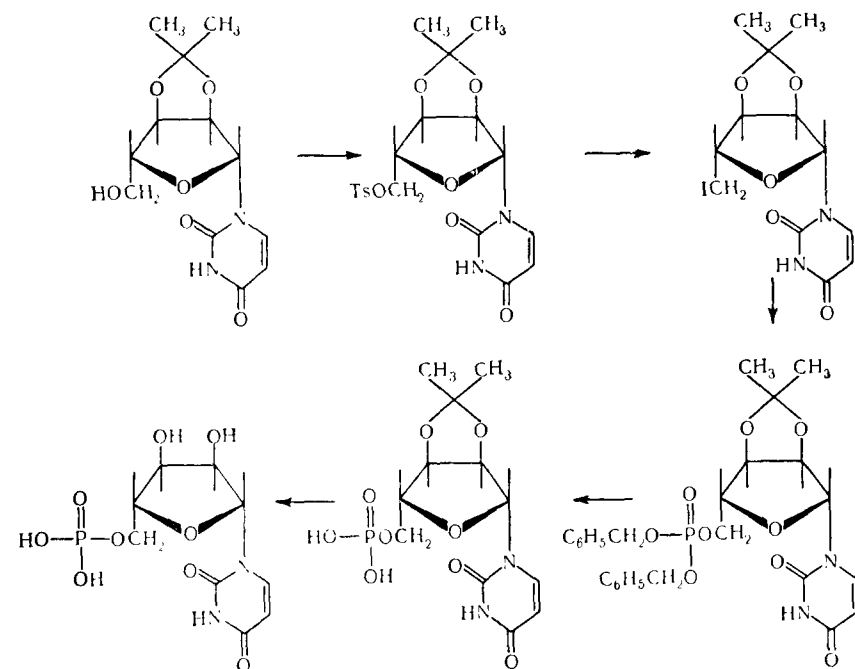
зилфосфористой и дифенилфосфорной кислот, легко получающийся при взаимодействии дифенилхлорфосфата с монобензилфосфитом [105]. При реакции этого реагента со спиртами происходит нуклеофильное замещение более сильной кислоты, входящей в состав ангидрида, на спиртовый остаток и образуется алкилбензилфосфит, при хлорировании [106] которого N-хлорсукцинимидом получается алкилбензилхлорфосфат. После гидролиза такого алкилбензилфосфата и затем гидрогенолиза получается алкилфосфат. Таким смешанным ангидридом обрабатывали ряд защищенных нуклеозидов, причем он использовался как для синтеза нуклеотидов, так и для активации нуклеотидных промежуточных соединений. Так, например, при обработке 2',3'-O-изопропилиденуридина смешанным ангидридом бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот в присутствии четвертичного основания образуется защищенный нуклеозидфосфит, который затем окисляли до хлорфосфата. Щелочной гидролиз в мягких условиях приводит к 2',3'-O-изопропилиденуридин-5'-бензилфосфату, из которого обычным образом после удаления защитных групп получается свободный нуклеотид [105].

Так как смешанный ангидрид — более сильный реагент, чем дибензилхлорфосфат, он является ценным агентом для фосфорилирования нуклеозидных производных, не реагирующих с хлорфосфатами. Смешанный ангидрид применялся для синтеза 6-диметиламино-9- β -D-рибофуранозилпуридин-5'-фосфата [107] и других нуклеотидов. Наиболее удобным реагентом для синтеза пиримидиновых рибонуклеозид-5'-фосфатов, пожалуй, является один из самых старых фосфорилирующих агентов, «полифосфорная кислота» [108]. В результате обработки полифосфорной кислотой 2',3'-O-изопропилиденцитидина (или 2',3'-O-изопропилиденуридина) [109] или аналогичных 2',3'-O-бензилиденовых производных [110] с последующим кислотным гидролизом для расщепления полифосфата и удаления защитной группы образуется нуклеотид, который можно легко выделить с хорошим выходом [110]. Так как условия такого фосфорилирования являются достаточно жесткими, этот метод не применяется для фосфорилирования менее устойчивых пуриновых рибонуклеозидов и дезоксинуклеозидов.

Другой путь синтеза нуклеозид-5'-фосфатов состоит в использовании реакции серебряной соли дибензилфосфата с 5'-иод-5'-дезокси-2',3'-O-изопропилиденуридином с последующим удалением защитных групп [111]. Образование циклонуклеозидных производных ограничивает применение этого метода, позволяя получать из природных только урацилсодержащие нуклеотиды; однако он был использован и для синтеза 7- β -D-рибофуранозилтеофиллин-5'-фосфата и 7- β -D-глюкопиранозилтеофиллин-6'-фосфата [112, 113].



Tr = трифенилметил



Обычно для блокирования 2'- и 3'-гидроксильных групп проводят конденсацию нуклеозида с ацетоном [85] или бензальдегидом [88], однако в некоторых случаях лучше применять 2',3'-ди-О-ацетилнуклеозиды [114]. Эти соединения получают ацетилированием 5'-О-третилнуклеозидов с последующим удалением третильной группы кислотным гидролизом в мягких условиях. Кроме того, можно вводить в нуклеозид и другие ацильные группы, как, например, бензоильную. 2,3-Карбонильные производные использовали при изучении пурамицина [115], а также в синтезе α -D-риbose-1-фосфата [116] и α - и β -аномеров аденозина [117], но для защиты нуклеозидов, подлежащих фосфорилированию, они пока не нашли применения.

Выше говорилось о том, что химический синтез нуклеотидов из свободного основания и фосфата сахара не нашел широкого применения. Однако биохимический синтез нуклеозид-5'-фосфатов этим методом оказался в ряде случаев удобным, в частности, в случае нуклеозидов, производных «неприродных» оснований, так как предварительной стадией при химическом получении таких нуклеотидов является синтез самого нуклеозида. Из *Escherichia coli*, ингибированной азаурацилом, легко выделяются оротидин-5'-фосфат и ури-

дин-5'-фосфат, накапливающиеся в результате метаболического блокирования [118]. В методе, доступном большому контролю, используются субстраты и очищенный фермент, обуславливающий такой синтез [119]. Так, при взаимодействии [120] 6-меркаптопурина с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом (α -D-рибофуранозо-5-фосфат-1-пирофосфат) [121] в присутствии пирофосфорилазы из печени крупного рогатого скота образуется 9- β -D-рибофуранозил-6-меркаптопурин-5'-фосфат. Подобный фермент, присутствующий в экстрактах печени свиньи, катализирует синтез соответствующих нуклеозид-5'-фосфатов из 5-фосфорибозил-1-пирофосфата и 8-азагуанина, 2,6-диаминопурина, 6-меркаптопурина, из гуаниновых аналогов пиразол-[3,4-d]-пиримидинового ряда, а также из аденина и гипоксантина [122]. Частично очищенные ферменты дрожжей также использовались для аналогичного синтеза 5-фторуридин-5'-фосфата из 5-фтороротидин-5'-фосфата, проходит декарбоксилирование [123]. Оптимальная активность фермента достигается при эквимольном соотношении иона магния и 5-фосфорибозил-1-пирофосфата, что довольно обычно при использовании

пирофосфорилаз. По-видимому, активным субстратом является комплекс магния с пирофосфатом [123].

И, наконец, была получена аденилянтарная кислота (промежуточный предшественник аденозин-5'-фосфата в биосинтезе этого нуклеотида) с помощью ферментативного синтеза другого типа, состоящего в конденсации аденозин-5'-фосфата и фумаровой кислоты, катализируемой дрожжевой аденилосукциназой [124].

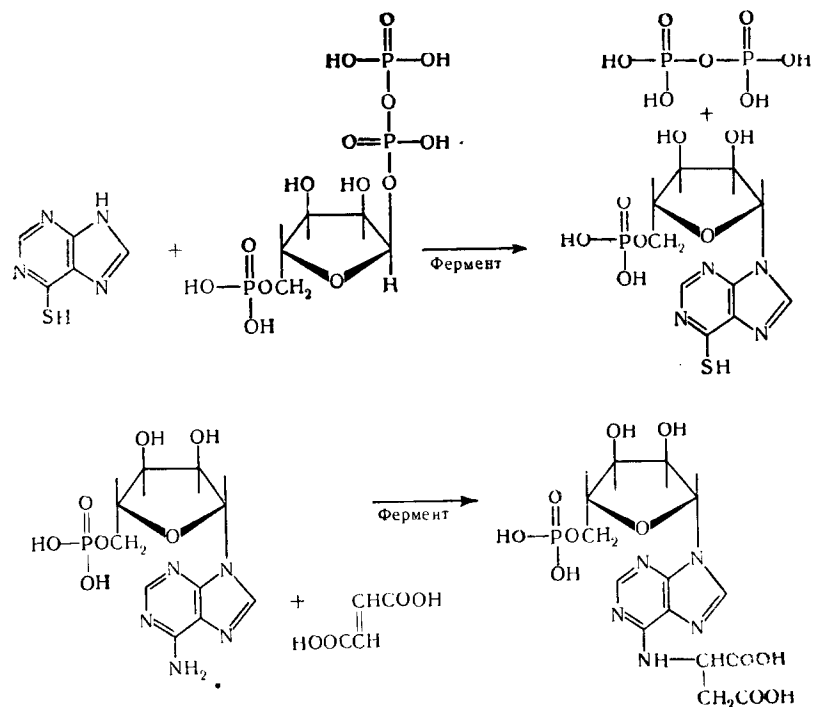
РИБОНУКЛЕОЗИД-2'- И РИБОНУКЛЕОЗИД-3'-ФОСФАТЫ

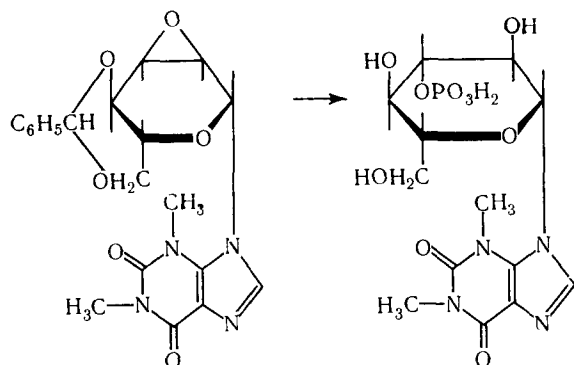
Очень небольшие количества смеси 2'- и 3'-фосфатов получали при непосредственном фосфорилировании свободных нуклеозидов хлорокисью фосфора в баритовой воде [93, 105]. Исследование этой реакции на примере аденозина с использованием современных средств показало, что в этих условиях реакция действительно является избирательной и фосфорилируются только 2'- и 3'-гидроксильные группы; 5'-фосфата не образуется [94].

При фосфорилировании 5'-О-тритилнуклеозидов [89, 126—128] после удаления защитной группы образуется смесь 2'- и 3'-фосфатов [47]. Ввиду того что в положениях 2' и 3' легко происходит миграция фосфатного остатка, вопрос об избирательном фосфорилировании гидроксильной группы в одном из этих положений остается открытым.

Ранние сообщения [89, 129] об однозначных синтезах нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфатов базировались на ошибочных данных о строении бензилиденгуанозина [130, 131] и, как оказалось, были неверными [50]. Однако как аденозин-2'-фосфат, так и уридин-2'-фосфат были синтезированы однозначными путями фосфорилированием 3',5'-ди-О-ацетилнуклеозидов под действием смешанного ангидрида бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот с образованием фосфита, за которым следовали окисление и гидролиз [57, 64]. В основе однозначного синтеза 3'-фосфатов лежит реакция уридин-3',5'-циклофосфата с дигидропираном, приводящая к получению 2'-О-тетрагидропиранильного производного [132].

В результате присоединения дибензилфосфорной кислоты по эпоксидной группе 7- β -(4,6-бензилиден-2,3-ангидро-D-аллопиранозил)теофиллина образуется 7- β -D-глюкопиранозилтеофиллин-3'-фосфат [133]. Реакция такого типа не использовалась для синтеза пентозильных (рибоза и ксилоза) нуклеозид-3'-фосфатов, хотя в настоящее время необходимые для этого 2',3'-ангидронуклеозиды вполне доступны.

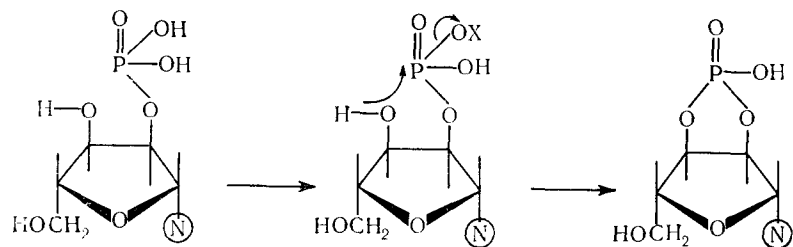




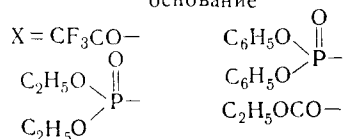
РИБОНУКЛЕОЗИД-2',3'-ЦИКЛОФОСФАТЫ

При фосфорилировании глюкозилтеофиллина хлорокисью фосфора в пиридине образуется циклофосфат [84], являющийся, вероятно, 4',6'-циклофосфатом [134].

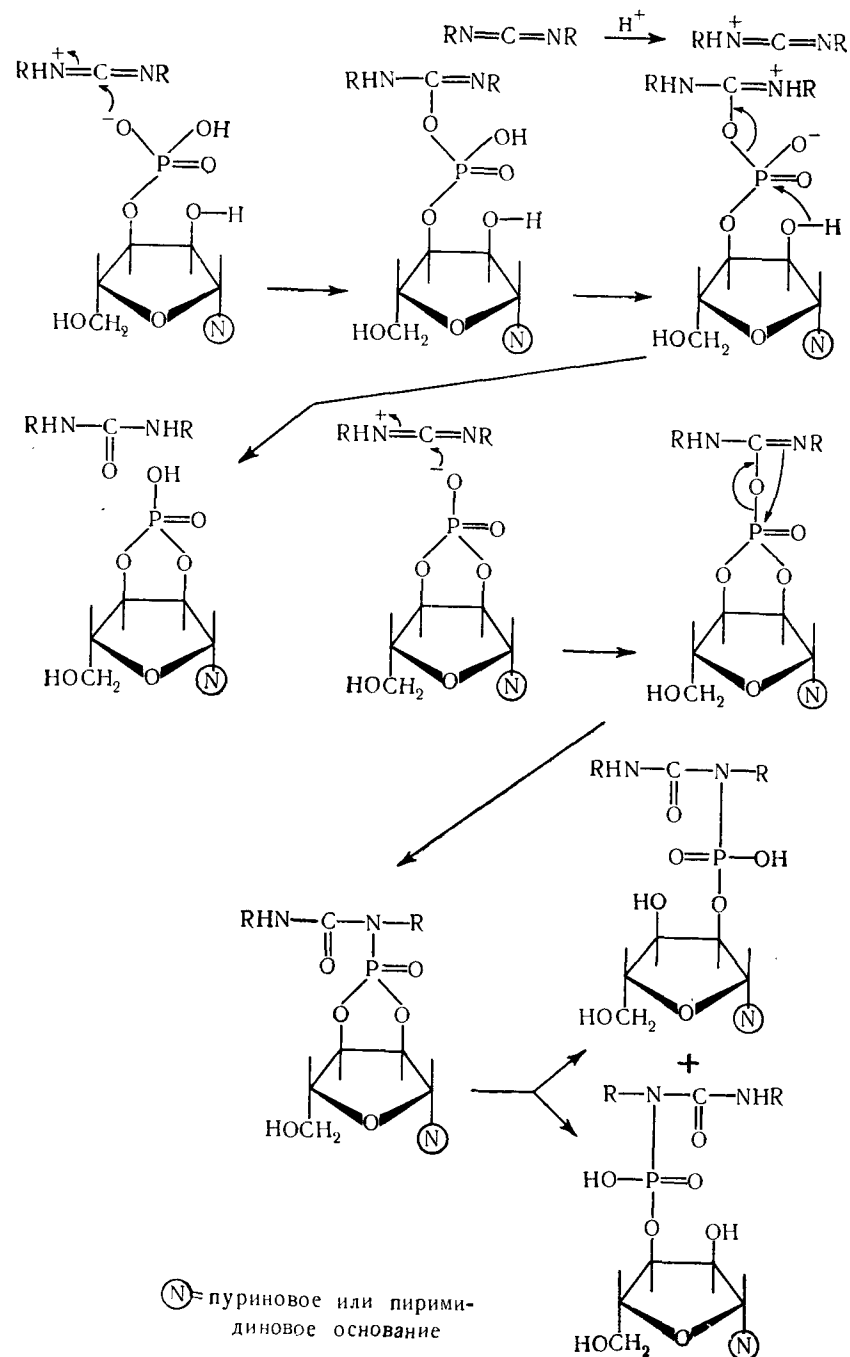
Природные нуклеозид-2',3'-циклофосфаты легко получают при обработке нуклеозид-2' (или 3')-фосфата (или смеси 2'- и 3'-фосфатов) любым реагентом ангидридной природы, включая трифторуксусный ангидрид [51], тетрафенилпирофосфат и дифенилхлорфосфат (еще лучше применять диэтилхлорфосфат, при действии которого не происходит дальнейшей полимеризации) [134, 135]. При этом образуется смешанный нуклеотидангидрид, а затем происходит быстрое внутримолекулярное фосфорилирование.



(N) = пуриновое или пиримидиновое основание



К этим методам относится также обработка нуклеотида хлоругольным эфиром в присутствии основания в водном растворе:



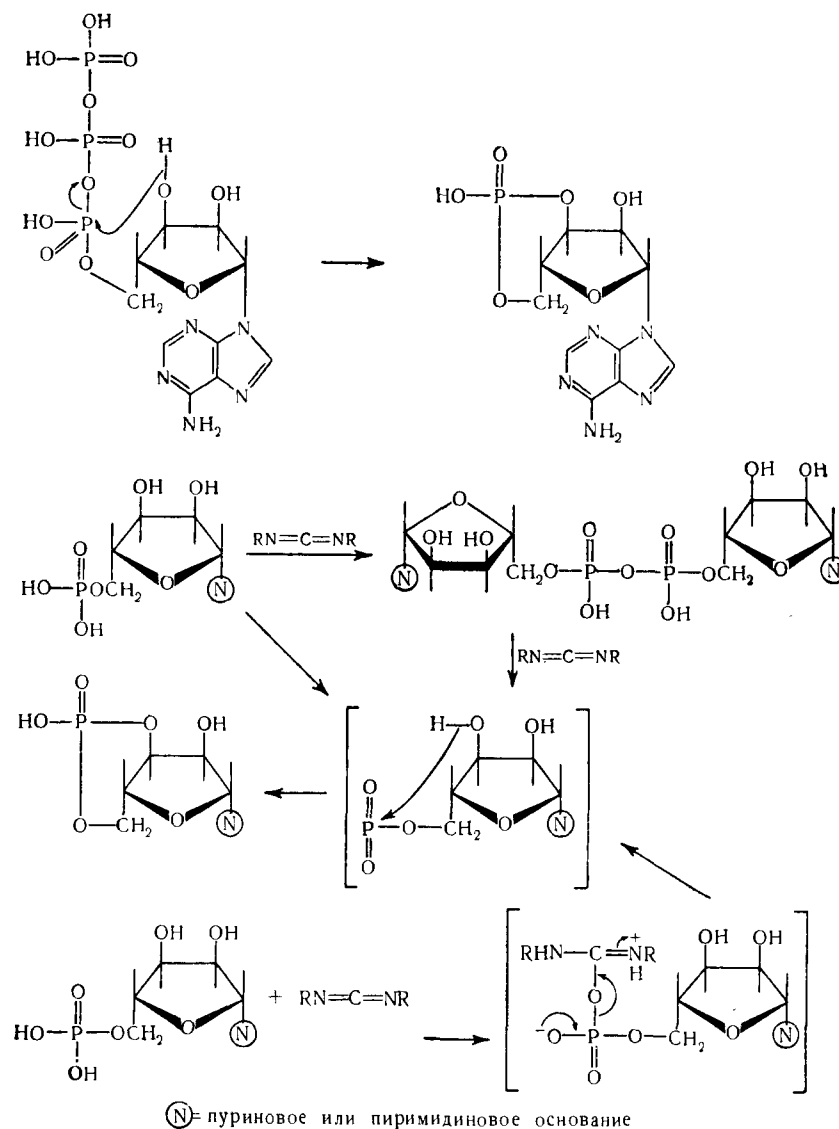
таким образом можно получать нуклеозид-2',3'-циклофосфаты с количественным выходом [136]. Близость соседней гидроксильной группы и ее выгодная конформация обуславливают внутримолекулярную реакцию, протекающую в промежуточном ангидриде нуклеотида и этилкарбоновой кислоты и препятствуют гидролитическому расщеплению этого промежуточного продукта. Большая скорость этой реакции также определяется близостью соседнего гидроксила; в противоположность этому ангидриду этилкарбоновые ангидриды нуклеозид-5'-фосфатов настолько устойчивы, что их можно выделять (их получают в водном растворе) [137].

Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты были, кроме того, получены при действии карбодиимида на нуклеозид-2'(или 3')-фосфаты [138]. Моноанион образующегося циклофосфата вновь подвергается действию дициклогексилкарбодиимида, в результате чего во влажном пиридине образуется смесь циклофосфата и 2'- и 3'-фосфорилмочевин. Этого побочного процесса можно избежать, пользуясь солями нуклеотида с триалкиламином [140] или аммиаком [139] в безводной среде. В присутствии более сильных оснований присоединение протона к карбодиимиду чрезвычайно затруднено, так что реакция с циклофосфатом (значительно менее сильным нуклеофильным агентом, чем дианион нуклеотида) почти не идет. Для циклизации можно применять менее основные карбодиимиды [140, 141]. Как и при использовании смешанных ангидридов, в образовании циклофосфатов из аддукта с псевдомочевинной большую роль играет именно расположение и конфигурация соседней гидроксильной группы, несмотря на слабо выраженный нуклеофильный характер гидроксильных групп сахара.

Рибофлавин-4',5'-циклофосфат был получен обработкой рибофлавина раствором хлорокиси фосфора в пиридине в присутствии молярного эквивалента воды [142]. Вероятно, активным фосфорилирующим агентом является метафосфатное производное, образующееся при действии основания на дихлорфосфорную кислоту [143]. Кроме того, циклофосфат получали, действуя на рибофлавин-5'-фосфат карбодиимидом [141], а еще удобнее, обрабатывая нуклеотид хлоругольным эфиром и три-*n*-бутиламином в водной среде [137].

НУКЛЕОЗИД-3',5'-ЦИКЛОФОСФАТЫ

Превращение нуклеозид-5'-трифосфата под действием водной гидроокиси бария — сложный процесс, в результате которого образуется ряд продуктов [144], в том числе и нуклеозид-3',5'-циклофосфат [76]. Как рибонуклеозид-3',5'-циклофосфаты, так и аналогичные дезоксипроизводные можно получать непосредственно нагреванием три-*n*-бутиламмониевой соли нуклеозид-5'-фосфата и дициклогексилкарбодиимида в пиридине [76—78].



В данном случае, вероятно, образуется промежуточный мономерный метафосфат нуклеозида, который получается либо из первоначально получающегося аддукта нуклеотида и карбодиимида, либо из P^1, P^2 -динуклеозид-5'-пирофосфата при взаимодействии последнего также с карбодиимидом [143], хотя внутримолекуляр-

ное фосфорилирование с образованием 3',5'-циклофосфата протекает также при нагревании растворов P¹, P²-динуклеозид-5'-пирофосфатов в пиридине [76—78] в отсутствие воды. Тимидин-3',5'-циклофосфат образуется при комнатной температуре в результате обработки тимидин-5'-фосфата дициклогексилкарбодиимидом в очень разбавленном пиридиновом растворе [77]. При действии дициклогексилкарбодиимида на 4-морфолин-N,N'-дициклогексилкарбоксимидиниевую соль рибонуклеозид-5'-фосфата (или N-бензоилнуклеотида в случае производных цитидина и гуанозина) были получены рибонуклеозид-3',5'-циклофосфаты с хорошими выходами [78].

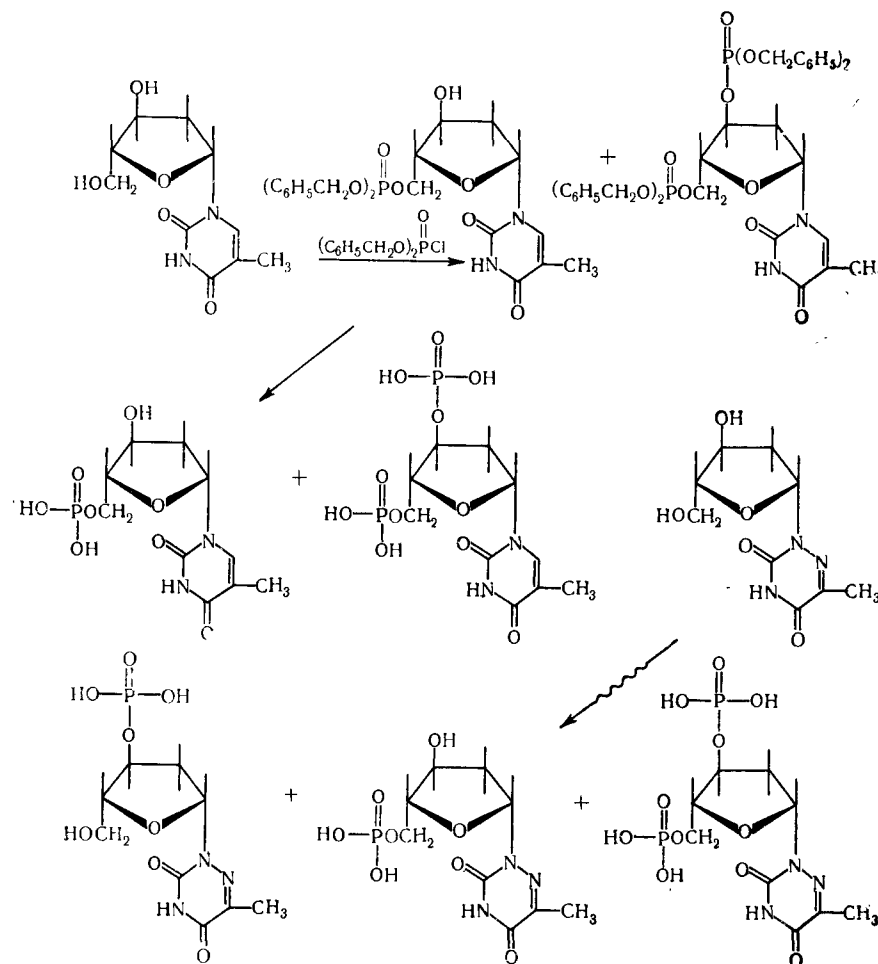
НУКЛЕОЗИД-3'(ИЛИ 2'),5'-ДИФОСФАТЫ

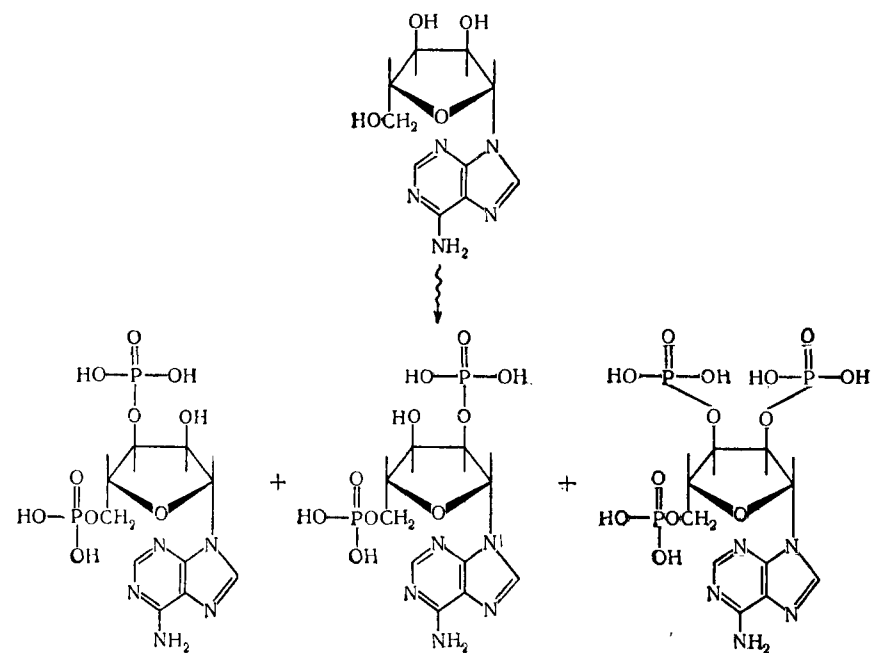
При прямом фосфорилировании тимидина (или дезоксицитидина) избытком дибензилхлорфосфата с последующим гидрогенолизом с целью удаления бензильных групп образуется дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфат [22] наряду с небольшим количеством 5'-фосфата; 3'-фосфата при этом не образуется, что указывает на некоторую избирательность фосфорилирования гидроксильной группы в положении 5' [145]. Пиримидиновое основание может оказывать значительное влияние на относительную реакционную способность гидроксильных групп сахара: использование той же методики для 4-азатимидина (полученного ферментативным путем реакцией трансгликолиза между тимидином и 4-азатимином) приводит к продукту, после разделения которого получены [146]: 3'-фосфат (выход 36%), 5'-фосфат (18,5%) и 3',5'-дифосфат (24%).

В результате аналогичного фосфорилирования аденозина образуется смесь нуклеозид-2',5'- и нуклеозид-3',5'-дифосфатов. В этом случае для удаления бензильных групп наряду с гидрогенолизом используются анионный обмен (при действии хлорида лития) и щелочной гидролиз [147]. Ионообменная хроматография с применением градиентного элюирования позволяет разделить изомерные дифосфаты, которые можно охарактеризовать с помощью химического или ферментативного гидролиза [148]. Из той же реакционной смеси был выделен аденозин-2',3',5'-трифосфат; дезаминирование последнего приводит к инозин-2',3',5'-трифосфату [148]. Описано также прямое фосфорилирование аденозина 2-цианэтилфосфатом в присутствии дициклогексилкарбодиимида [237].

Другой метод синтеза смеси 2',5'- и 3',5'-дифосфатов аденозина состоит в действии на аденозин-2',3'-циклофосфат смешанного ангидрида бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот, в результате чего получается аденозин-(2',3'-циклофосфат)-5'-бензилфосфит вместе с полимерным продуктом. Хлорирование фосфита и затем щелочной гидролиз в мягких условиях приводят к адено-

зин-(2',3'-циклофосфат)-5'-бензилфосфату. После щелочного гидролиза с последующим гидрогенолизом (или наоборот) через промежуточно образующийся аденозин-2'(или 3')-фосфат-5'-бензилфосфат (или через 2',3'-циклофосфат-5'-фосфат) получается смесь дифосфатов [149]. Аденозин-2'(3'),5'-дифосфаты были получены также фосфорилированием аденозин-2',3'-циклофосфата дибензилхлорфосфатом (с последующим гидрогенолизом) или цианэтилфосфатом в присутствии дициклогексилкарбодиимида (с последующей обработкой щелочью) [150]. Кроме того, этот последний метод использовался для синтеза гуанозин-2'(3'),5'-дифосфата из гуанозин-2',3'-циклофосфата [137].

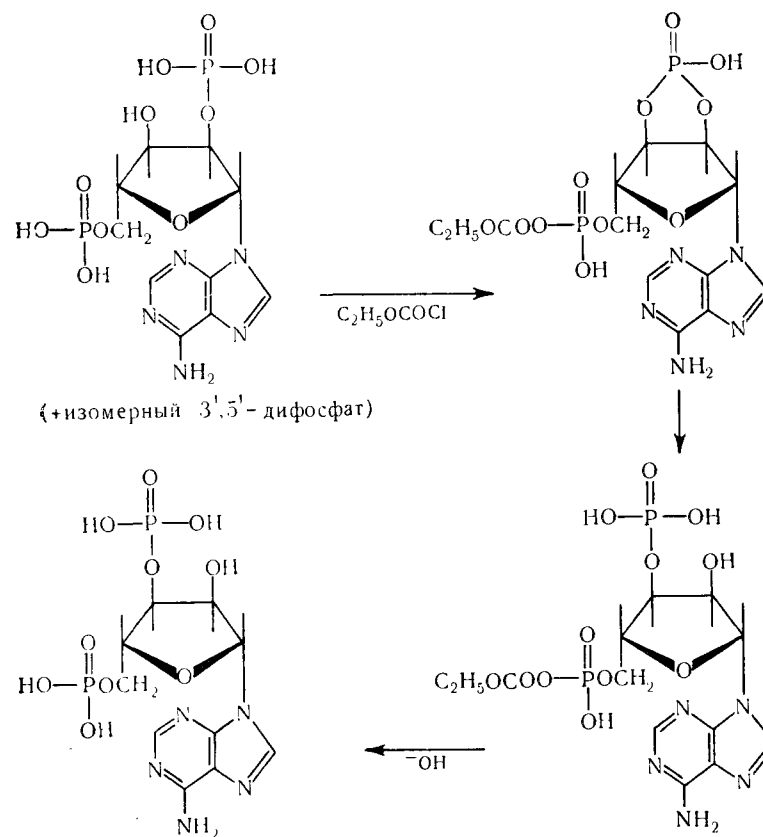


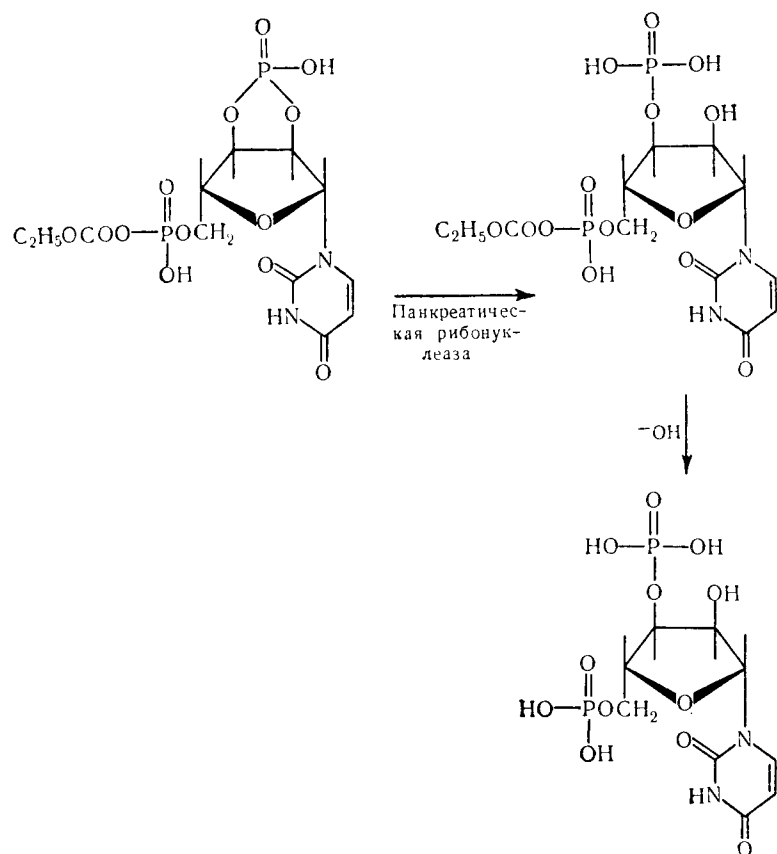


Удобным методом получения пиримидиновых рибонуклеозид-2',5'- и рибонуклеозид-3',5'-дифосфатов является непосредственная обработка нуклеозида полифосфорной кислотой. Как сообщалось впервые [109], из уридина и цитидина в результате такой реакции образуются значительные количества $O^2,2'$ -циклонуклеозид-3',5'-дифосфатов (и, следовательно, арабинозильные производные) [151]. Соответствующее видоизменение условий реакции позволяет избежать этого побочного процесса [110].

Применение ферментов для избирательного раскрытия цикла в 2',3'-циклофосфатных производных позволяет легко превратить смесь нуклеозид-2',5'- и нуклеозид-3',5'-дифосфатов в нуклеозид-3',5'-дифосфат. Так, например, аденозин-2'(3'),5'-дифосфат при обработке в водном растворе хлоругольным эфиром и в присутствии основания количественно превращается в смешанный ангидрид этилугольной и аденозин-(2',3'-циклофосфат)-5'-фосфорной кислот. Последний в результате обработки змеиным ядом или, еще лучше, рибонуклеазой T2 (для разрыва циклофосфата до 3'-фосфата) и последующего щелочного гидролиза ангидридной связи (в условиях, исключающих миграцию 2'- или 3'-фосфатной группы) превращается исключительно в аденозин-3',5'-дифосфат. Подобным образом обрабатываются аналогичные пиримидиновые соединения: при

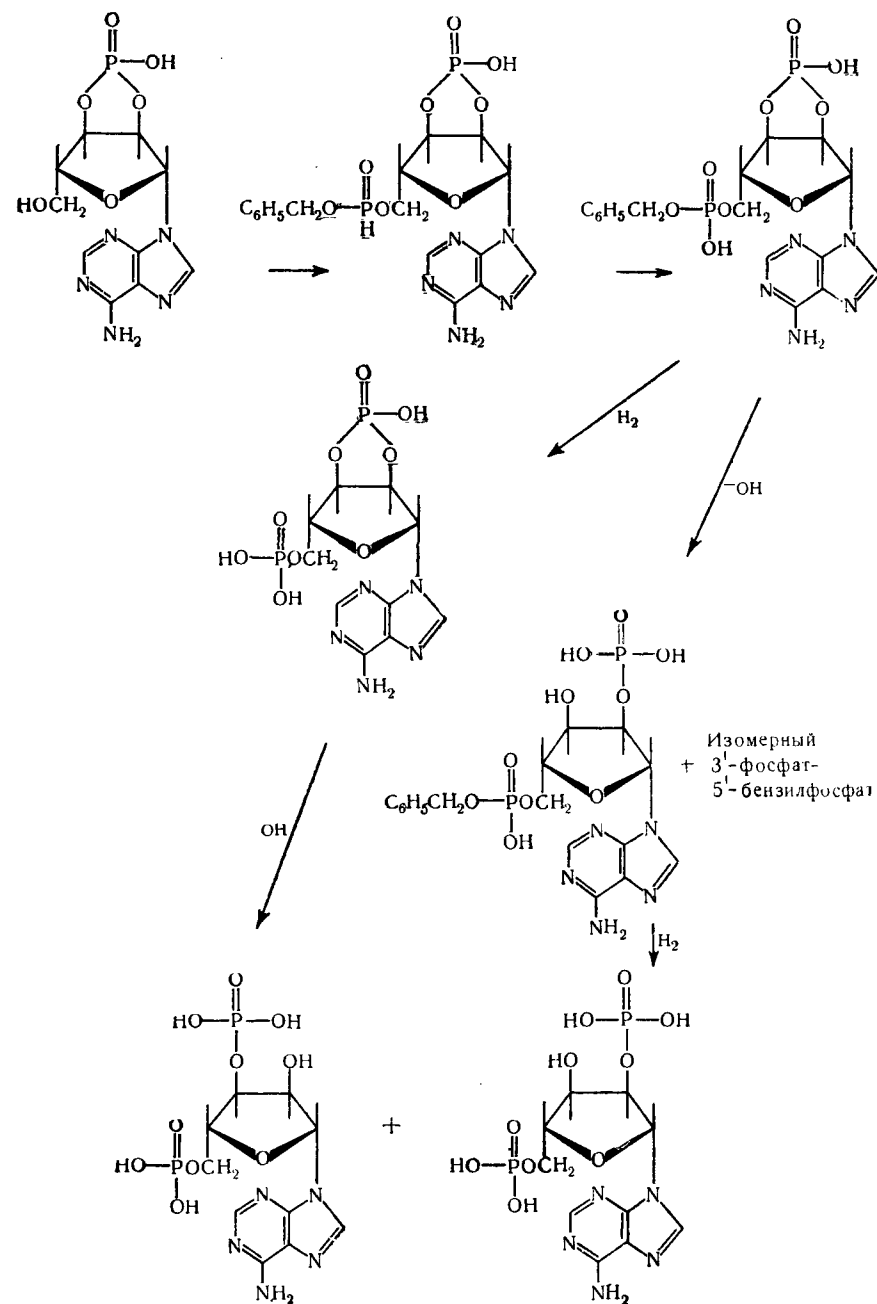
гидролизе смешанного ангидрида нуклеозид-(2',3'-циклофосфат)-5'-фосфата и этилугольной кислоты панкреатической рибонуклеазой с последующей обработкой щелочью образуется уридин-3',5'- (или цитидин-3',5'-)дифосфат, не содержащий примеси изомерного 2',5'-дифосфата [152]. Для синтеза чистых нуклеозид-2',5'-дифосфатов должны быть использованы другие ферменты.





ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-3'- И ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-5'-ФОСФАТЫ

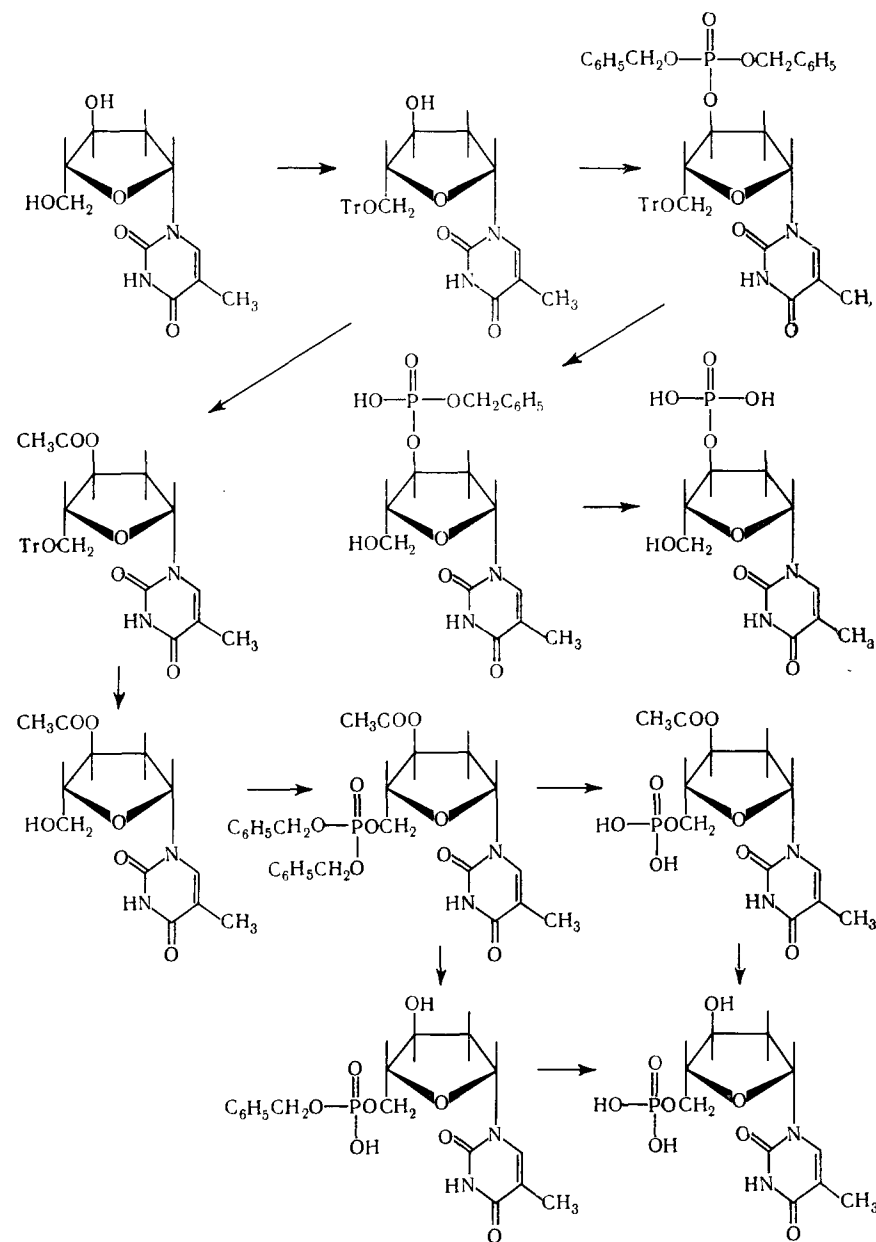
При фосфорилировании 5'-О-тритилтимидина дибензилхлорфосфатом с последующим кислотным гидролизом в мягких условиях получается тимидин-3'-бензилфосфат, из которого после удаления бензильной группы образуется тимидин-3'-фосфат. Для синтеза изомерного 5'-фосфата из 3'-О-ацетил-5'-О-тритилтимидина удаляют тритильную группу; образующийся при этом 3'-О-ацетилтимидин после фосфорилирования и последующей щелочной обработки превращается в тимидин-5'-бензилфосфат. Из последнего обычным образом получают тимидин-5'-фосфат [153]. Аналогичные серии реакций приводят к дезоксицитидиновым мононуклеотидам. Для синтеза 5'-фосфата исходили из N⁶,3'-О-диацетил-2'-дезоксцитидина.

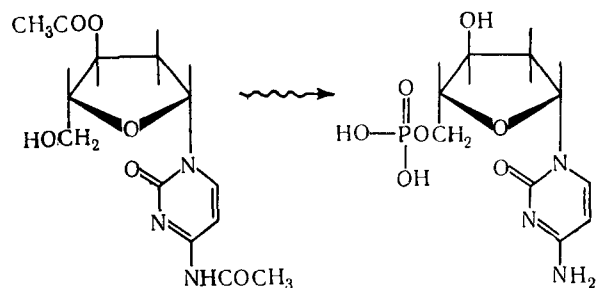


Кроме того, тимидин-5'-фосфат получается при обработке 3'-О-ацетил-5'-иод-5'-дезокситимидина дибензилфосфатом серебра; защитные группы удалялись обычным образом [155].

Пуриновые дезоксирибонуклеозиды синтезировали в основном методами, аналогичными методам синтеза пиримидиновых соединений. При частичном ацетилировании 2'-дезоксаденозина (или лучше, 3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксаденозина) была получена смесь ацетатов, из которой с помощью противоточного распределения были выделены два моноацетата. Эти соединения сравнивали с 3'-О-ацетилдезоксаденозином, полученным более трудоемким путем, заключавшимся в ацетилировании 5'-О-тритил-2'-дезоксаденозина с последующим удалением тритильной группы гидрогенолизом (неустойчивость гликозидной связи в пуриновых дезоксинуклеозидах ограничивает использование кислотного гидролиза). Таким образом, моноацетат, полученный с меньшим выходом, был идентифицирован как 3'-О-ацетилдезоксаденозин, и, следовательно, другой изомер был 5'-О-ацетилдезоксаденозином. Фосфорилирование 3'-О-ацетилдезоксаденозина дибензилхлорфосфатом привело к дибензилфосфату, из которого под действием раствора аммиака в метиловом спирте удалялись ацетильная и одна бензильная группа и был получен 2'-дезоксаденозин-5'-бензилфосфат. В результате гидрогенолиза в буферном (pH 7) водном растворе (чтобы избежать разрыва гликозидной связи) образуется дезоксаденозин-5'-фосфат. Фосфорилирование 5'-О-ацетилдезоксаденозина дибензилхлорфосфатом осуществить не удалось; однако при обработке этого ацетата более сильным реагентом — смешанным ангидридом бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот образуется 3'-бензилфосфит, после превращения которого в бензилфосфат с последующим удалением защитных групп был получен дезоксаденозин-3'-фосфат [156].

При синтезе соответствующих фосфатов дезоксигуанозина исходными соединениями служат изомерные моноацетаты, полученные также частичным деацетилированием 3',5'-ди-О-ацетил-2'-дезоксигуанозина или частичным ацетилированием дезоксигуанозина. Моноацетаты дезоксигуанозина были идентифицированы непосредственным сравнением моноацетилдезоксирiboзы, выделенной при кислотном гидролизе ацилированного нуклеозида в мягких условиях, с моноацетилдезоксирiboзами, полученными аналогичным образом из 3'-О-ацетилдезоксаденозина и 5'-О-ацетилдезоксаденозина. Каждый моноацетил-(3' или 5')-дезоксигуанозин затем обрабатывали ангидридом бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот, и полученные продукты превращались в соответствующие нуклеотиды [156]. Эти наиболее ранние однозначные синтезы дезоксинуклеотидов послужили окончательным доказательством строения соединений, выделенных из природного сырья.

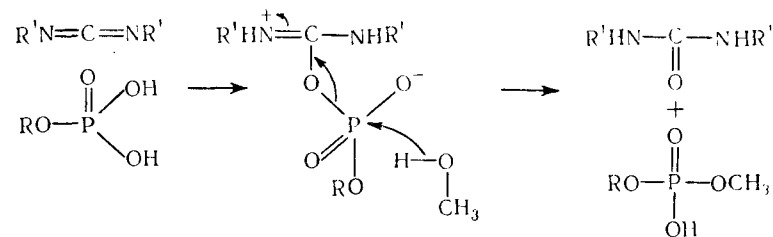
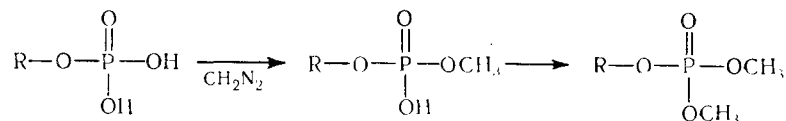




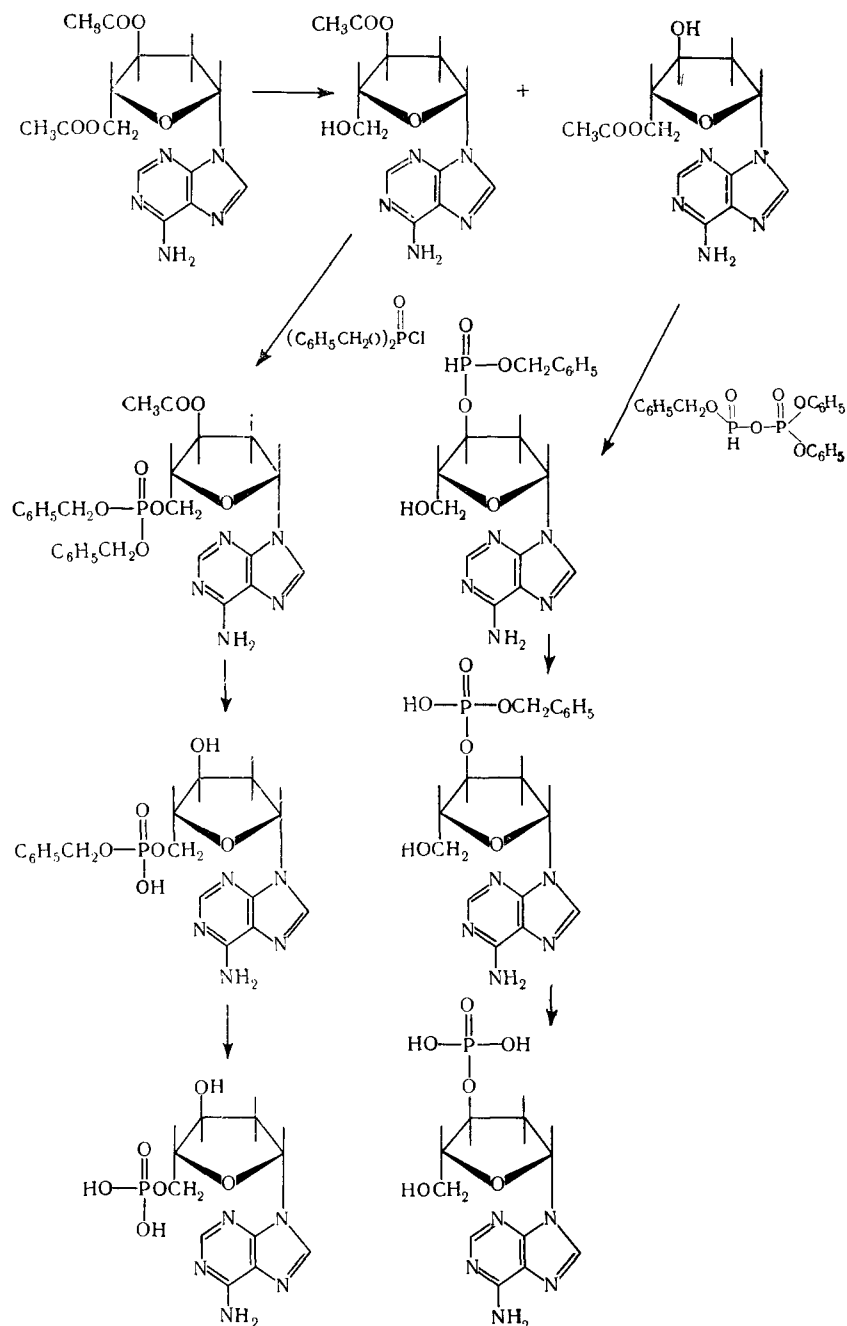
Tr = трифенилметил

АЛКИЛОВЫЕ ЭФИРЫ НУКЛЕОТИДОВ

Выше обсуждались монобензиловые эфиры нуклеозид (и дезокси-нуклеозид)-5'-фосфатов, являющиеся промежуточными продуктами при синтезе нуклеотидов. Аналогичным образом фосфорилированием 2',3'-О-изопропилиденнуклеозидов дифенил-, диэтил- и дибутилхлорфосфатами были получены соответственно фениловые, этиловые и бутиловые эфиры 9-β-D-рибофуранозил-6-меркапто-пурин-5'-фосфата и 8-азагуанозин-5'-фосфата. После удаления изопропильного остатка обработкой кислотой в мягких условиях образуются диэфиры нуклеотидов, которые после щелочного гидролиза превращаются в нуклеозид-5'-моноалкил(или фенил)фосфаты [157]. Обработка нуклеотида фенилдиазометаном также позволяет получить бензиловые эфиры; сам диазометан дает аналогичные мети-

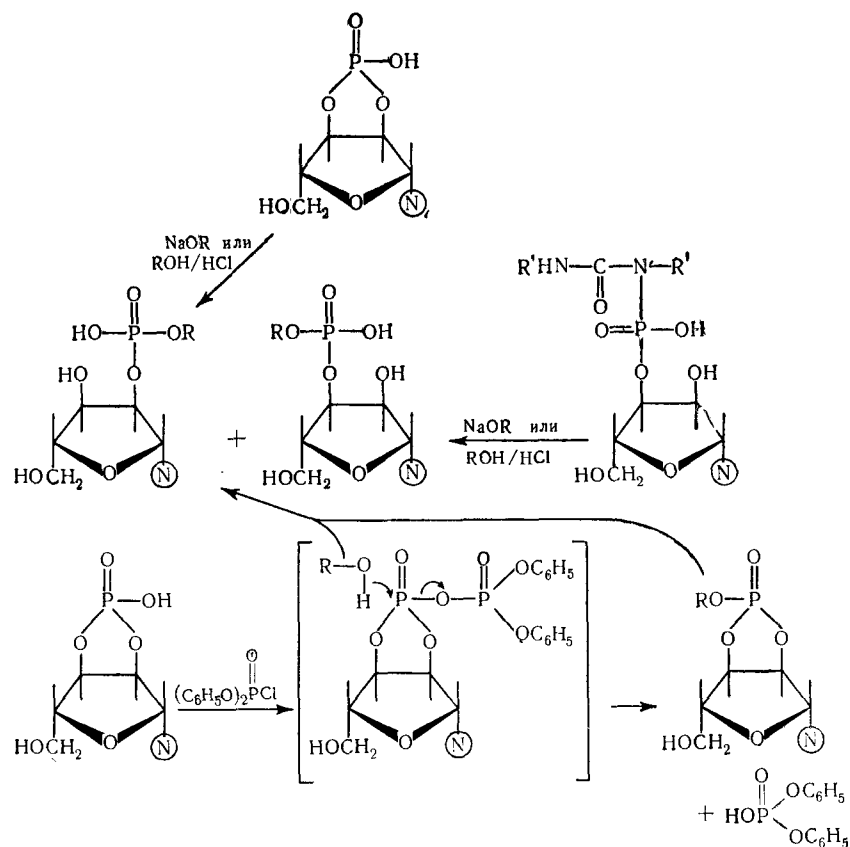


R = нуклеозид - 5'



ловые эфиры [158]. Другой путь синтеза 5'-алкиловых эфиров состоит в обработке смеси спирта и нуклеозида карбодиимидом; несмотря на слабый нуклеофильный характер спиртов по сравнению с фосфат-ионами, большой избыток спирта обеспечивает эффективную атаку образующегося аддукта нуклеотида и карбодиимида [159].

Вышеописанные методы можно использовать также и для получения эфиров дезоксинуклеозид-3'-фосфатов, а реакция с диазометаном применима к рибонуклеозид-2'- и рибонуклеозид-3'-фосфатам [158, 160]. Этерификация нуклеозид-2',3'-циклофосфатов первичными спиртами, катализируемая как основаниями [138, 161], так и кислотами (последняя предпочтительней) [162, 163], приводит к смеси нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-алкилфосфатов. Такой этерификации подвергается и нуклеотидмочевина, получающаяся при действии на мононуклеотид дициклогексилкарбодиимида во влаж-

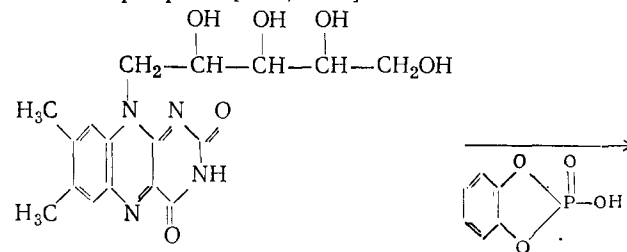


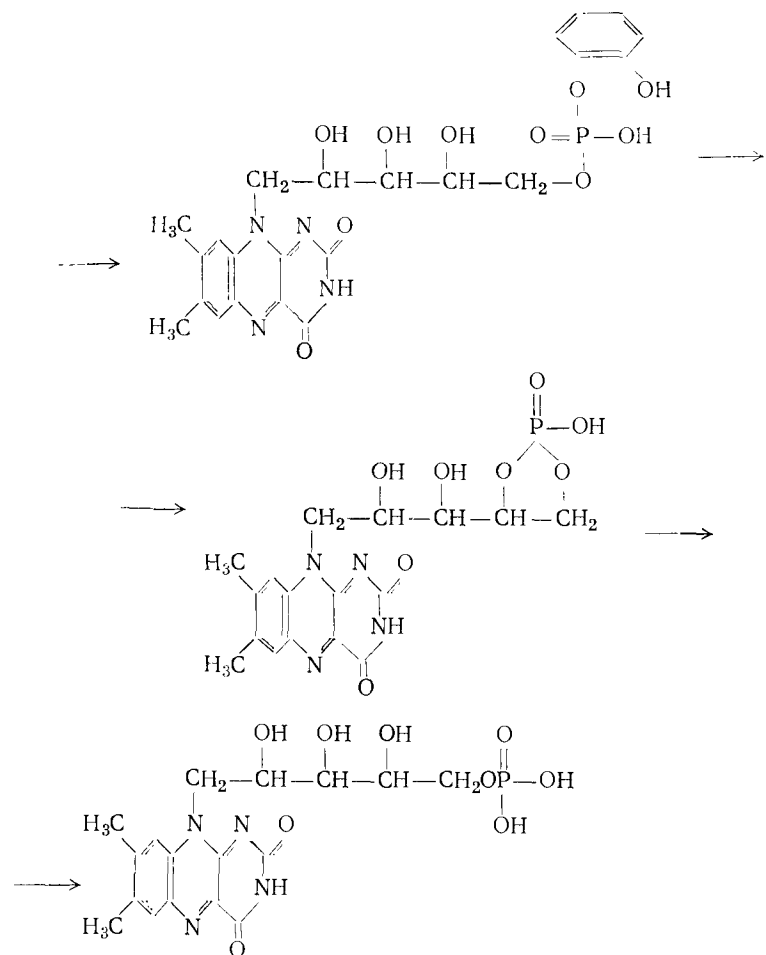
(N) = пуриновое или пиримидиновое основание

ном пиридине. Кроме того, 2'- и 3'-алкилфосфаты удобно получать, если подействовать избытком спирта на смешанный ангидрид нуклеозид-2',3'-циклофосфата и дифенилфосфорной кислоты [164].

ДРУГИЕ ФОСФОРИЛИРУЮЩИЕ АГЕНТЫ

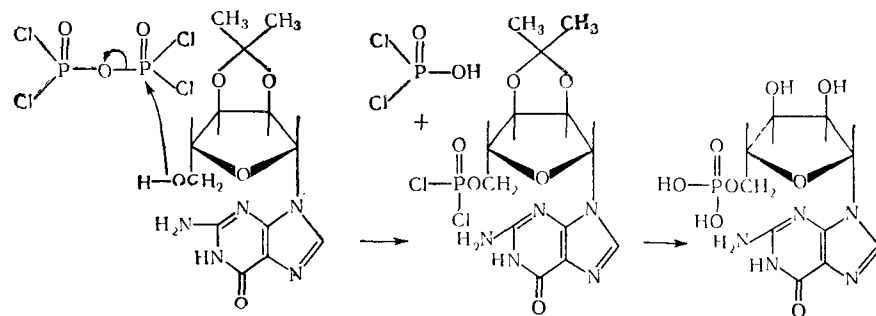
Как уже указывалось во введении к настоящему разделу, синтез нуклеотидов заключается в обработке защищенного нуклеозида подходящим фосфорилирующим агентом. Помимо упомянутых выше реагентов, с несколько меньшим успехом был использован также фенилдихлорфосфат [92, 165]. В результате фосфорилирования 5'-О-тритилтимидина *n*-нитрофенилдихлорфосфатом получается 3'-фосфат с более высоким выходом, чем при использовании относительно мягкого реагента — дибензилхлорфосфата. Так как в результате щелочной обработки тимидин-3'-*n*-нитрофенилфосфата, кроме 3'-фосфата, образуется и 5'-фосфат (через промежуточный 3',5'-циклофосфат), приходится удалять *n*-нитрофенильный остаток в щелочной среде до снятия тритильной группы [166]. Синтез рибофлавин-5'-фосфита (из которого после окисления перманганатом калия получен фосфат) был проведен обработкой рибофлавина 2-хлор-5,6-бензо-1,3,2-диоксафосфорином-4 в феноле; этот реагент, возможно, окажется ценным и в случае нуклеотидов [167]. Кроме того, рибофлавин можно перевести в 5'-фосфит обработкой дифенилхлорфосфитом в феноле [168]. Другими фосфорилирующими агентами, которые еще не использовались, но могут оказаться полезными, являются диморфолидфосфобромид [169] (диморфолидфосфохлорид использовали для фосфорилирования 2',3'-изопропилиден-N¹-метилуридина [170]; защитные группы удаляли обработкой кислотой в мягких условиях) и циклофосфат гидробензоина [171]. В результате алкоголиза последнего реагента (алкоголиз катализируется трифторуксусной кислотой) образуется алкильное производное 1,2-дифенил-2-оксизтил-1-фосфата, из которого каталитическим гидрогенолизом получается алкилфосфат. Алкоголиз в присутствии хлористого водорода дает сразу алкилфосфат [171]. Алкоголиз циклофосфата катехола оказался эффективным методом фосфорилирования для получения ряда фосфатов полиспиртов, в том числе и рибофлавин-5'-фосфата [172, 173].





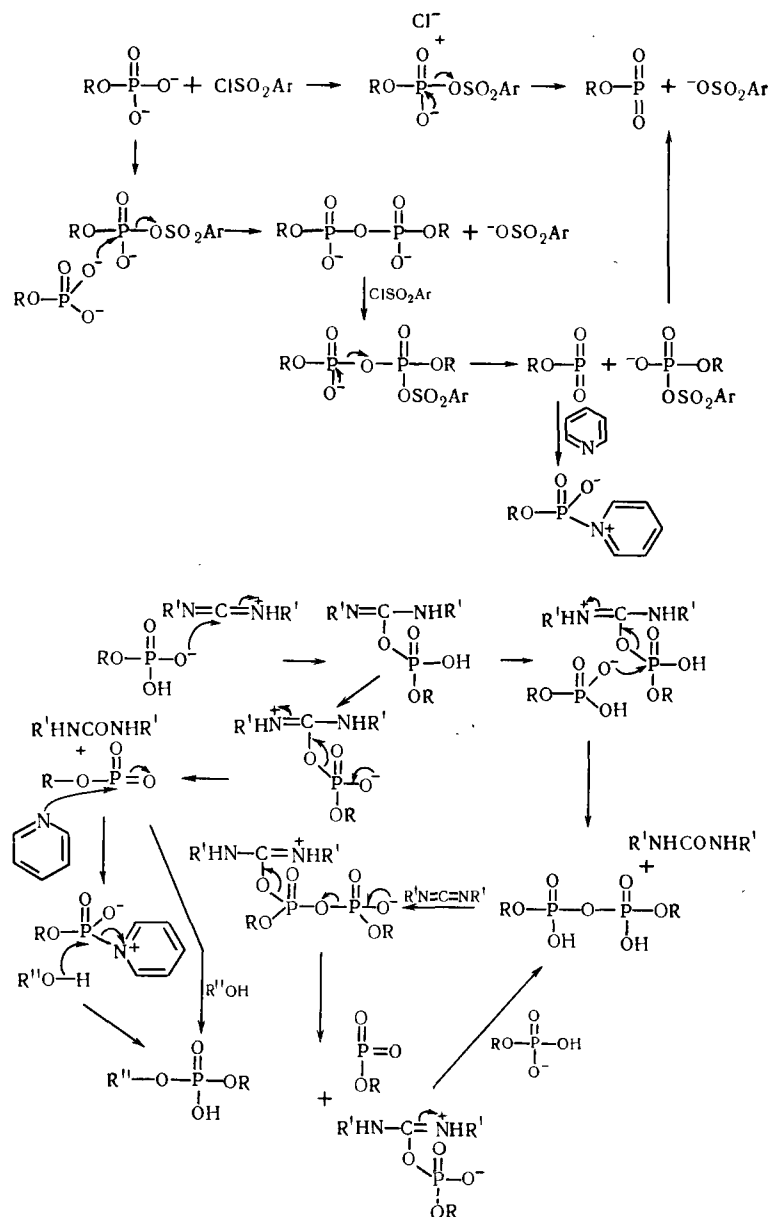
Прекрасным фосфорилирующим агентом является ангидрид дихлорфосфорной кислоты [174, 175]. Обработка 2',3'-изопропилденгуанозина избытком этого реагента приводит к дихлорфосфорной кислоте и нуклеозид-5'-дихлорфосфату; при мягком гидролизе последнего с высоким выходом образуется гуанозин-5'-фосфат. Аналогичным образом был получен аденозин-5'-фосфат [174].

С хорошим выходом нуклеотиды были получены при использовании ди-(β -цианэтил)хлорфосфата. При мягкой обработке промежуточно образующегося триэфира водным раствором гидроксида бария элиминируются две молекулы акрилонитрила и получается



моноэфир [176]. Другие методы фосфорилирования, основанные на использовании енолфосфатов [177, 178], гуанидинфосфатов [179] и хинонфосфатов (в присутствии окислителей) [180] требуют дальнейшей разработки.

В основном реагенты и методы, описанные до сих пор, относятся к общему классу, в котором фосфорилирование осуществляется либо фосфорилий-катионом, образующимся в результате ионизации, либо в результате нуклеофильной атаки атома фосфора с одновременным освобождением устойчивого аниона [143]. В ряде методов фосфорилирования, разработанных в последнее время и относящихся ко второму общему классу, действующим фосфорилирующим агентом служит, по всей вероятности, производное мономерного метафосфата. Следует отметить, что этилметафосфат (полимерный), введенный [181] в качестве фосфорилирующего агента еще в 1910 г., не нашел широкого применения для фосфорилирования производных углеводов [182]. Очень вероятно, что при использовании в качестве фосфорилирующего агента хлорокси фосфора подлинным фосфорилирующим агентом является не дихлорфосфорная кислота, а производное метафосфата, если использовать раствор хлорокси фосфора в пиридине в присутствии одного эквивалента воды [143]. Этим методом с успехом были синтезированы рибофлавин-5'-фосфат [142] и 5-фтор-2'-дезоксигуанидин-5'-фосфат [183]. Даже использование более сильных фосфорилирующих агентов включает образование эфиров мономерного метафосфата [143]. Последние легко получают при обработке моноэтерифицированного фосфата хлорангидридом очень сильной кислоты (таким, как *n*-толуолсульфонилхлорид [184], в результате чего образуется промежуточный смешанный ангидрид, который распадается затем с образованием аниона сильной кислоты и алкил(арил)метафосфата [145]. С другой стороны, взаимодействие моноэтерифицированного фосфата с избытком дициклогексилкарбодиимида в пиридине приводит сначала к P^1, P^2 -диэфиру пиродифосфорной кислоты, который

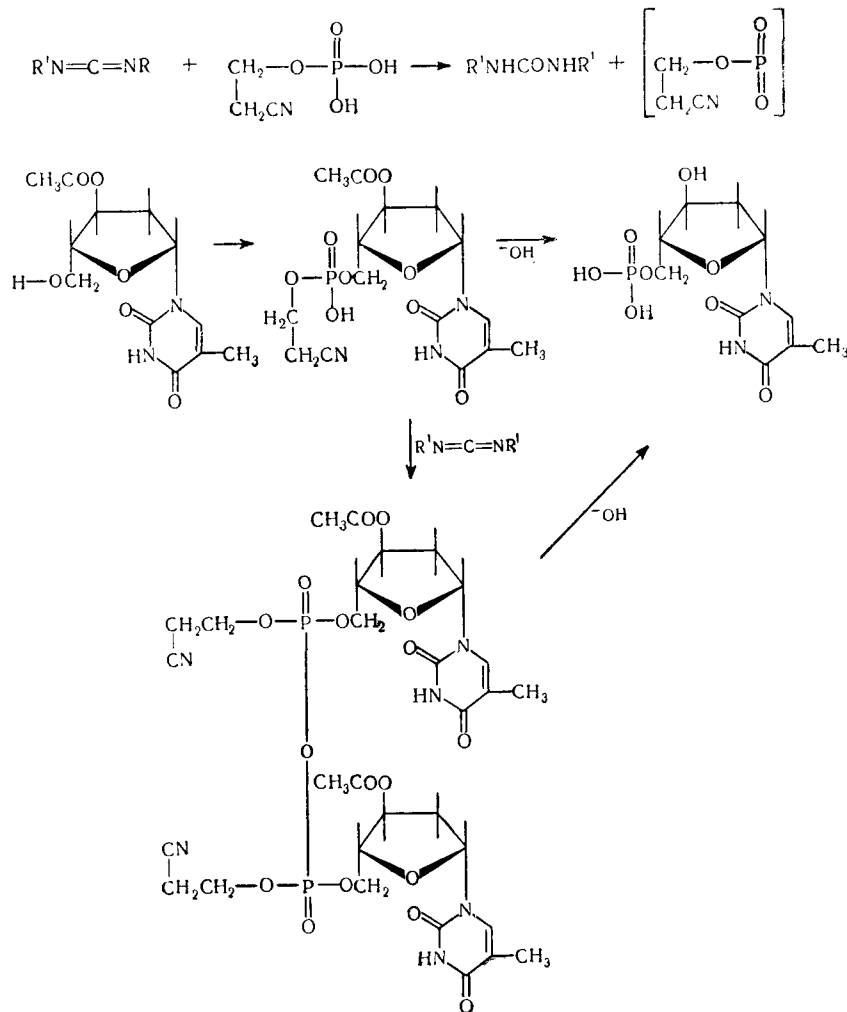


реагирует далее с карбодиимидом с образованием пирофосфата псевдомочевины, разлагающейся затем с освобождением эфира мономерного метафосфата [143]. При обычно создаваемых условиях (большой избыток дициклогексилкарбодиимида) можно предполагать непосредственное образование из промежуточного аддукта «мономерного метафосфата», который в последующей реакции с пиридином дает фосфопиридиниевое производное (комплекс основание — метафосфат), являющееся фосфорилирующим агентом. Желательно (но совершенно не обязательно) при этом отсутствие сильного основания (такого, как три-*n*-бутиламин), так как сильное основание препятствует присоединению протона к карбодиимиду. Кроме того, следует учитывать значительно более слабый нуклеофильный характер P^1, P^2 -диалкил (или арил)пирофосфатов по сравнению с моноэтерифицированным фосфатом, что в присутствии сильного основания также сильно сказывается на течении реакции.

Экспериментальным доказательством приведенных выше заключений до некоторой степени служит факт безуспешных попыток синтезировать P^1, P^2 -диэфир пирофосфорной кислоты, в котором одна из фосфорных кислот значительно сильнее другой. Хотя последние соединения, несомненно, образуются, добавление воды приводит всегда к выделению метафосфата [187].

Эффективность этого метода для синтеза нуклеотидов была продемонстрирована на примерах фосфорилирования с высоким выходом вторичных гидроксильных групп нуклеозида, которые обычно устойчивы при фосфорилировании мягкими реагентами. Так, при обработке 5'-О-тримитилтимидина монобензилфосфатом и дициклогексилкарбодиимидом в безводном пиридине и последующем удалении защитных групп образуется тимидин-3'-фосфат [185, 186]. Более подходящим реагентом является метафосфат, полученный из β -цианэтилфосфата. Образующиеся при этом полностью этерифицированные пирофосфаты разлагаются при добавлении в пиридиновый раствор воды, а β -цианэтильная группа легко удаляется при обработке щелочью; нуклеотиды образуются обычно с высоким выходом. Таким путем при действии дициклогексилкарбодиимида и β -цианэтилфосфата на защищенный нуклеозид были синтезированы тимидин-3'-фосфат, тимидин-5'-фосфат и гуанозин-5'-фосфат [185, 186]. Этот же метод был использован и для синтеза 6-тиогуанозин-5'-фосфата, 6-тиоинозин-5'-фосфата [188, 189] и 8-азагуанозин-5'-фосфата [189]. Кроме того, этим путем можно осуществлять фосфорилирование ди-(дезоксинуклеозид)фосфатов. С помощью β -цианэтилфосфата в присутствии карбодиимида были получены 5'-фосфотимидил-3':5'-тимидин-3'-фосфат из тимидил-3':5'-тимидина и тимидил-3':5'-тимидин-3'-фосфат из 5'-О-тримитилтимидил-3':5'-тимидина [186].

Нуклеозидфосфиты легко образуются в результате взаимодействия защищенного нуклеозида с фосфористой кислотой (равноценной моноалкилфосфату в отношении диссоциации) и ди-*n*-толилкарбодиимидом в безводном пиридине [190]. При окислении фосфитов пуриновых нуклеозидов перманганатом калия получается нуклеотид. Получить таким путем пиримидиновые нуклеотиды не удастся из-за расщепления гетероциклического кольца. Интересно отметить, что при введении в реакцию незащищенного дезокси-нуклеозида в случае тимидина образуется главным образом

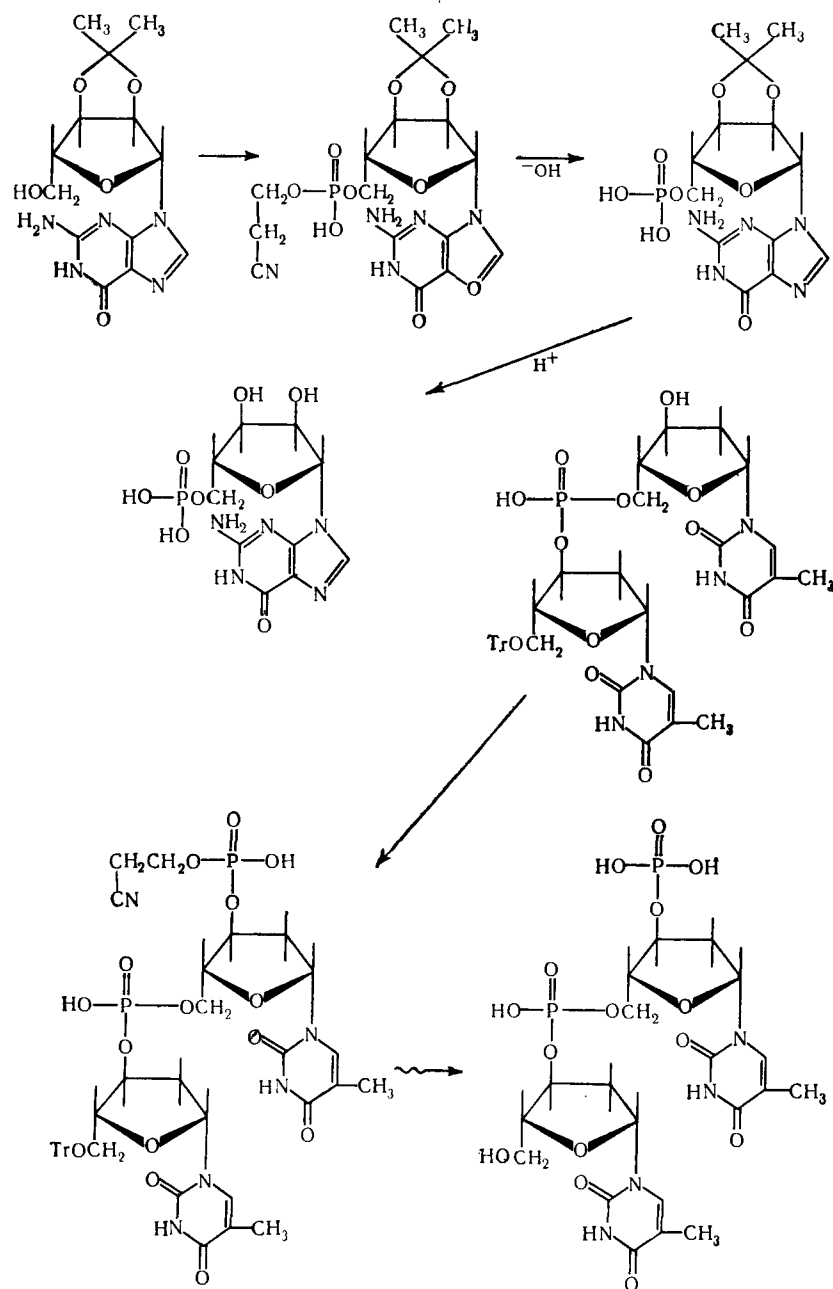


3'-фосфит (43% 3'- и 24% 5'-производного), в то время как с дезоксиаденозином образуется больше 5'-(42%), чем 3'-фосфита (29%). В соответствии с утверждением, что фосфорилирующие свойства моноэфиров фосфатов в присутствии карбодиимидов обязаны образованию «мономерного метафосфата», находится факт, что монобензилфосфит (равноценный диалкилфосфату, не способному образовывать «метафосфат») в присутствии ди-*n*-толилкарбодиимида является очень плохим реагентом для введения фосфитной группы. Механизм реакции, вероятно, заключается в образовании «мономерного метафосфита» (HPO_2) и аналогичен механизму, имеющему место при использовании моноалкилфосфатов карбодиимидов в приблизительно стехиометрических количествах [190].

Следует отметить, что смесь ди-*n*-толилкарбодиимида и фосфорной кислоты в пиридине не проявляет значительных фосфорилирующих свойств, вероятно, потому, что метафосфат остается в диссоциированном состоянии [190]. Однако меченные P^{32} нуклеозид-5'-фосфаты были получены с небольшим выходом при введении в реакцию с три-*n*-бутиламмониевой солью фосфорной- P^{32} кислоты и дициклогексилкарбодиимидом 2',3'-изопропилиденнуклеозида, взятого в огромном (285 молей) избытке [191]. Значительно более эффективное фосфорилирование стехиометрического количества нуклеозида фосфорной кислотой и дициклогексилкарбодиимидом может быть осуществлено при использовании моно(метилтри-*n*-октиламмониевой) соли фосфорной кислоты [137]. Большая длина цепи жирного амина, вероятно, препятствует в значительной степени диссоциации, и фосфорная кислота ведет себя как моноалкилфосфат.

В литературе имеются сообщения о прямой этерификации спиртов фосфатами, активированными трихлорацетонитрилом [192, 193] и хлорангидридом циануровой кислоты [194]. Для проведения реакции, однако, требуются довольно жесткие условия, и в противоположность карбодиимидам эти реагенты не взаимодействуют с диэтерифицированными фосфатами, карбоновыми кислотами и водой. При обработке 2',3'-О-изопропилиденаденозина фенилфосфорной кислотой и трихлорацетонитрилом в пиридине образуется 5'-фенилфосфат [192, 193]. Фосфорная кислота и трихлорацетонитрил были с успехом использованы для синтеза фарнезилфосфата и пиррофосфата [195].

Наконец, очень ценными реагентами для фосфорилирования анионов и, в частности, для синтеза пиррофосфатов, оказались фосфоамиды. В некотором отношении их можно рассматривать как комплексы основание — метафосфат [143]. Несомненно, что подходящие фосфоамиды окажутся эффективными для фосфорилирования спиртов. Действительно, реакция между аденозин-5'-фосфоморфолидом и метанолом, катализируемая кислотой, приводит к образованию метилового эфира аденозин-5'-фосфата [196, 197].



Недавно при изучении реакций фосфорилирования диэфирами имидазолилфосфорной кислоты и моноэфирами диимидазолилфосфиновой кислоты было установлено, что при взаимодействии 2',3'-О-изопропилиденаденозина с диимидазолилфосфиновой кислотой образуется 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-фенилфосфат [198].

АНАЛОГИ НУКЛЕОТИДОВ

Алkil- и арилфосфатные аналоги аденозин-5'-фосфата и уридин-5'-фосфата были получены при взаимодействии 2',3'-О-изопропилиденнуклеозида с этил(или фенил)бензилхлорфосфатом с последующим снятием изопропилиденовой и бензильной групп [199].

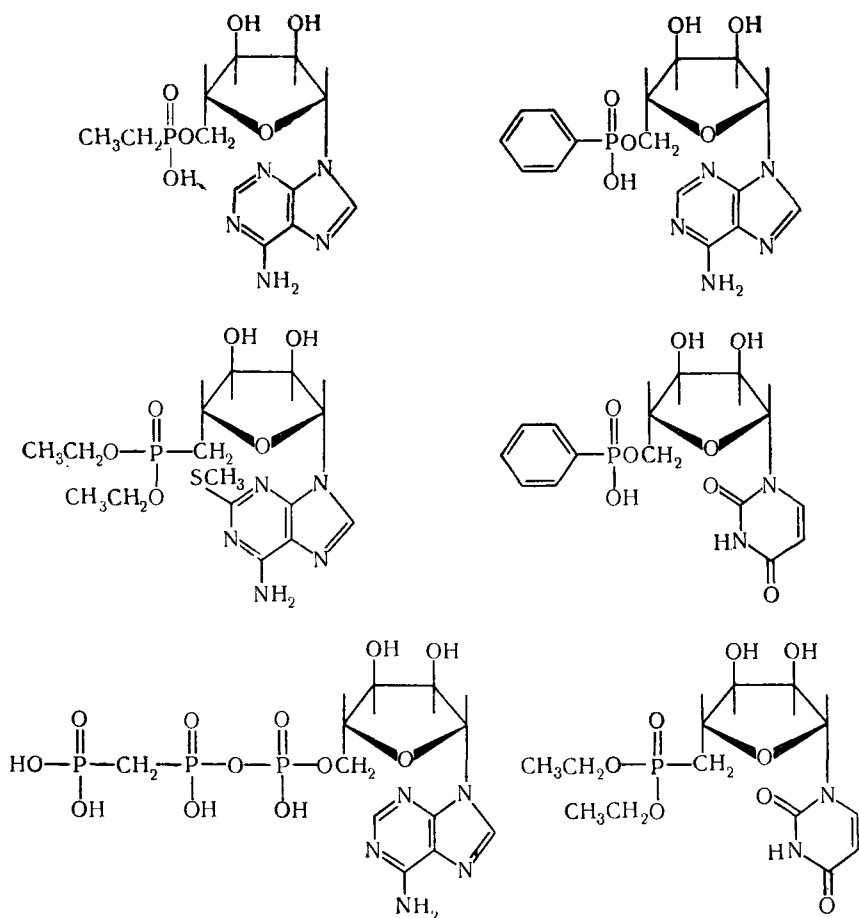
Получение аналогов, в которых атом углерода нуклеозида непосредственно связан с фосфором, представляет значительно более сложную задачу. Однако применение метода синтеза пуриновых нуклеозидов, включающего образование шифова основания с 2-метилтио-4,6-диаминопиримидином, позволило получить из 5-дезоксид-рибозо-5'-диэтилфосфоната 9-(5'-дезоксид-5'-диэтилфосфонат-β-D-рибофуранозил)-6-амино-2-метилтиопурин [200, 201]. Диэтиловый эфир 5'-дезоксидуридин-5'-фосфоната образуется по реакции Михаэлиса — Арбузова между 2',3'-изопропилиден-5'-дезоксид-5'-иодуридином и триэтилфосфитом с последующим удалением изопропилиденового остатка [202].

Благодаря использованию соответствующих фосфорилирующих агентов были синтезированы диэтилтиофосфатное и алkil(или арил)-диметиламидофосфатное производные аденозина [203].

Обработка аденозина хлорсульфоновой кислотой (ClSO₃H) приводит к трисульфозамещенному нуклеозиду; аналогичным образом из 2',3'-О-изопропилиденового производного аденозина получен аденозин-5'-сульфат [204, 240]. Аналогичные методы использовались для синтеза сульфозэфиров цитидина [238]. В отличие от 5'-фосфата цитидин-5'-сульфат легко гидролизует кислотой.

При фосфорилировании соответствующих замещенных 9-β-D-глюкопиранозиладенина были получены его 2'-, 3'-, 4'- и 6'-фосфаты (а также 4',6'-циклофосфат) [205]. 2'-, 3'- и 4'-Фосфаты не изомеризовались в тех условиях, которые вызывают взаимопревращения 2'- и 3'-фосфатов рибонуклеозидов. (Здесь интересно отметить, что из листьев хлопчатника был выделен глюкозиладенинфосфат [206], но структура его пока не установлена.)

Описан аналог аденозин-5'-трифосфата, аденилил-5'-метиленидифосфоновая кислота [207]. Другие аналоги представляют собой фосфаты и полифосфаты, являющиеся производными 6-дезоксидуридина, 9-β-D-рибофуранозил-6-диметиламинопурина и 9-β-D-рибофуранозил-6-метиламинопурина [165, 208]. Получены также моно-, пиро- и трифосфатные производные 9-оксиалkil-6-аминопурин



(4'-оксибутил, 3'-оксипропил и 2'-оксиэтил), причем для синтеза монофосфатов была использована «полифосфорная» кислота [208, 209].

СВОЙСТВА НУКЛЕОТИДОВ

Обычные методы классической органической химии имеют лишь ограниченное применение для характеристики нуклеотидов (и в действительности могут привести к ошибочным выводам). Эти методы были заменены такими, как хроматография на бумаге, инфракрасная и ультрафиолетовая спектроскопия и рентгеноструктурный анализ (рентгенография порошков). Нуклеотиды, представляющие

собой нуклеозидные эфиры фосфорной кислоты, обладают многими из свойств нуклеозидов, включая образование N-оксидов (для адениновых нуклеотидов) [210, 211], циклизацию соответствующих замещенных в циклонуклеозидфосфаты [164]; гетероциклическое кольцо в пиримидиновых нуклеотидах подвергается галогенированию [212—215] и восстановлению [35, 36]. При действии N-бромсукцинимид уридин-5'-фосфат легко превращается в 5-бромуридин-5'-фосфат [212], однако были разработаны более удобные общие методы галогенирования уридиновых нуклеотидов. Хлорирование уридин-2'(3' или 5')-фосфата легко осуществляется в результате кратковременной обработки хлором раствора нуклеотида в уксусной кислоте при комнатной температуре. При этом в небольшой степени происходит насыщение 4,5-двойной связи, но при нагревании такие промежуточные соединения превращаются в 5-хлоруридин-2'(3' или 5')-фосфат [214, 215]. Обработка свободного уридинового нуклеотида раствором брома в водном диоксane при комнатной температуре приводит к 5-бромзамещенному производному. Реакция протекает быстрее в присутствии небольших количеств азотной кислоты. Для получения 5-иодуридин-2'(3' или 5')-фосфата нуклеотид подвергается действию иода и разбавленной азотной кислоты в диоксane. Скорость реакции зависит от присутствия и диоксана, и азотной кислоты; так как в роли катализатора с достаточным успехом может выступить и сам нуклеотид, реакция, вероятно, протекает через промежуточный иоднитрат, образующийся при взаимодействии в диоксane иода и азотной кислоты [214, 215]. Эти же методы были использованы для галогенирования дезоксиуридина и его производных. Обработка уридин-5'-фосфата бромной водой в пиридине приводит к 5-оксиуридин-5'-фосфату [216].

Подтверждением существования водородных связей между пиримидиновым кольцом и кольцом сахара служит поведение различных пиримидиновых нуклеотидов при облучении растворов ультрафиолетовым светом с длиной волны 2537 Å [217, 218]. Облучение водных растворов нуклеотидов рентгеновскими лучами вызывает ряд реакций, в том числе с участием свободных радикалов молекулы воды [219]. Вследствие наличия неустойчивых эфиров фосфорной кислоты [220] освобождается аммиак, а при расщеплении гликозидной связи в адениловой и гуаниловой кислотах образуются свободные основания [219, 221]; после облучения растворов гуанозина и гуаниловой кислоты пучком электронов с энергией 15 Мэв был обнаружен 2,4-диамино-5-формамидо-6-оксипиримидин [221].

Влияние фосфатного остатка легко проследить по изменению таких физических свойств, как ультрафиолетовое поглощение и константы диссоциации оснований; особенно полно это влияние выявляется при исследовании оптического вращения и инфракрасных спектров поглощения. Неоднократно уже наблюдалось влияние

фосфатной группы на устойчивость гликозидной связи в нуклеотидах при кислотном гидролизе. Этот эффект зависит как от расположения, так и от числа фосфорных остатков [222]; очень большое влияние оказывают 3',5'-циклофосфатные группы [77, 78]. Гликозидная связь в 2',3'-О-изопропилиден-9-β-D-рибофуранозилпурин-5'-фосфате более устойчива, чем в соответствующем 5'-дибензиловом эфире [223].

Взаимодействие соседних гидроксильной и фосфорной групп сказывается в том, что (подобно фосфатам сахаров) [224] мононуклеотиды представляют собой значительно более сильные кислоты по сравнению с моноалкилфосфатами. Как видно из значений pK глицерофосфатов (табл. 3-2), очень важным фактором является расположение гидроксильных групп.

Таблица 3-2
КОНСТАНТЫ ДИССОЦИАЦИИ ФОСФОРНЫХ ГРУПП

Соединение	pK_1	pK_2	Соединение	pK_1	pK_2
Адениловая кислота	~0,9	6,1	Дипропилфосфат . .	1,59	—
Цитидиловая кислота	~0,8	6,3	α-Глицерофосфат . .	1,40	6,44
Гуаниловая кислота	~0,7	6,1	β-Глицерофосфат . .	1,37	6,34
Уридиловая кислота	~1,0	6,4	Глюкозо-6-фосфат . .	0,94	6,11
Метилфосфат	1,54	6,31	Глюкозо-3-фосфат . .	0,84	5,67
Пропилфосфат	1,88	6,67	Амид фосфорной кислоты	0,9	2,8
Фосфорная кислота	1,97	6,82			
Диметилфосфат . . .	1,29	—			

Наличие взаимодействия, скорее всего образование водородной связи между *цис*-гидроксильной группой и фосфорным остатком, ясно видно из сравнения соответствующих рибонуклеозид- и дезоксирибонуклеозид-3'-фосфатов. Из поведения их при хроматографии на анионообменной смоле следует, что первые — значительно более сильные кислоты и что смеси таких нуклеотидов (например, цитидин-3'-фосфата и дезоксцитидин-3'-фосфата) могут быть легко разделены. В противоположность этому соответствующие рибонуклеозид- и дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты имеют близкие характеристики [67, 154].

Образование цвиттер-иона (наиболее выраженное в амиде фосфорной кислоты) оказывает также влияние на значения первичных констант диссоциации фосфорных групп в мононуклеотидах. Увеличение силы кислоты в значительной степени зависит от близости заряженных групп. Что касается анионообменной хроматографии,

то ионизация групп, обладающих основными свойствами (а возможно и другие факторы, такие, как молекулярный объем и форма), наряду с кислотными значениями pK определяет относительные коэффициенты распределения нуклеотидов при различных pH [44]. Эфиры нуклеотидов (включая циклофосфаты) — более сильные кислоты, чем свободные нуклеотиды при тех значениях pH , когда диссоциация вторичных гидроксильных групп подавлена; однако при pH 7 аденозин-2',3'-циклофосфат элюируется с ЭКТЕОЛА раньше 2'(или 3')-фосфата [136].

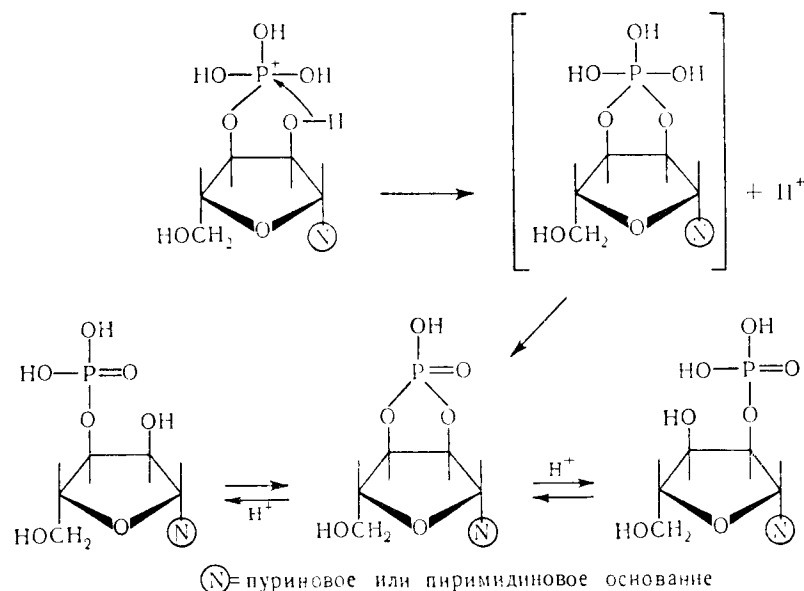
В результате щелочного или нейтрального [225] гидролиза рибонуклеотидов (катализируемого ионами металла) образуются соответствующие нуклеозиды и фосфорная кислота. Освобождению фосфорной кислоты при кислотном гидролизе ($pH \sim 1$), вероятно, предшествует разрыв гликозидной связи, после чего образуется неустойчивый фосфат сахара*, расщепляющийся затем дальше [226]. Так как пиримидиновые гликозиды значительно более устойчивы, чем соответствующие пуриновые соединения, фосфорная кислота при кислотном гидролизе освобождается значительно медленнее в случае цитидиловой и уридиловой кислот, чем адениловой и гуаниловой (а также 4,5-дигидропиримидиннуклеотидов). Однако при pH 4 механизм гидролиза иной и включает прямой разрыв связи $P—O$ при отсутствии расщепления гликозидной связи и без заметной миграции фосфорного остатка [148]. Для определения расположения фосфатных групп в аденозин-2',5'-дифосфате и аденозин-3',5'-дифосфате оказался полезным гидролиз в аммонийно-форминатном буфере; при гидролизе 2',5'-изомера образуется аденозин, аденозин-2'-фосфат, аденозин-5'-фосфат и лишь в очень незначительном количестве аденозин-3'-фосфат. Структура этих синтетических дифосфатов была подтверждена при помощи моноэстеразы, специфически расщепляющей 3'-фосфоэфирную связь в аденозин-3',5'-дифосфате.

Ферментативное дефосфорилирование нуклеотидов может быть осуществлено как неспецифическими моноэстеразами (например, выделенными из предстательной железы), так и моноэстеразами, специфичными для определенным образом расположенных фосфатных групп (например, 5'-нуклеотидаза змеиного яда). Специфичность может быть и более выраженной; дезоксинуклеозид-3'-фос-

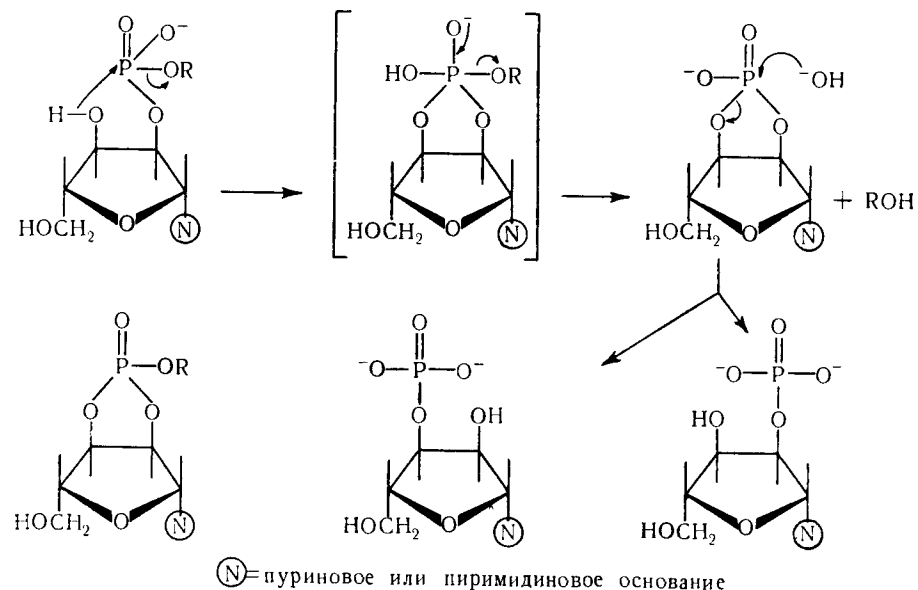
* В результате более легкого освобождения фосфорного остатка из рибозо-2- или рибозо-3-фосфата (эфирная связь находится в α- или β-положении к альдегидной группе), чем из рибозо-5-фосфата, имеет место значительное дефосфорилирование производных пуриновых нуклеотидов, содержащих 2'- или 3'-фосфоэфирные связи (например, в РНК) в условиях, являющихся стандартными при определении кислотолабильного фосфора (полифосфатной природы). Это не всегда учитывается в исследованиях.

фаты не изменяются под действием 3'-рибонуклеотидазы (они также относительно устойчивы в присутствии гидроокиси церия) [67].

Несмотря на то что нуклеозид-5'-фосфаты и их эфиры не проявляют тенденции к изомеризации, рибонуклеозид-2'- и рибонуклеозид-3'-фосфаты легко превращаются в равновесную смесь в кислой среде. Эта катализируемая кислотами миграция протекает через стадию промежуточного образования 2',3'-циклофосфата [47] и аналогична превращению глицеро- α - и глицеро- β -фосфатов в равновесную смесь [227—229].



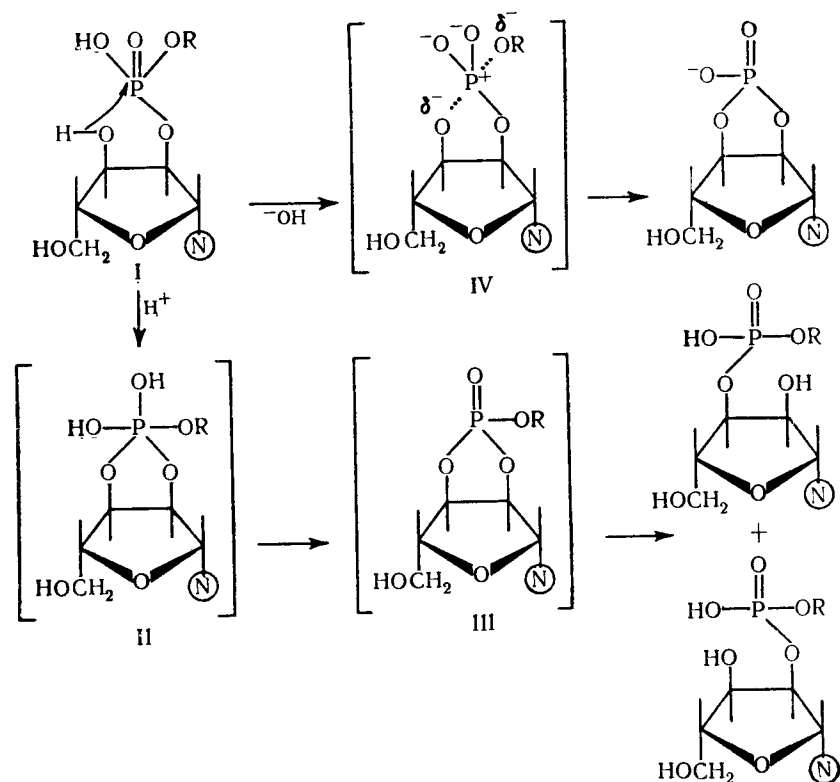
В щелочной среде изомерные мононуклеотиды, подобно глицеромонофосфатам, не претерпевают взаимопревращения. Однако обработка щелочью алкиловых эфиров рибонуклеозид-2' (или 3')-фосфатов приводит к смеси изомерных мононуклеотидов, образующихся при кислотном гидролизе [52, 158]. При этом, вероятно, происходит атака атома фосфора соседней гидроксильной группой, которая катализируется гидроксильными или водородными ионами. Одновременно происходит отщепление алкильной группы в виде алкоксианиона, протекающее, возможно, через стадию переходного пятиковалентного комплекса, в результате чего образуется промежуточный циклофосфат [52, 158, 230]. Щелочной гидролиз дрожжевой рибонуклеиновой кислоты в воде, меченной O^{18} , показывает, что образования промежуточных простых циклотриэфиров



не происходит, так как получаются мононуклеотиды, которые содержат один атом O^{18} (но не два атома) на атом фосфора [230].

Кислотный гидролиз этерифицированных рибонуклеозид-2' (или 3')-фосфатов, вероятно, проходит через стадию симметричного переходного состояния (тип II или III), так как при частичном гидролизе цитидин-3'-бензилфосфата в непрогидролизованном диэфире было найдено значительное количество изомерного 2'-бензилфосфата. С другой стороны, при частичном щелочном гидролизе не происходит миграции бензилфосфатной группы, на основании чего промежуточным переходным состоянием можно считать несимметричное соединение IV [231].

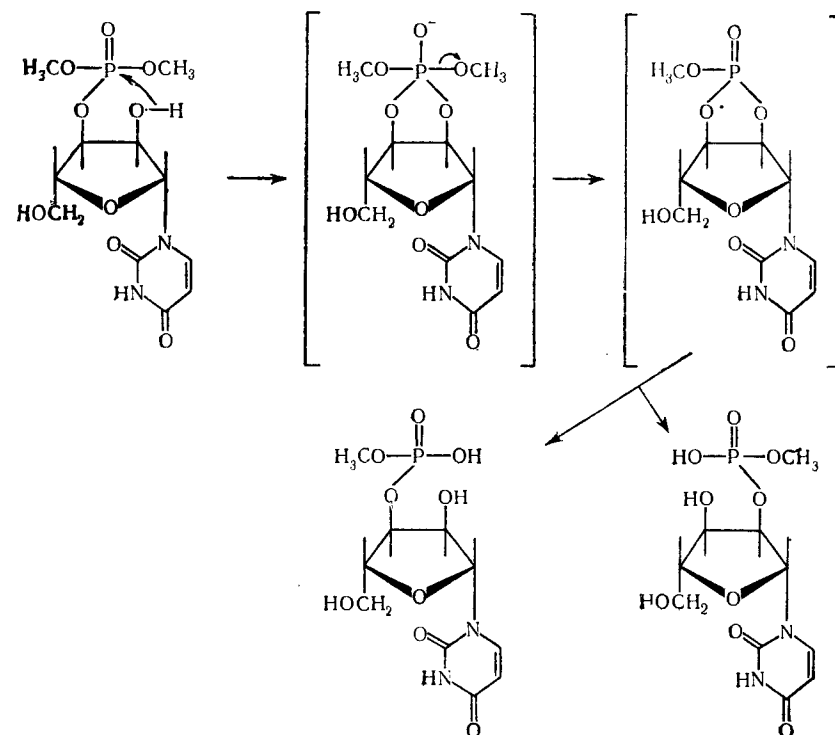
Гидролиз простых эфиров (метилового, этилового, бензилового) пиримидиннуклеозид-3'-фосфатов рибонуклеазой поджелудочной железы состоит в однонаправленном расщеплении промежуточного 2',3'-циклофосфата лишь до 3'-фосфата [158]. На пуриновые соединения этот фермент не действует, однако при помощи других специфических диэстераз они превращаются в свободные нуклеотиды [232]. Уже выделены родственные ферменты, которые не действуют на эфиры нуклеотидов, но расщепляют 2',3'-циклофосфаты с образованием исключительно 2'-фосфата [233]. Первая стадия гидролиза с помощью панкреатической рибонуклеазы обратима, и ферментативная реакция переэтерификации пиримидиннуклеозид-2',3'-циклофосфатов, осуществляемая в присутствии первич-



(N) = пуриновое или пиримидиновое основание

ных спиртов (включая нуклеозиды и нуклеозид-2',3'-циклофосфаты), приводит к образованию пиримидиннуклеозид-3'-алкилфосфата [161, 234]. Подобная обратимость доказана в катализируемой фосфодиэстеразой селезенки реакции замещения бензильной группы в цитидин-3' (или аденозин-3')-бензилфосфате на метильную или этильную группы. Гидролиз ферментом селезенки не проходит через 2',3'-циклофосфат (такие синтетические промежуточные соединения превращаются в 2'-фосфаты), но и здесь реакция является скорее прямой Perezтерификацией, чем синтезом. За перенос фосфорного остатка, очевидно, ответственно имидазольное ядро гистидинового остатка фермента [235].

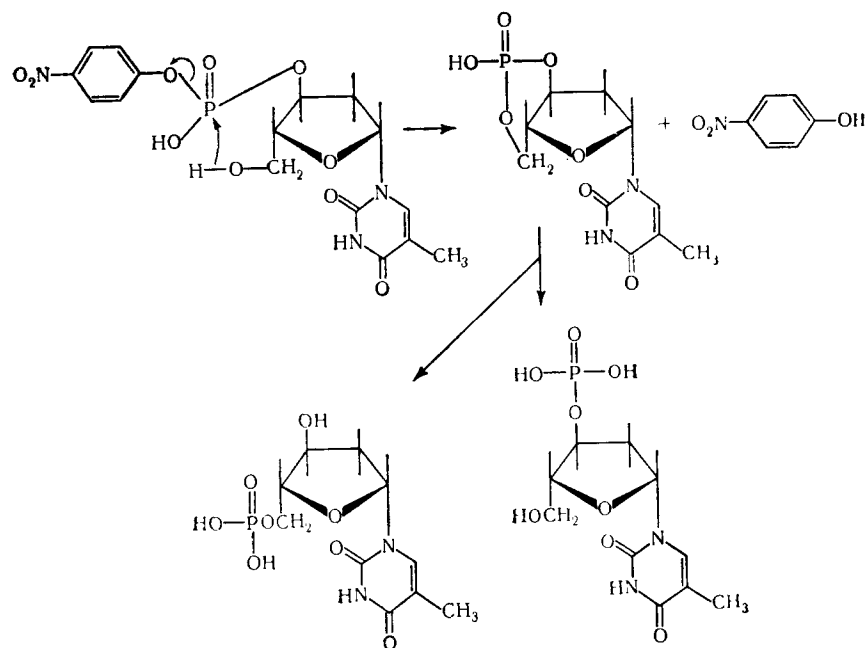
Диметилловый или дибензиловый эфир уридин-3'-фосфата (и, возможно, других рибонуклеозид-2'- и рибонуклеозид-3'-фосфатов) неустойчив при любом pH и превращается в смесь уридин-2'- и уридин-3'-фосфатов, содержащую в незначительных количествах



2',3'-циклофосфат [160]. В противоположность этому диэфиры нуклеозид-5'-фосфатов проявляют обычные свойства триэфиров фосфорной кислоты, причем ясно, что в первом случае соседняя гидроксильная группа участвует в образовании промежуточного циклического соединения.

Изучение синтеза пантотеин-2',4'-циклофосфата из пантолуктон-2-дифенилфосфата показывает, что при Perezтерификации происходит образование шестичленной циклической системы. Аналогичные циклические фосфаты были идентифицированы в качестве промежуточных соединений при гидролизе эфиров дезоксинуклеозид-3'-фосфатов и, вероятно, могут образовываться в случае рибонуклеозидных производных, в которых удобно расположенная 2'-гидроксильная группа блокирована. Так, щелочной гидролиз тимидин-3'-*n*-нитрофенилфосфата, идущий через 3',5'-циклофосфат, образующийся в результате трансфосфорилирования, дает смесь тимидин-3'- и тимидин-5'-фосфатов [166].

Эфиры рибо(и дезоксирибо)нуклеозид-5'-фосфатов проявляют обычные свойства ди- или триэфиров фосфорной кислоты. При



кислотном или щелочном гидролизе нуклеозид-5'-добензилфосфата в мягких условиях образуется 5'-монобензилэфир, который относительно устойчив при дальнейшем гидролизе. Специфические диэстеразы, подобные тем, которые имеются в змеином яде, легко гидролизуют моноэфиры нуклеозид-5'-фосфатов до свободного нуклеотида [145].

Литература

- Levene P. A., Mandel H., Chem. Ber., 41, 1905 (1908).
- Liebig J. von. Ann., 62, 257 (1847).
- Doery H. M., Nature, 177, 381 (1956); 180, 799 (1957).
- Emden G., Zimmermann M., Z. physiol. Chem., 167, 137 (1927).
- Schmitz H., Hurlbert R. B., Potter V. R., J. Biol. Chem., 209, 41 (1954).
- Smith E. E. B., Mills G. T., Biochim. et Biophys. Acta, 13, 386 (1954).
- Segal H. L., Biochim. et Biophys. Acta, 21, 194 (1956).
- Osawa S., Allfrey V. G., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., 40, 491 (1957).
- Potter R. L., Schlesinger S., Buettner-Janusch V., Thompson L., J. Biol. Chem., 226, 381 (1957).
- Levene P. A., J. Biol. Chem., 33, 425 (1918); 40, 415 (1919).

- Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green C., Doniger R., Elson D., J. Biol. Chem., 186, 51 (1950).
- Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 71, 2275 (1949); 72, 1471, 2811 (1950).
- Cohn W. E., Volkin E., Nature, 167, 483 (1951).
- Cohn W. E., Volkin E., Arch. Biochem. Biophys., 35, 465 (1952).
- Volkin E., Khym J. X., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 73, 1533 (1951).
- Hurst R. O., Little J. A., Butler G. C., J. Biol. Chem., 188, 705 (1951).
- Sinsheimer R. L., Koerner J. F., J. Biol. Chem., 198, 293 (1952).
- Klein W., Z. physiol. Chem., 218, 164 (1933).
- Klein W., Thannhauser S. J., Z. physiol. Chem., 218, 173 (1933); 224, 252 (1934); 231, 96 (1935).
- Cunningham L., J. Am. Chem. Soc., 80, 2546 (1958).
- Levene P. A., Mandel H., Chem. Ber., 41, 1905 (1908).
- Dekker C. A., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1953, 947.
- Cohn W. E., Volkin E., Biochim. et Biophys. Acta, 24, 359 (1957).
- Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, 23, 451 (1957).
- Levene P. A., Jacobs W. A., Chem. Ber., 44, 746 (1911).
- Levene P. A., Mori T., J. Biol. Chem., 81, 215 (1929).
- Levene P. A., Stiller E. T., J. Biol. Chem., 104, 299 (1934).
- Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1949, 2476.
- Schmidt G., Z. physiol. Chem., 179, 243 (1928).
- Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., 73, 1537 (1951).
- Lythgoe B., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1944, 592.
- Paladini A. C., Leloir L. F., Biochem. J., 51, 426 (1952).
- Klimek R., Parnas J. K., Biochem. Z., 292, 356 (1937).
- Volkin E., Khym J. X., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 73, 1533 (1951).
- Cohn W. E., Doherty D. G., J. Am. Chem. Soc., 78, 2863 (1956).
- Caputto R., Leloir L. F., Cardini C. E., Paladini A. C., J. Biol. Chem., 184, 333 (1950).
- Horn P., Luzzati V., Trueblood K. N., Nature, 183, 880 (1959).
- Kraut J., Jensen L. H., Nature, 186, 798 (1960).
- Levene P. A., Harris S. A., J. Biol. Chem., 95, 755 (1932); 98, 9 (1932).
- Levene P. A., Harris S. A., J. Biol. Chem., 101, 419 (1933).
- Bredereck H., Berger E., Chem. Ber., 73, 1124 (1940).
- Carter C. E., Cohn W. E., Federation Proc., 8, 190 (1949).
- Cohn W. E., Science, 109, 377 (1949).
- Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 72, 1471, 2811 (1950).
- Cohn W. E., J. Cellular Comp. Physiol., 38, (S1), 21 (1951).
- Loring H. S., Luthy N. G., Bortner H. W., Levy L. W., J. Am. Chem. Soc., 72, 2811 (1950).
- Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 44.
- Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 72, 1471 (1950).
- Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., 72, 1466 (1950).
- Brown D. M., Haynes L. J., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1950, 3299.
- Brown D. M., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 2708.
- Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 52.

53. Brown D. M., Dekker C. A., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 2715.
54. Shuster L., Kaplan N. O., J. Biol. Chem., 201, 535 (1953).
55. Khyrn J. X., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 76, 1818 (1954).
56. Khyrn J. X., Doherty D. G., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., 76, 5523 (1954).
57. Brown D. M., Fasman G. D., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1954, 1448.
58. Cavalieri L. F., J. Am. Chem. Soc., 75, 5268 (1953).
59. Fox J. J., Cavalieri L. F., Chang N., J. Am. Chem. Soc., 75, 4315 (1953).
60. Harris R. J. C., Orr S. F. D., Roe E. M. F., Thomas J. F., J. Chem. Soc., 1953, 489.
61. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1954, 34.
62. Baron F., Brown D. M., J. Chem. Soc., 1955, 2855.
63. Green M., Cohen S. S., J. Biol. Chem., 225, 397 (1957); 228, 601 (1958).
64. Brown D. M., Todd A. R., Varadarajan S., J. Chem. Soc., 1956, 2388.
65. Brown D. M., Fasman G. D., Magrath D. I., Todd A. R., Cochran W., Woolfson M. M., Nature, 172, 1184 (1953).
66. Alver E., Furberg S., Acta Chem. Scand., 11, 188 (1957).
67. Cunningham L., J. Am. Chem. Soc., 80, 2546 (1958).
68. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., 52, 552 (1952).
69. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 52.
70. Lipkin D., Talbert P. T., Chem. and Ind., 1955, 143.
71. Tanaka K., J. Biochem. (Japan), 47, 398 (1960).
72. Cook W. H., Lipkin D., Markham R., J. Am. Chem. Soc., 79, 3607 (1957).
73. Rall T. W., Sutherland E. W., J. Biol. Chem., 232, 1065 (1958); Sutherland E. W., Rall T. W., J. Biol. Chem., 232, 1077 (1958).
74. Haynes R. C., Koritz S. B., Peron F. G., J. Biol. Chem., 234, 1421 (1959).
75. Peron F. G., J. Biol. Chem., 236, 1764 (1961).
76. Lipkin D., Cook W. H., Markham R., J. Am. Chem. Soc., 81, 6198 (1959).
77. Tener G. M., Khorana H. G., Markham R., Pol E. H., J. Am. Chem. Soc., 80, 6223 (1958).
78. Smith M., Drummond G. I., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 83, 698 (1961).
79. Cohn W. E., Volkin E., Nature, 167, 483 (1951); J. Biol. Chem., 203, 319 (1953).
80. Levene P. A., Jacobs W. A., J. Biol. Chem., 12, 411 (1912).
81. Levene P. A., J. Biol. Chem., 126, 63 (1938).
82. Thannhauser S. J., Ottenstein B., Z. physiol. Chem., 114, 39 (1921).
83. Thannhauser S. J., Blanco G., Z. physiol. Chem., 161, 116 (1926).
84. Fischer E., Chem. Ber., 47, 3193 (1914).
85. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 106, 113 (1934).
86. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 111, 313 (1935).
87. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., 121, 131 (1937).
88. Gulland J. M., Smith H., J. Chem. Soc., 1948, 1527.
89. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1949, 2476.
90. Chambers R. W., Moffat J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 79, 3747 (1957).

91. Jachimowicz T., Biochem. Z., 292, 356 (1937).
92. Gulland J. M., Hobday G. I., J. Chem. Soc., 1940, 746.
93. Barker G. R., Gulland J. M., J. Chem. Soc., 1942, 231.
94. Barker G. R., Foll G. E., J. Chem. Soc., 1957, 3798.
95. Atherton F. R., Openshaw H. T., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1945, 382.
96. Brigl P., Müller H., Chem. Ber., 72, 2121 (1939).
97. Clark V. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1950, 2030.
98. Baddiley J., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1947, 648.
99. Magrath D. I., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., 79, 3252 (1957).
100. Atherton F. R., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1947, 674.
101. Mason H. S., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1951, 2267.
102. Hampton A., Maguire M. H., J. Am. Chem. Soc., 83, 150 (1961).
103. Smrt J., Beránek J., Šorm F., Collection Czechoslov. Chem. Commun., 25, 130 (1960).
104. Smrt J., Šorm F., Collection Czechoslov. Chem. Commun., 25, 553 (1960).
105. Corby N. S., Kenner G. W., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 3669.
106. Kenner G. W., Todd A. R., Weymouth F. J., J. Chem. Soc., 1952, 3675.
107. Andrews K. J. M., Barber W. E., J. Chem. Soc., 1958, 2768.
108. Church A. H., Proc. Roy. Soc., 13, 520 (1864).
109. Hall R. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 77, 1871 (1955).
110. Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1958, 1957.
111. Davoll J., in Anand N., Clark V. M., Hall R., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1952, 3665.
112. Kanazawa T., Tamura H., Sato T., Nippon Kagaku Zasshi, 79, 393 (1958).
113. Kanazawa T., Tamura H., Nozoe Y., Sato T., Nippon Kagaku Zasshi, 79, 698 (1958).
114. Brederick H., Berger E., Ehrenberg J., Chem. Ber., 73, 269 (1940).
115. Baker B. R., Joseph J. P., J. Am. Chem. Soc., 77, 15 (1955).
116. Tener G. M., Wright R. S., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 79, 441 (1957).
117. Wright R. S., Tener G. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 80, 2004 (1958).
118. Handschumacher R. E., Nature, 182, 1090 (1958).
119. Lieberman I., Kornberg A., Simms E. S., J. Biol. Chem., 215, 403 (1955).
120. Lukens L. N., Herrington K. A., Biochim. et Biophys. Acta, 24, 432 (1957).
121. Tener G. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., 80, 1999 (1958).
122. Way J. L., Parks R. E., J. Biol. Chem., 231, 467 (1958).
123. Dahl J. L., Way J. L., Parks R. E., J. Biol. Chem., 234, 2998 (1959).
124. Carter C. E., Cohen L. H., J. Biol. Chem., 222, 17 (1956).
125. Gulland J. M., Hobday G. I., J. Chem. Soc., 1940, 746.
126. Brederick H., Z. physiol. Chem., 224, 79 (1934).
127. Brederick H., Berger E., Chem. Ber., 73, 1124 (1940).
128. Barker G. R., J. Chem. Soc., 1954, 3396.
129. Gulland J. M., Smith H., J. Chem. Soc., 1947, 338; 1948, 1527, 1532.
130. Brederick H., Berger E., Chem. Ber., 73, 1124 (1940).
131. Gulland J. M., Overend W. G., J. Chem. Soc., 1948, 1380.

132. Smith M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **81**, 2911 (1959).
133. Harvey W. E., Michalski J. J., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1951**, 2271.
134. Forrest H. S., Mason H. S., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 2530.
135. Michelson A. M., Chem. and Ind., **1958**, 70.
136. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 3655.
137. Michelson A. M., неопубликованные данные.
138. Dekker C. A., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **76**, 3522 (1954).
139. Shugar D., Wierzchowski K. L., Bull. acad. polon. sci., **6**, 283 (1958).
140. Smith M., Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6204 (1958).
141. Tanaka T., Yakugaku Zasshi, **78**, 627 (1958).
142. Forrest H. S., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1950**, 3295.
143. Todd A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 1389 (1959).
144. Lipkin D., Markham R., Cook W. H., J. Am. Chem. Soc., **81**, 6075 (1959).
145. Michelson A. M., Tetrahedron, **2**, 333 (1958).
146. Hall R. H., Haselkorn R., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1138 (1958).
147. Cramer F., Kenner G. W., Hughes N. A., Todd A., J. Chem. Soc., **1957**, 3297.
148. Baddiley J., Buchanan J. G., Letters R., J. Chem. Soc., **1958**, 1000.
149. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1958**, 2055.
150. Michelson A. M., Biochem. et Biophys. Acta, **93**, 71 (1964).
151. Walwick E. R., Roberts W. K., Dekker C. A., Proc. Chem. Soc., **1959**, 84.
152. Michelson A. M., Biochem. et Biophys. Acta, **50**, 605 (1961).
153. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1953**, 951.
154. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1954**, 34.
155. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 816.
156. Hayes D. H., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 808.
157. Montgomery J. A., Thomas H. J., Schaeffer H. J., J. Org. Chem., **26**, 1929 (1961).
158. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1953**, 2040.
159. Smith M., Moffat J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6204 (1958).
160. Brown D. M., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 4396.
161. Barker G. R., Montague M. D., Moss R. J., Parsons M. A., J. Chem. Soc., **1957**, 3786.
162. Tener G. M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **77**, 5349 (1955).
163. Tanaka T., Yakugaku Zasshi, **78**, 627 (1958).
164. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 1371.
165. Ikehara M., Ohtsuka E., Ishikawa F., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **9**, 173 (1961).
166. Turner A. F., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4651 (1959).
167. Tanaka T., Yakugaku Zasshi, **79**, 437 (1959).
168. Tanaka T., Yakugaku Zasshi, **79**, 721 (1959).
169. Montgomery H. A. C., Turnbull J. H., Proc. Chem. Soc., **1957**, 178.
170. Кочетков Н. К., Будовский Е. И., Шибяев В. Н., Biochim. et Biophys. Acta, **53**, 415 (1961).

171. Ukita T., Nagasawa K., Irie M., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1373 (1958).
172. Nagasawa K., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **7**, 397 (1959).
173. Ukita T., Nagasawa K., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **7**, 401, 466 (1959).
174. Grunze H., Koransky W., Angew. Chem., **71**, 407 (1959).
175. Crofts P. C., Downie I. M., Heslop R. B., J. Chem. Soc., **1960**, 3673.
176. Witzel H., Mirbach H., Dimroth K., Angew. Chem., **72**, 751 (1960).
177. Cramer F., Gärtner K. G., Chem. Ber., **91**, 704 (1958).
178. Wasserman H. H., Cohen D., J. Am. Chem. Soc., **82**, 4435 (1960).
179. Morton R. K., Biochem. J., **70**, 150 (1958).
180. Clark V. M., Kirby G. W., Todd A. R., Nature, **181**, 1650 (1958).
181. Langheld K., Chem. Ber., **43**, 1857 (1910); **44**, 2076 (1911).
182. Schramm G., Grötsch H., Pollmann W., Angew. Chem., **73**, 619 (1961).
183. Farkas W. G., Iacono L. C., Duschinsky R., Abstracts IV International Congress of Biochemistry, Vienna, **1958**, 6.
184. Khorana H. G., Tener G. M., Moffatt J. G., Pol E. H., Chem. and Ind., **1956**, 1523.
185. Gilham P. T., Tener G. M., Chem. and Ind., **1959**, 542.
186. Tener G. M., J. Am. Chem. Soc., **83**, 159 (1961).
187. Brown D. M., Hamer N. K., J. Chem. Soc., **1960**, 1155.
188. Roy J. K., Kvam D. C., Dahl J. L., Parks R. E., J. Biol. Chem., **236**, 1158 (1961).
189. Montgomery J. A., Thomas H. J., J. Org. Chem., **26**, 1926 (1961).
190. Schofield J. A., Todd A., J. Chem. Soc., **1961**, 2316.
191. Straus D. B., Goldwasser E., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 186 (1961).
192. Cramer F. D., Weimann G., Chem. and Ind., **1960**, 46.
193. Cramer F., Baldauf H. J., Angew. Chem., **72**, 627 (1960).
194. Wittmann R., Cramer F., Angew. Chem., **73**, 220 (1961).
195. Cramer F., Böhm W., Angew. Chem., **71**, 775 (1959).
196. Chambers R. W., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3749 (1958).
197. Chambers R. W., Moffatt J. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3752 (1958).
198. Cramer F., Schaller H., Chem. Ber., **94**, 1634 (1961).
199. Anand N., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1951**, 1867.
200. Wolff M. E., Burger A., J. Am. Pharm. Assoc., **48**, 56 (1959).
201. Parikh J. R., Wolff M. E., Burger A., J. Am. Chem. Soc., **79**, 2778 (1957).
202. Bannister B., Kagan F., J. Am. Chem. Soc., **82**, 3363 (1960).
203. Wolff M. E., Burger A., J. Am. Chem. Soc., **79**, 1970 (1957).
204. Huber G., Chem. Ber., **89**, 2853 (1956).
205. Barker G. R., Foll G. E., J. Chem. Soc., **1957**, 3794.
206. Plaisted P. H., Reggio R. B., Nature, **193**, 685 (1962).
207. Flesher J. W., Oester Y. T., Myers T. C., Nature, **185**, 772 (1960).
208. Ikehara M., Ohtsuka E., Kitagawa S., Yagi K., Tonomura Y., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2679 (1961).
209. Ikehara M., Ohtsuka E., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **9**, 27 (1961).
210. Stevens M. A., Smith H. W., Brown G. B., J. Am. Chem. Soc., **81**, 1734 (1959).

211. Cramer F., Randerath K., *Angew. Chem.*, **70**, 571 (1958).
212. Michelson A. M., *J. Chem. Soc.*, **1958**, 1957.
213. Moore A. M., Anderson S. M., *Can. J. Chem.*, **37**, 590 (1959).
214. Letters R., Michelson A. M., *J. Chem. Soc.*, **1962**, 71.
215. Michelson A. M., Dondon J., Grunberg-Manago M., *Biochim. et Biophys. Acta*, **55**, 529 (1962).
216. Ueda T., *Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo)*, **8**, 455 (1960).
217. Shugar D., Wierzechowski K. L., *Biochim. et Biophys. Acta*, **23**, 657 (1957); **25**, 355 (1957).
218. Shugar D., Wierzechowski K. L., *J. Polymer Sci.*, **31**, 269 (1958).
219. Scholes G., Weiss J., *Biochem. J.*, **53**, 567 (1953).
220. Daniels M., Scholes G., Weiss J., *J. Chem. Soc.*, **1956**, 3771.
221. Hems G., *Nature*, **181**, 1721 (1958).
222. Shapiro H. S., Chargaff E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **26**, 596 (1957); **39**, 62 (1960).
223. Magrath D. J., Brown G. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3252 (1957).
224. Kumler W. D., Eiler J. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 2355 (1943).
225. Levene P. A., Jacobs W. A., *Chem. Ber.*, **42**, 335, 2469, 2474 (1909); **44**, 1027 (1911); *Biochem. Z.*, **28**, 127 (1910).
226. Bacher J. E., Allen F. W., *J. Biol. Chem.*, **182**, 701 (1950).
227. Bailly M. C., *Compt. rend.*, **208**, 443 (1939).
228. Verkade P. E., Stoppelenburg J. C., Cohen W. D., *Rec. trav. chim.*, **59**, 886 (1940).
229. Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **145**, 455 (1942).
230. Lipkin D., Talbert P. T., Cohn M., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2871 (1954).
231. Brown D. M., Magrath D. J., Neilson A. H., Todd A. R., *Nature*, **177**, 1124 (1956).
232. Brown D. M., Heppel L. A., Hilme R. J., *J. Chem. Soc.*, **1954**, 40.
233. Davis F. F., Allen F. W., *Biochim. et Biophys. Acta*, **21**, 14 (1956).
234. Heppel L. A., Whitfield P. R., *Biochem. J.*, **60**, 1 (1955).
235. Baddiley J., Buchanan J. G., Letters R., *J. Chem. Soc.*, **1956**, 2812.
236. Baddiley J., Thain E. M., *J. Chem. Soc.*, **1953**, 903.
237. Fogarty L. M., Rees W. R., *Nature*, **193**, 1180 (1962).
238. Arnold J., Price T. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1406 (1962).
239. Rall T. W., Sutherland E. W., *J. Biol. Chem.*, **237**, 1228 (1962).
240. Egami F., Takahashi N., *Bull. Chem. Soc. (Japan)*, **28**, 666 (1955).
241. Ukita T., Hayatsu H., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1879 (1962).
242. Cormier M. J., *J. Biol. Chem.*, **237**, 2032 (1962).

НУКЛЕОТИДАНГИДРИДЫ

В течение длительного времени была известна лишь относительно небольшая группа нуклеотидкоферментов, производных аденозин-5'-пирофосфата. К их числу относились, кроме аденозин-5'-трифосфата, кофакторы окисления — восстановления, а именно флавинадениндинуклеотид и ди- и трифосфопиридиннуклеотиды. Позднее наши знания о биологическом значении большого числа нуклеотидных производных, известных под общим, до некоторой степени вольным названием нуклеотидкоферментов, быстро расширились, и биохимия такого рода соединений в настоящее время изучена довольно хорошо. Помимо расширения функций кофакторов биологического трансфосфорилирования и переноса электронов, эти достижения выявили роль промежуточных продуктов типа смешанных ангидридов в переносе сахаров, карбоновых кислот, аминокислот, сульфата и нуклеотидов. Хотя некоторые из этих нуклеотидных соединений вполне могут участвовать как коферменты в сложных мультиферментных системах, где может происходить регенерация, но точнее будет относить их в основном к «активным промежуточным соединениям» или в случае применения очищенных ферментных препаратов, — к субстратам. С химической точки зрения группу этих соединений наилучшим образом можно определить просто как смешанные ангидриды нуклеотидов, т. е. ангидриды нуклеозид-5'-фосфата и другой кислоты, которой могут быть пирофосфорная кислота, фосфорная кислота и ее моноэфиры, карбоновые кислоты, аминокислоты и пептиды или серная кислота. До сих пор неизвестна биологическая функция симметричных динуклеозид-пирофосфатов и не обнаружены природные диэфиры трифосфорной кислоты.

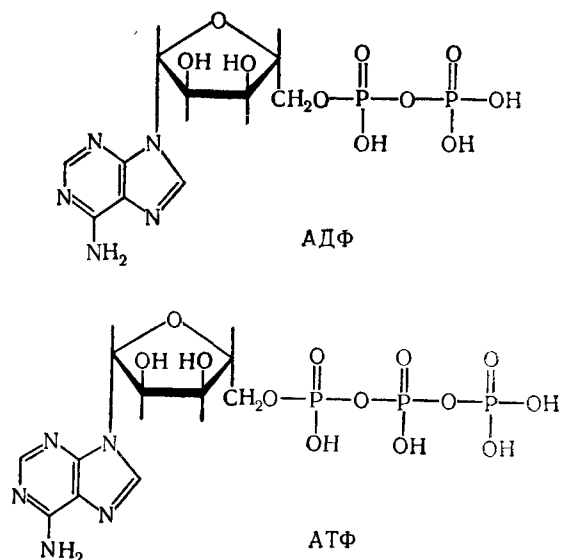
АДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТ И ДРУГИЕ НУКЛЕОЗИД-5'-ПОЛИФОСФАТЫ

По-видимому, наиболее важным соединением в процессах земной * жизни, происходящих в настоящее время (если вообще можно как-то выделить компонент многокомпонентной системы), является аденозин-5'-трифосфат, впервые выделенный в 1929 г. из экстрактов мышц [1, 2]. Аденозин-5'-трифосфат участвует в многочисленных

* В космологическом смысле.

реакциях обмена веществ на всех уровнях организации и служит ключевым соединением в процессах переноса энергии в живых организмах, независимо от того, получена ли она в результате окисления, брожения или фотохимическим путем.

При гидролизе аденозин-5'-трифосфата (АТФ) разбавленной щелочью получается аденозин-5'-фосфат и неорганический пирофосфат; в результате кислотного гидролиза быстро освобождаются две из трех фосфатных групп в виде неорганического фосфата и наряду с этим выделяются аденин и рибозо-5-фосфат [3]. Деаминация АТФ азотистой кислотой приводит к аналогичному инозин-5'-трифосфату [4], что указывает на отсутствие замещения по 6-аминогруппе. Этерификация 2'- или 3'-гидроксильной группы сахара исключена, так как АТФ обнаруживает положительные реакции на 1,2-*цис*-гликольную группировку [4, 5] и, точнее, потребляет один молярный эквивалент периодата [6]. Титрометрические данные [4, 7] указывают на присутствие трех первичных и одной вторичной ступеней диссоциации фосфата, и поэтому АТФ имеет следующее строение [4]:



Удаление из АТФ одной фосфатной группы ферментативным путем дает аденозин-5'-пирофосфат (АДФ) [8], структура которого подтверждена данными титрования, а также соотношением «кислотолабильного» и «кислостабильного» фосфора. Из нескольких источников был выделен аденозин-5'-тетрафосфат [9—11]. Он не

заменяет АТФ в реакциях фосфорилирования, и биологическое значение как тетрафосфата, так и пентафосфата (которые обнаружены также в продажных препаратах АТФ [12]), если вообще о нем можно говорить, остается неизвестным.

Как и в случае адениновых нуклеотидов, широкое распространение имеют 5'-фосфаты, 5'-пирофосфаты и 5'-трифосфаты цитидина, гуанозина и уридина [13—16]. Они являются промежуточными соединениями при биосинтезе рибонуклеиновых кислот. Трифосфаты участвуют также в биосинтезе ряда диэтерифицированных пирофосфатных производных; кроме того, они заменяют АТФ в качестве фосфорилирующего агента или кофермента в некоторых ферментативных реакциях [17—21]. Полифосфаты дезокси-нуклеозидов также выделены [22—25], и снова, помимо функции непосредственных предшественников дезокси-нуклеиновой кислоты, второй их главной функцией является, вероятно, участие в биосинтезе промежуточных соединений, таких, как тимидин-5'-пирофосфат-глюкоза и дезоксицитидин-5'-пирофосфат-холин. Строение всех этих нуклеозидполифосфатов установлено методами, аналогичными примененным для определения строения АТФ, и подтверждено синтезом.

Исследования дисперсии оптического вращения указывают на то, что в водном растворе полифосфатная цепь аденозин-5'-трифосфата может изгибаться с образованием связи между β - и γ -фосфатными группами и аминогруппой аденина [26]. Хотя ионы кальция и магния при pH 7 не влияют на оптическую симметрию молекулы, под действием ионов цинка, по-видимому, образуется конформация, стабилизированная Zn-хелатными связями между концевой фосфатной группой и заместителем в положении 6 пуриновых или пиримидиновых пирофосфатов и трифосфатов, но не 5'-монофосфатов [27]. Кривые спектрального титрования в присутствии или в отсутствие ионов магния показывают, что в растворе нуклеозид-5'-трифосфаты существуют, вероятно, в свернутой конформации, в которой ион Mg^{2+} координационно связывает пирофосфатную структуру с гетероциклическим основанием. Небольшие сдвиги в сторону более низких значений $pK_{кажущ}$ в присутствии ионов Mg^{2+} (приблизительно на 0,3 единицы) найдены для трифосфатов, но не обнаружены для нуклеозидов [28]. Однако на основании спектров ядерного магнитного резонанса можно предположить, что хелатная конформация маловероятна и что комплекс металл — АТФ в растворе имеет вытянутую форму [29]. Полученные данные указывают также, что в образовании комплексов с магнием и кальцием принимают участие β - и γ -фосфатные группы [30].

Определение констант устойчивости комплексов металлов с нуклеотидами показало, что устойчивость этих комплексов изменяется в следующем порядке: $Mn^{2+} > Co^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$ [31, 32] и трифосфат $>$ пирофосфат $>$ мононуклеотид [31]. В этих

комплексах значительную роль играет вторичная диссоциация фосфорильной группы, так как константа устойчивости магниевого комплекса флавинадениндинуклеотида [31] гораздо меньше соответствующей величины для аденозин-5'-пирофосфата, а комплекс цинка с никотинамидадениннуклеотидом также менее устойчив, чем комплекс цинк — АДФ [33]. Форма комплекса определяется размером катиона [34], и, так как ион магния является кофактором многих ферментативных реакций АТФ с оптимальным соотношением этого иона, действительным субстратом, по-видимому, будет комплекс [35]. И в этом случае торможение ферментативной реакции может происходить при действии комплексообразователей или в присутствии других катионов, в результате чего образуются комплексы, стерически отличные от тех, которые необходимы ферменту [34]. Образование такого рода комплексов с ионами металлов может оказывать глубокое воздействие на устойчивость ангидридной связи. АТФ наиболее устойчив в слабощелочной среде ($\sim \text{pH } 10$); расщепление происходит быстрее в нейтральных и кислых растворах [36], когда ионизация вторичной кислотной группы конечного фосфата незначительна. Поскольку АДФ несколько более устойчив, чем трифосфат, его можно получить гидролизом АТФ в контролируемых условиях [37].

Нуклеофильная атака ортофосфата на АТФ с образованием АДФ и неорганического пирофосфата с очень низким выходом (до 0,2%) также катализируется ионами двухвалентных металлов [38] при оптимальном значении $\text{pH } 9,0$. Особенно эффективны ионы Ca^{2+} и Mn^{2+} ; последний катализирует также неферментативный перенос фосфата с АТФ на карбоновые кислоты (обнаруживаемые по образованию гидроксаматов) [39]. В последней реакции особенно эффективны ионы бериллия; возможно, что механизм реакции предполагает нуклеофильную атаку ацетат-ионов (оптимальное значение $\text{pH } 5,2$) на комплекс металл — АТФ [40]. Можно ожидать, что образование лиганда увеличит электрофильный характер атомов фосфора и уменьшит также электростатическую экранировку.

При обработке АТФ водным раствором гидроокиси бария происходит внутримолекулярное фосфорилирование. Среди многочисленных продуктов гидролиза обнаружены аденозин-3',5'-циклофосфат и аденозин-2'(3'), 5'-дифосфаты, а также 2'-, 3'- и 5'-фосфаты аденозина [41,42]. Присутствуют также аденин, аденозин и аденозин-5'-пирофосфат.

Образование большинства продуктов можно объяснить с помощью реакций двух типов [42]. Внутримолекулярная нуклеофильная атака гидроксильными ионами или молекулами воды на атомы фосфора, особенно в β - и γ -положениях, дает классический набор продуктов гидролиза; внутримолекулярная реакция, при которой атомы фосфора атакуются 3'-гидроксильной группой рибоз-

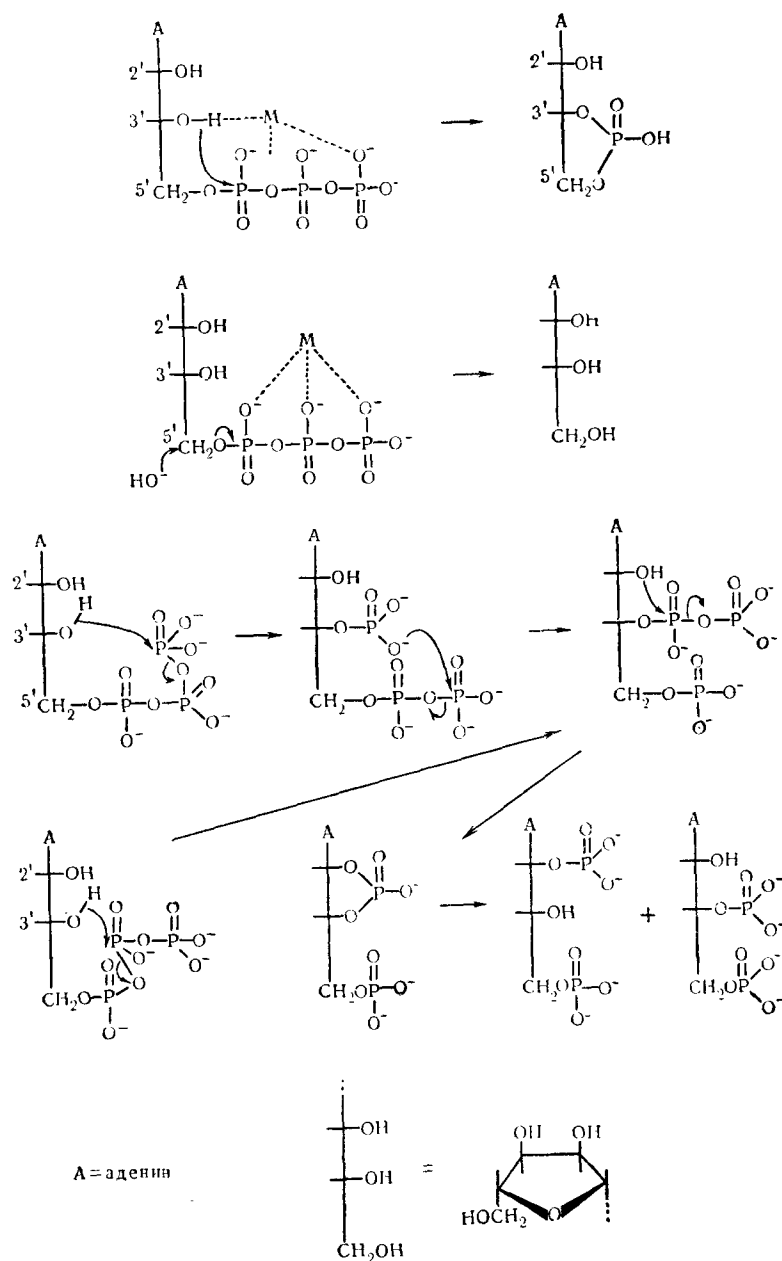
ной части аденозин-5'-трифосфата, приводит к образованию ряда фосфорилированных продуктов и промежуточных соединений, включая аденозин-3',5'-циклофосфат. Присутствие 2'-фосфорилированных производных хорошо объясняется гидролизом промежуточного 2',3'-циклофосфата. Последний легко получается из 3'-пирофосфата, образующегося либо непосредственно в результате атаки 3'-гидроксильной группы на β -атом фосфора, либо, вероятнее, при нуклеофильной атаке 3'-фосфатной группы (фосфорилирование 3'-гидроксильной группы γ -фосфатом) на β -атом фосфора 5'-пирофосфатного остатка в аденозин-3'-фосфат-5'-пирофосфате. Аденозин образуется, по-видимому, более вероятно при атаке гидроксильного иона на C_5' аденозин-5'-трифосфата с разрывом связи $\text{C} - \text{O}$ и отщеплением неорганического трифосфата, чем при гидролизе нуклеозидомонофосфатов (разрыв связи $\text{P} - \text{O}$), так как последние устойчивы в примененных для гидролиза условиях [42].

В результате образования комплекса с ионами бария отрицательные заряды на атомах кислорода трифосфатной цепи нейтрализуются, и тем самым увеличивается положительный электрический потенциал на атомах фосфора (т. е. увеличивается электрофильный характер, обуславливающий более быструю нуклеофильную атаку); кроме того, каталитический эффект этого комплекса может быть также обусловлен вовлечением гидроксильных групп сахара [43], нуклеофильный характер которых будет усиливаться в результате координирования с ионами бария (так же как и средой с высоким значением pH).

Другие ионы ди- и многовалентных металлов также проявляют каталитическое действие и в различной степени влияют на природу продуктов, получающихся в результате мягкой деградации АТФ (и других нуклеозид-5'-трифосфатов). В частности, можно упомянуть гидролиз до аденозин-5'-фосфата, катализируемый ионами кальция или лантана, и почти количественное превращение аденозин-5'-трифосфата в аденозин-5'-пирофосфат под действием пасты из окиси цинка. Величина эффекта является, по-видимому, функцией размера иона и вполне может быть обусловлена положением иона металла в цепи трифосфата в тот момент, когда нуклеофильный агент (молекула воды, спиртовая гидроксильная группа, гидроксил-ионы или анионы фосфатов или других кислот) вступает во взаимодействие с комплексом нуклеотид — ион металла, образуя активированное переходное состояние [44] (см. схему на стр. 192).

Полная разработка этих проблем в значительной мере будет, вероятно, способствовать выяснению роли ионов металлов в большинстве ферментативных реакций органических фосфатов.

Исследованы спектры ядерного магнитного резонанса фосфора в аденозин-5'-трифосфате и установлены пики, соответствующие α -, β - и γ -фосфатам [45]. Определен химический сдвиг для каждого



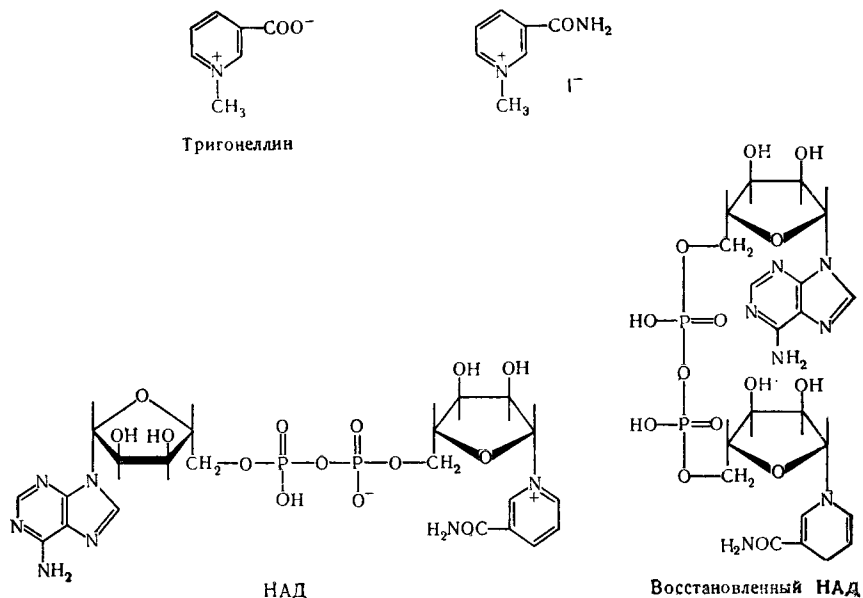
атома фосфора как функция рН; разница в сдвиге пика поглощения β-атома фосфора по сравнению со сдвигом пика α- и γ-атомов коррелирует с разницей в реакционной способности β-атома фосфора в ферментативных реакциях.

НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДЫ

Козимаза (кофермент I, дифосфопиридиннуклеотид, ДПН, в настоящее время — никотинамидадениндинуклеотид, НАД [47]), впервые обнаруженная в диализатах дрожжевого сока Гарденом и Янгом [46] в 1905 г. как термостабильный фактор, необходимый для брожения, в чистом виде была выделена значительно позднее [48]. При выделении аналогичного кофермента II (трифосфопиридиннуклеотида, ТПН, никотинамидадениндинуклеотидфосфата, НАДФ) из больших количеств крови лошади [49] также встретились значительные трудности из-за отсутствия подходящих методов. Благодаря способности пиридиновой части молекулы к окислению — восстановлению оба фактора функционируют в ферментативных системах, участвующих в окислительно-восстановительных процессах.

При кислотном гидролизе [50, 51] НАД образуется аденин, никотинамид, пентоза и фосфорная кислота в молярном соотношении 1 : 1 : 2 : 2; те же результаты получены с НАДФ, за исключением того, что выделяется еще третья фосфатная группа [49]. Из смеси продуктов, полученных при кислотном гидролизе НАД в мягких условиях, был выделен рибозо-5-фосфат с выходом, достаточным для того, чтобы показать, что обе пентозы представляют собой D-рибозу [52]. Дезаминирование адениновой части молекулы азотистой кислотой дает соответствующие производные гипоксантина [53] без дальнейшего изменения молекулы; полное дезаминирование НАД до динуклеотида гипоксантина и никотиновой кислоты (а никотинамиднуклеотида — до производного никотиновой кислоты) легко осуществляется при действии азотистого ангидрида [54]. Обработка НАД щелочью приводит к выделению никотинамида и аденозин-5'-пирофосфата [55], по-видимому, в результате элиминирования фосфата из АДФ-рибозы (или продукта расщепления). Хотя коферменты неустойчивы по отношению к щелочи и относительно устойчивы к кислотам, дигидропроизводные (легко получаемые восстановлением с помощью гипосульфита натрия) относительно устойчивы в щелочах, но совершенно неустойчивы по отношению к кислотам. При каталитическом гидрировании НАД и НАДФ получают гексагидропроизводные, которые в отличие от дигидропроизводных не подвергаются окислению под действием флавопротеида. Изменения в ультрафиолетовых спектрах поглощения, которые сопровождают «обратимое восстановление»

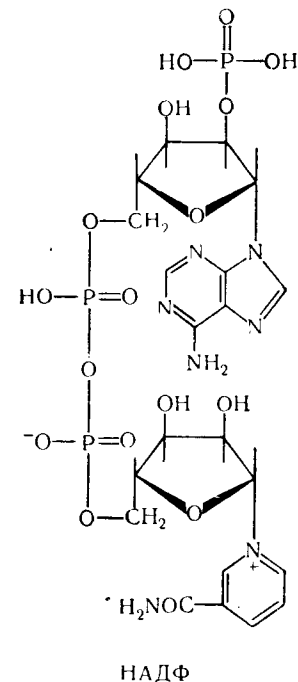
и полное гидрирование, а также изменения стабильности в зависимости от pH типичны для четвертичных пиридиниевых производных, таких, как тригонеллин и иодметилат никотинамида, оба из которых, в отличие от самого никотинамида, легко образуют дигидропроизводные при действии гипосульфита натрия [56, 57]. То, что коферменты являются четвертичными пиридиниевыми фосфатами, было также продемонстрировано титрованием НАД (одноосновная кислота [58]) и дигидро-НАД (двухосновная [59]); в обоих случаях результаты указывают на присутствие цвиттер-иона и диэтерифицированной пирофосфатной связи. Ферментативный гидролиз НАД до никотинамиднуклеозида (N^1 - β -D-рибофуранозилникотинамида) [60] и сравнение окислительно-восстановительных, спектральных свойств и зависимости стабильности от pH синтетических гликозильных производных никотинамида [61] со свойствами НАД и НАДФ позволяют определить структуру НАД как P^1 -аденозин-5'- P^2 -никотинамиднуклеозид-5'-пирофосфата. Позднее было показано, что восстановленная форма НАД имеет строение 4-гидропроизводного [62].



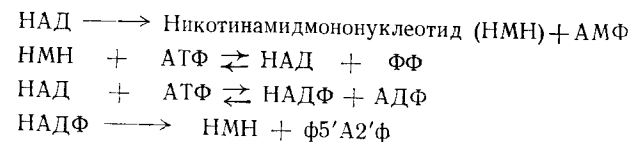
Изучение строения с помощью ферментов полностью подтвердило приписанную НАД структуру. При обработке пирофосфатазой получаются никотинамидмононуклеотид и аденозин-5'-фосфат [63, 64], а в результате обратимого ферментативного пирофосфоролита

кофермент был синтезирован из АТФ и никотинамидмононуклеотида [65].

До 1950 г. расположение третьего фосфатного остатка в молекуле НАДФ было неизвестно. При обработке НАД хлорокисью фосфора получается некоторое количество НАДФ [66]; оба кофермента легко взаимопревращаются в ферментативных реакциях [67—69]. Гидролиз НАДФ пирофосфатазой дает никотинамидмононуклеотид и аденозиндифосфат (не пирофосфат), из которого при гидролизе 5'-нуклеотидазой получается аденозин-2'-фосфат. Следовательно, третья фосфатная группа в НАДФ этерифицирует 2'-гидроксильную группу аденозиновой части молекулы [70].



Ферментативные реакции



Третий пиридиннуклеотидный кофактор (кофермент III), необходимый для окисления цистеинсульфиновой кислоты в цистеиновую

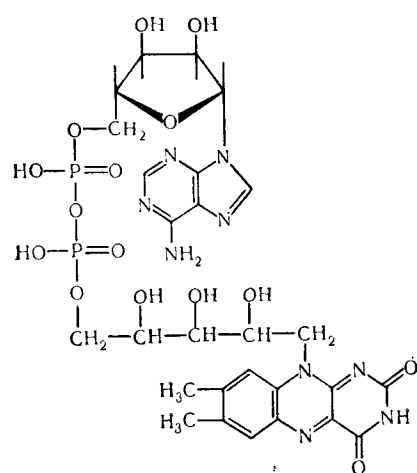
кислоту, был выделен из дрожжей. Хотя строение его окончательно не установлено, соединение, по-видимому, очень похоже на НАД [71].

Гипохромный эффект, обнаруживаемый в ультрафиолетовых спектрах поглощения НАД и его аналогов, рассматривается как доказательство внутримолекулярного взаимодействия между двумя половинами молекулы интактного пирофосфата [72]. Возможно, что плоскости аденинового и никотинамидного колец параллельны и расположены друг против друга. Сильное взаимодействие между адениновым и никотинамидным остатками имеет место также и в восстановленном НАД [73]. Этот эффект, по-видимому, обусловлен образованием водородных связей, хотя нельзя исключить и непосредственное взаимодействие между кольцевыми системами (даже в восстановленной форме).

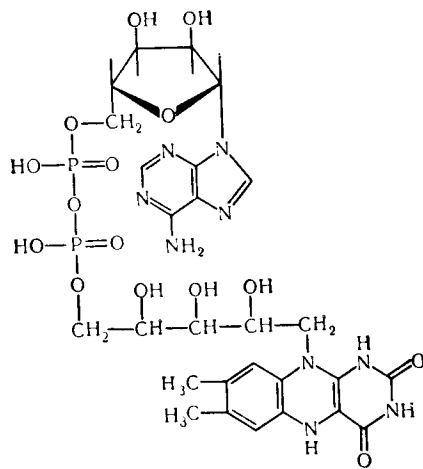
ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИД

В то время как пиридиннуклеотидные коферменты активны при биологическом окислении благодаря их восстановлению, образующиеся дигидросоединения не самоокисляются. Обратное окисление до НАД и НАДФ обычно происходит при действии флавопротеида, протестической группой которого является кофермент флавинадениндинуклеотид (ФАД).

Кофермент, выделенный в 1938 г. из дрожжей [74] (и из печени и почек), в чистом виде представляет собой двухосновную кислоту, которая при щелочном гидролизе в мягких условиях дает адено-

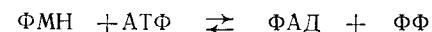


ФАД



Дигидро-ФАД

Ферментативные реакции



зин-5'-фосфат (и рибофлавин-4',5'-циклофосфат [75]), а при обработке кислотой — рибофлавин-5'-фосфат [76]. При действии азотистой кислоты 6-аминогруппа адениновой части ФАД может быть замещена гидроксильной, а при щелочном фотолизе из ФАД образуется люмифлавин с такой же скоростью, как и из рибофлавина. На основании этого, флавинадениндинуклеотид представляет собой Р¹-аденозин-5'-Р²-рибофлавин-5'-пирофосфат, строение которого подтверждено химическим синтезом. Ферментативно кофермент синтезируют путем фосфорилирования рибофлавина [77] с помощью АТФ с последующим обратимым пирофосфоролизом [78] при участии АТФ.

Обратимое восстановление ФАД гипосульфитом натрия дает дигидро(лейко)соединение, которое способно к самоокислению. Биохимически кофермент (окислительно-восстановительный потенциал $\sim -0,19$ в) участвует главным образом в переносе электронов между никотинамидными коферментами (окислительно-восстановительный потенциал $\sim -0,28$ в) и системой цитохромов (окислительно-восстановительный потенциал $\sim$ от 0 до $+0,29$ в), хотя в некоторых случаях флавиновые ферменты действуют непосредственно, например при окислении D-аминокислот.

Как и в случае пиридиннуклеотидных коферментов, между циклическими системами аденина и рибофлавина в молекуле ФАД происходит взаимодействие (на что указывает заметное гашение флуоресценции рибофлавиновой части молекулы [79]), придавая пирофосфату в нормальных условиях определенную конформацию. Ввиду взаимосвязи, существующей между нуклеиновыми кислотами и белками, возможно, покажется неудивительным, что в этой конформации плоскости оснований расположены друг над другом, так же как и в полинуклеотидах.

ДРУГИЕ АДЕНИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ

Из крови свиньи был выделен ангидрид дифосфоглицериновой и адениловой кислот [80]. Ферментативный гидролиз этого соединения пирофосфатазой змеиного яда (из *Agkistrodon Blomhoffii*) дает аденозин-5'-фосфат и 2,3-дифосфоглицериновую кислоту; в результате кислотного гидролиза образуется аденин, рибозо-5-фосфат и дифосфоглицериновая кислота. Структура ангидрида представляет собой, по-видимому, Р¹-аденозин-5'-Р²-[2(3)-фосфо-

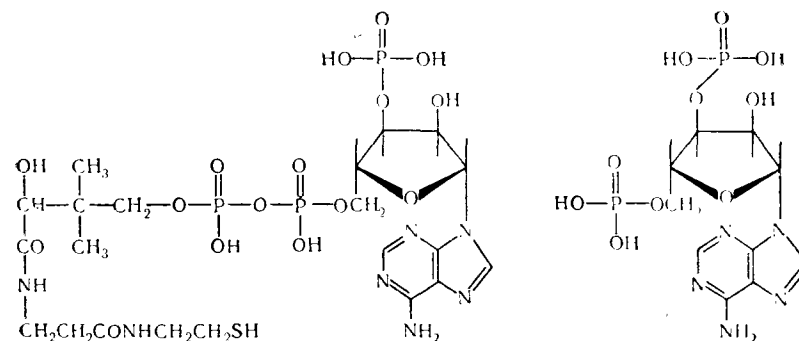
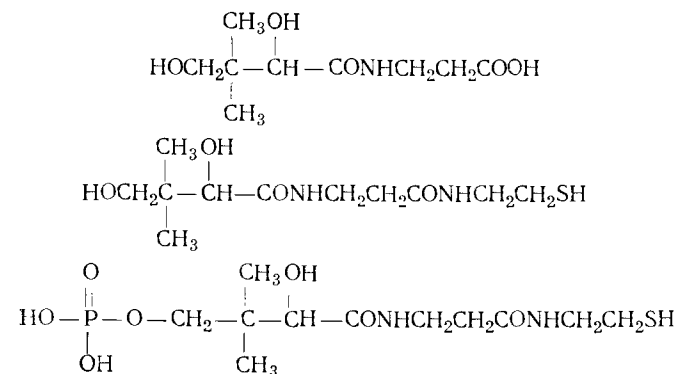
глицерин-3(2)-пирофосфат (аденилил-5'-2,3-дифосфо-глицериновую кислоту), но точный тип связи с глицериновой кислотой еще не установлен.

Другим производным аденозинпирофосфата, выделенным из мышечных экстрактов кролика, является динуклеотид аденина и мионовой кислоты (МАД), бесцветный при pH 6, но имеющий зеленую окраску при pH 9 [81, 82]. Мионовая кислота ($C_9H_6N_2O_3$) полностью еще не идентифицирована, но, по-видимому, она представляет собой 1-карбокси-3-оксипроизводное 2,6- или 2,7-нафтиридина. Ферментативный гидролиз пирофосфата дает аденозин-5'-фосфат и фосфат рибозилмионовой кислоты; щелочной гидролиз (гидроокисью бария) приводит к мионовой кислоте, тогда как при кислотном гидролизе образуется фосфат рибозилмионовой кислоты и небольшое количество рибозилмионовой кислоты [82].

КОФЕРМЕНТ А

Нуклеотидное производное витамина было открыто в печени и экстрактах мозга, после того как была установлена необходимость кофактора для ферментативного ацетилирования сульфаниламида [83] и холина [84]. Вскоре было показано, что этот кофактор содержит пантотеновую кислоту и очень широко распространен, причем дрожжи являются особенно хорошим его источником. В настоящее время известно, что кофермент А, как этот фактор был назван, участвует во многих биохимических реакциях и в том числе в обмене цитрата, пирувата, сукцината, жирных кислот, изопрена и стероидов.

Ферментативный гидролиз кофермента А с использованием ряда ферментов дает аденозин и пантотеновую кислоту в эквимольных количествах. При кислотном гидролизе образуются аденин, β-аланин, три фосфатных остатка и серусодержащее соединение [85], позднее идентифицированное как 2-меркаптоэтиламин [86, 87]. Производное пантотеновой кислоты, содержащее 2-меркаптоэтиламин, было выделено раньше и идентифицировано как фактор *Lactobacillus bulgaricus* — пантотеин [88]; некоторое доказательство присутствия этого соединения в ферментативных гидролизатах кофермента А было получено при помощи тестов на бактериальный рост [89]. Было также найдено, что пантотеин может превращаться в кофермент А под действием аденозин-5'-трифосфата и экстракта из печени голубя [90]. Следующим подтверждением структуры кофермента А было выделение аденозин-5'-фосфата и 4-фосфата пантотеновой кислоты из смеси продуктов, полученной в результате кислотного гидролиза в мягких условиях [91], причем структура последнего компонента была полностью установлена сравне-



Кофермент А

нием с синтетическими 2-фосфатом, 4-фосфатом, 2,4-дифосфатом и 2,4-циклофосфатом пантотеновой кислоты [92, 93].

Гидролиз кофермента А пирофосфатазой из картофеля обнаружил присутствие пирофосфатной связи [94]. При обработке щелочью молекула легко расщепляется с образованием пантотеин-2,4-циклофосфата (и 2,4-циклофосфата пантотеновой кислоты [95]), причем его поведение аналогично поведению флавинаденидинуклеотида и уридиндифосфоглюкозы. Третья фосфатная группа удаляется из интактного кофермента под действием монофосфатазы, специфичной для 3'-фосфатов [96, 97]. То, что 2'- или 3'-гидроксильная группа в аденозиновой части этерифицирована монофосфатом, было подтверждено периодатным титрованием [98]. Гидролиз пирофосфатной связи очищенной пирофосфатазой давал пантотеин-4-фосфат, структура которого установлена синтезом [99] этого соединения, и аденозин-3',5'-дифосфат, а не изомерный 2',5'-дифосфат (как показано действием специфической 3'-нуклеотидазы) [96, 97]. Таким образом, структура кофермента А была установлена.

Окончательное доказательство такого строения было получено в результате химического и ферментативного синтезов кофермента (через 3'-дефосфокофермент А). Описаны два биохимических пути синтеза исходя из пантотеновой кислоты [100—102].



Активным промежуточным соединением в переносе ацетата является тиоацетат кофермента А [103], причем этот «активный ацетат» образуется ферментативно под действием ацетилфосфата [104] или аденилацетата [105] на кофермент. Тиоловые эфиры, особенно 2-меркаптоэтиламина [106—108] и пантотеина [109—111], представляют собой очень активные химические ацилирующие агенты. Было также обнаружено влияние атома серы, приводящее к освобождению протона из α -положения. В тиоловых эфирах это происходит легче, чем в соответствующих кислородных соединениях [112]. Ферментативное S-фосфорилирование кофермента А гуанозин-5'-трифосфатом в дрожжах и сердечной мышце [113] (но аденозин-5'-трифосфатом в других тканях [114]) представляет собой другой путь активации янтарной кислоты. Химическое фосфорилирование кофермента А хлоридом фосфора дает, по-видимому, как утверждают [115], тиолфосфат, но более вероятен при этом распад ангидрида или образование 2',3'-циклофосфатного производного.

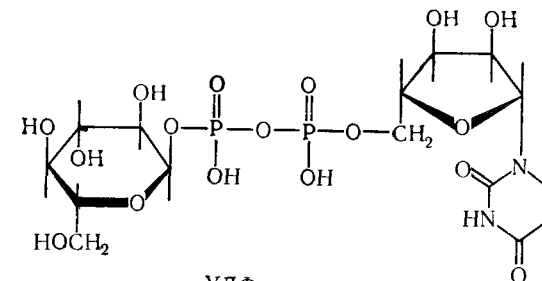
ПРОИЗВОДНЫЕ УРИДИН-5'-ПИРОФОСФАТА

В результате различных исследований обмена галактозы в дрожжах Лелуар с сотрудниками выделил и идентифицировал (в 1950 г.) первый нуклеотидный кофактор, содержащий не аденин, а другое

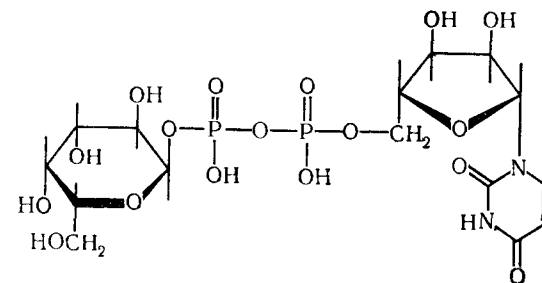
основание [116]. Оказалось, что это уридиндифосфоглюкоза — кофактор превращения α -D-галактозо-1-фосфата в α -D-глюкозо-1-фосфат в адаптированных к галактозе дрожжах. Впоследствии было выделено большое количество уридиндифосфопроизводных и показано их большое значение для обмена углеводов, биосинтеза полисахаридов и синтеза клеточной стенки у микроорганизмов.

УРИДИНДИФОСФОГЛЮКОЗА

Кислотный гидролиз уридиндифосфоглюкозы (УДФГ) в мягких условиях дает глюкозу и уридин-5'-пирофосфат; при гидролизе в более жестких условиях выделяется глюкоза, неорганический фосфат и уридин-5'-фосфат. Нуклеотид был охарактеризован также гидразинолизом, в результате которого образуется рибозо-5-фосфат. Обработка УДФГ аммиаком приводит к уридин-5'-фосфату и глюкозо-1,2-циклофосфату, при щелочном гидролизе последнего получается смесь глюкозо-1- (25%) и глюкозо-2-фосфатов (75%). Кислотный гидролиз глюкозоциклофосфата дает глюкозо-2-фосфат; в примененных условиях образующийся также менее устойчивый глюкозо-1-фосфат дефосфорилируется [117]. Неустойчивость по отношению к кислоте и отсутствие восстанавливающей способности у глюкозы в молекуле УДФГ указывает на присутствие

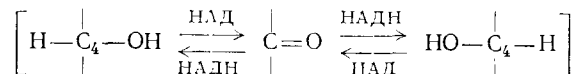
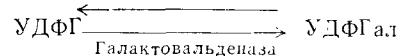
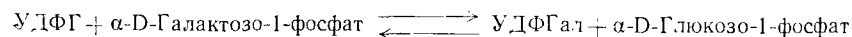
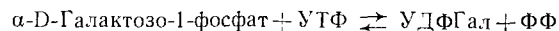
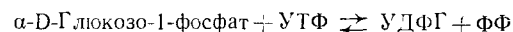


УДФ-глюкоза



УДФ-галактоза

Ферментативные реакции



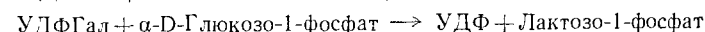
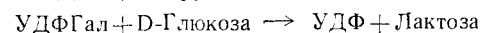
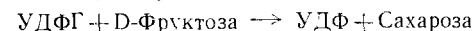
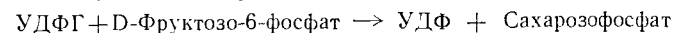
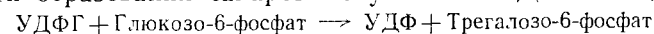
глюкозо-1-фосфата; следовательно, кофактор представляет собой Р¹-уридин-5'-Р²-глюкозо-1-пирофосфат [116, 117]. Дальнейшие доказательства структуры и конфигурации кольца глюкозы были получены расщеплением ангидрида пирофосфатазой с образованием α -D-глюкозо-1-фосфата, ферментативным синтезом УДФГ из уридин-5'-трифосфата и α -D-глюкозо-1-фосфата [118, 119] и химическим синтезом.

Роль УДФГ в ферментативном превращении галактозы в глюкозу заключается в анионном обмене с галактозо-1-фосфатом с образованием уридиндифосфогалактозы [120] и последующей инверсией при С₄-атоме гексозы через промежуточное 4-кетопроизводное [121—123]. Несмотря на то что в этой окислительно-восстановительной реакции участвует связанный с белком никотинамид-адениндинуклеотид, попытки уловить восстановленную форму никотинамидного кофермента или ввести тритий в гексозу при помощи НАД (или его восстановленной формы), меченного тритием в *пара*-положении, были безуспешными [124, 125].

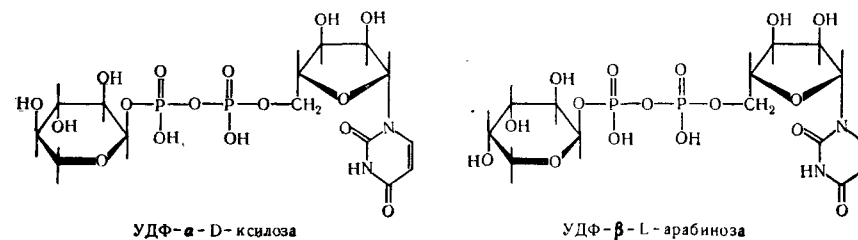
Химия уридиндифосфогалактозы (УДФГал) аналогична химии УДФГ. Второй путь ферментативного превращения α -D-галактозо-1-фосфата в УДФГал пирофосфоролизом уридин-5'-трифосфата был обнаружен в адаптированных к галактозе *Saccharomyces fragilis* [126], в зеленых растениях [127] и в тканях млекопитающих [128]. Этот второй путь [128] объясняет, возможно, обмен галактозы при галактоземии (врожденном недостатке фермента галактозо-1-фосфатуридилтрансферазы [129], который приводит к накоплению нерасщепленной галактозы в виде галактозо-1-фосфата, сопровождающемуся некоторыми патологическими изменениями).

Широкое распространение УДФГ и присутствие уридиндифосфогалактозы (и галактовальденазы — фермента, катализирующего взаимопревращение УДФГал $\rightleftharpoons$ УДФГ) в некоторых дрожжах, не адаптированных к галактозе [130], позволяет предположить, что эти соединения имеют биологические функции, связанные не только

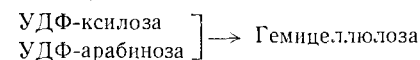
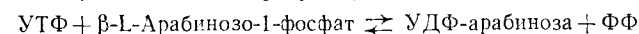
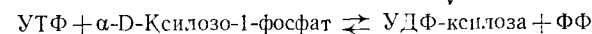
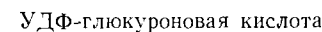
с взаимопревращением галактозы и глюкозы. В пивных дрожжах обнаружен фермент, катализирующий синтез трегалозофосфата из УДФГ и глюкозо-6-фосфата [131, 132], и продемонстрированы два пути образования сахарозы с участием УДФГ [133, 134].



Осуществлены аналогичные синтезы лактозы и лактозо-1-фосфата из уридиндифосфогалактозы и D-глюкозы или α -D-глюкозо-1-фосфата при помощи препаратов из вымени коровы [135, 136]. Помимо функционирования в биосинтезе дисахаридов, УДФГ участвует как активный донор глюкозы при синтезе полисахаридов, таких, как целлюлоза [137], крахмал [138, 139] и гликоген [140—143]. В каждом случае необходима олигосахаридная затравка или акцептор. (Недавно было показано, что в ферментативном переносе глюкозы на крахмал или олигосахариды синтетическая аденозиндифосфоглюкоза приблизительно в 10 раз эффективнее УДФГ. Различные другие нуклеозиддифосфосахара неактивны [144].) Пр продемонстрирован также прямой перенос остатков глюкозы на 5-оксиметилцитозин в дезоксинуклеиновой кислоте из бактериофага T2 с помощью уридиндифосфоглюкозы [145], а при ферментативном синтезе психозина (галактозилсфингозина) обнаружен перенос галактозы из уридиндифосфогалактозы на сфингозин с выделением уридин-5'-пирофосфата [146].



Ферментативные реакции



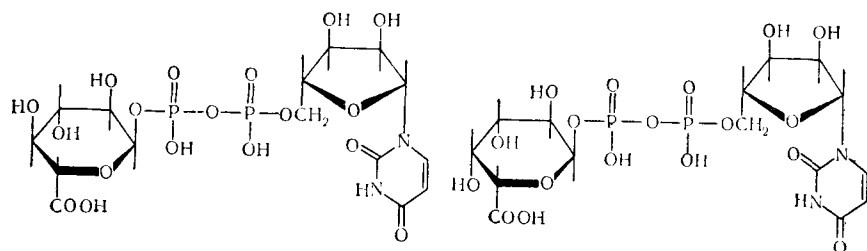
Из проростков маш-фасоли (*Phaseolus aureus*) выделены уридиндифосфо- α -D-ксилоза и уридиндифосфо- β -L-арабиноза [147]; оба эти соединения могут превращаться друг в друга путем ферментативной эпимеризации при C_4 и являются, по-видимому, предшественниками растительных полисахаридов. В экстрактах из двух безкапсульных разновидностей пневмококков типа II обнаружен аналог рамнозы — уридиндифосфорамноза [148].

Из *Diplococcus pneumoniae* (тип II, штамм R 19) выделен уридиндифосфодиоксиацетон. Кислотный гидролиз последнего дает уридин-5'-фосфат; при обработке пирофосфатазой змеиного яда (содержащей 5'-нуклеотидазу) получают уридин, неорганический фосфат и фосфат диоксиацетона [149].

УРИДИНДИФОСФОГЛЮКУРОНОВАЯ КИСЛОТА

Уридиндифосфоглюкуроновая кислота служит донором глюкуронильных остатков при ферментативном синтезе сложных эфиров, а также алифатических и стероидных простых эфиров — глюкуронидов [150]; кроме того, она переносит остаток глюкуроновой кислоты на аминокислоты с образованием N-гликозилуруновых производных [151]. Смешанный ангидрид, выделенный из животных [152, 153] и растительных [154] источников, а также из микроорганизмов [155], образуется при ферментативном окислении уридиндифосфоглюкозы никотинамидадениндинуклеотидом [156]. По-видимому, в этом процессе участвует только один фермент — дегидрогеназа; никакого промежуточного образования альдегида не обнаружено. Другой синтез уридиндифосфоглюкуроновой кислоты из 1-фосфоглюкуроновой кислоты и уридин-5'-трифосфата катализируется экстрактами из проростков маш-фасоли [157]. Под действием этих экстрактов проходит декарбоксилирование уридиндифосфоглюкуроновой кислоты до уридиндифосфоксилозы [158].

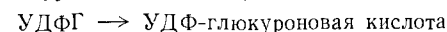
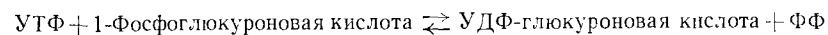
В то время как пневмококки типа II и III содержат уридиндифосфоглюкуроновую кислоту, в пневмококках типа I последняя



УДФ-глюкуроновая кислота

УДФ-галактуоновая кислота

Ферментативные реакции



заменена на аналогичное производное галактуоновой кислоты, что отражает, вероятно, участие этих пирофосфатных производных в биосинтезе специфических капсульных полисахаридов. При использовании бесклеточных экстрактов из *Diplococcus pneumoniae* типа III был осуществлен ферментативный синтез полисахарида пневмококка типа III, β -связанного полимера целлобиуроновой кислоты (глюкозо-4- β -1-глюкуроновой кислоты), из уридиндифосфоглюкозы и уридиндифосфоглюкуроновой кислоты [160, 161]. Аналогичным образом экстракты из пневмококка типа I катализируют синтез серологически активного полимера из уридиндифосфогалактуоновой кислоты [162]. Образующаяся полигалактуоновая кислота составляет, по-видимому, основу капсулярного полисахарида типа I.

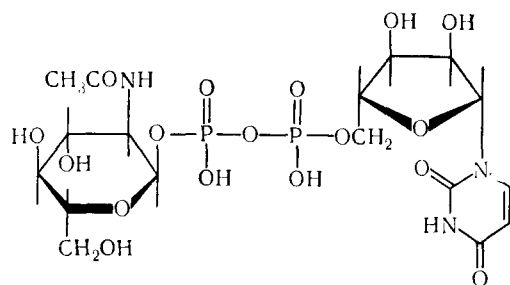
УРИДИНДИФОСФО-N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИН

Примесь, присутствующая в препаратах уридиндифосфоглюкозы из дрожжей, была выделена [163, 164] и идентифицирована как 2-амино-2-дезоксиглюкозное производное уридин-5'-пирофосфата [163]. При кислотном гидролизе в мягких условиях освобождается нуклеозидпирофосфат и N-ацетил-D-глюкозамин; при обработке щелочью образуется уридин-5'-фосфат и N-ацетилглюкозамин-1-фосфат, в противоположность поведению уридиндифосфоглюкозы в тех же условиях. Ферментативный синтез [165] ангидрида из α -D-N-ацетилглюкозамин-1-фосфата и уридин-5'-трифосфата позволил установить его структуру как P^1 -уридин-5'- P^2 - α -D-N-ацетилглюкозамин-1-пирофосфата. Это соединение широко распространено и может находиться в равновесии с уридиндифосфо-N-ацетилгалактозамином [166] в присутствии соответствующей вальдентазы [167].

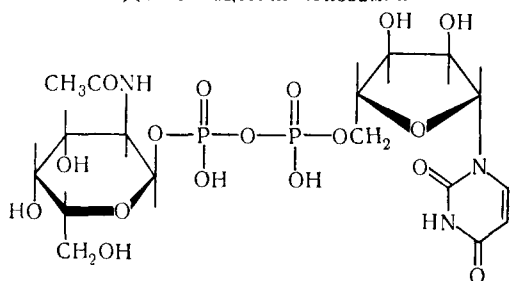
Подобно другим углеводным производным уридин-5'-пирофосфата уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин участвует в биосинтезе полимеров. Исследованиями с помощью изотопов обнаружено ферментативное образование гиалуроновой кислоты из уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамина и уридиндифосфоглюкуроновой кислоты [168, 169]. Уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин участвует также как донор остатков глюкозы в синтезе хитина, осуществляемом экстрактами *Neurospora crassa* в присутствии затравки [170].

Другими представителями нуклеотидаминосахаров являются уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин-6-фосфат и уридиндифосфо-N-

ацетилгалактозамин-4-сульфат, выделенные из яйцевода курицы [171]. Первое производное представляет, по-видимому, продукт распада уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин-6-фосфо-1-β-D-галактозы, также выделенной из яйцевода кур-несушек [172]. Гидролиз



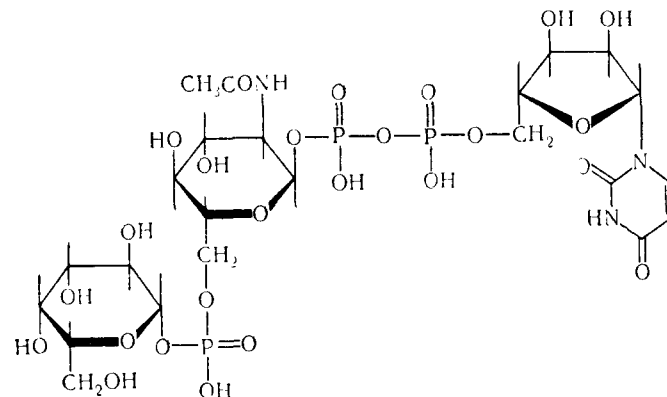
УДФ - N-ацетилглюкозамин



УДФ - N-ацетилгалактозамин

разбавленной кислотой дает эквивалентные количества уридин-5'-пирофосфата, галактозы и N-ацетилглюкозамин-6-фосфата; при обработке аммиаком (при 100°) выделяется β-D-галактозо-1-фосфат и уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин. (D-Конфигурация галактозы была установлена биологическими методами.) Гидролиз соединения очищенной пирофосфатазой змеиного яда приводит к уридин-5'-фосфату и N-ацетилглюкозамин-(1-фосфат)-6-фосфо-β-1-галактозе. Последняя далее распадается под действием разбавленной уксусной кислоты до N-ацетилглюкозамин-1,6-дифосфата и галактозы [172]; с другой стороны, при дефосфорилировании монофосфатазой образуется N-ацетилглюкозамин-6-фосфо-1-галактоза, которая при обработке щелочью дает галактозо-1-фосфат [173].

В стрептококках группы А содержится уридиндифосфогексозамин, замещенный в 3-положении гексозаминового остатка [174]. Уридиндифосфо-N-ацетиламиносахар, строение которого полностью не установлено, выделен из крабов и омаров [175]. Описан фер-

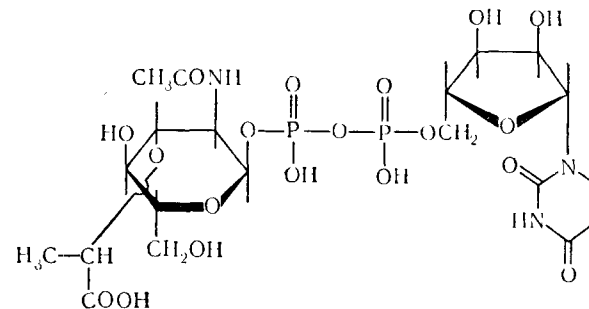


ментативный синтез уридиндифосфоглюкозамина из уридин-5'-трифосфата и α-D-глюкозамин-1-фосфата [176]; под действием экстрактов печени этот ангидрид может превращаться в уридиндифосфогалактозамин [177].

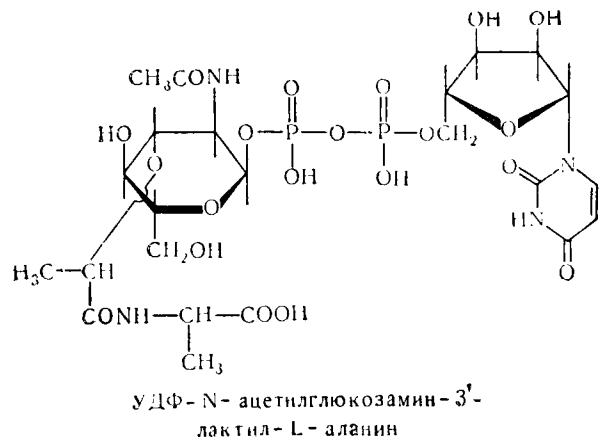
ПЕПТИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ УРИДИН-5'-ПИРОФОСФАХАРОВ

В последние годы выделен ряд содержащих углеводпептиды нуклеотидных производных, которые являются предшественниками пептидов, находящихся в клеточных оболочках бактерий. Эти соединения, обычно присутствующие в клетках в небольших количествах, легче всего получают путем соответствующей блокировки путей обмена, ведущих к синтезу клеточной стенки.

Накопление кислотолабильных фосфатов при угнетении *Staphylococcus aureus* пенициллином впервые было отмечено в 1949 г. [178]. В результате фракционирования неочищенных препаратов этих фосфоэфиров было выделено три урацильных производных,



УДФ - N-ацетилмуравовая кислота



УДФ-N-ацетилглюкозамин-3'-лактил-L-ала-D-глю-L-лиз-D-ала-D-ала-COOH

где ала = аланин

глю = глутаминовая кислота

лиз = лизин

которые при кислотном гидролизе в мягких условиях дали уридин-5'-пирофосфат, а при дальнейшем гидролизе — уридин-5'-фосфат. Среди продуктов гидролиза двух из этих соединений обнаружены были также аминокислоты, а электрометрическое титрование третьего, проведенное до и после гидролиза, указало на присутствие P_1 , P_2 -диэтерифицированной пирофосфатной структуры, что было подтверждено расщеплением под действием пирофосфатазы [179]. Другой важный компонент, который был общим для всех трех уридиновых производных и восстанавливающие свойства которого проявлялись лишь после удаления пирофосфатной группировки, был впоследствии идентифицирован как N-ацетилмурамовая кислота [180]. Мурамовая кислота (компонент бактериальных спор и клеточных оболочек [181, 182]) представляет собой 3-O-1'-карбоксиил-2-амино-2-дезоксиглюкозу [183, 184].

На основании этого соединения представляют собой простые эфиры молочной кислоты и уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамина, в двух случаях содержащие аминокислотные остатки. Эти аминокислотные (и пептидные) компоненты присоединены амидной связью через карбоксильную группу молочной кислоты. Анализ пептидов с применением подходящих химических методов показал, что в одном соединении присутствует один-единственный остаток L-аланина, а в другом — к остатку L-аланина присоединено несколько

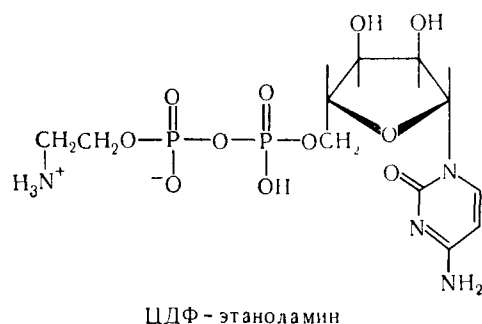
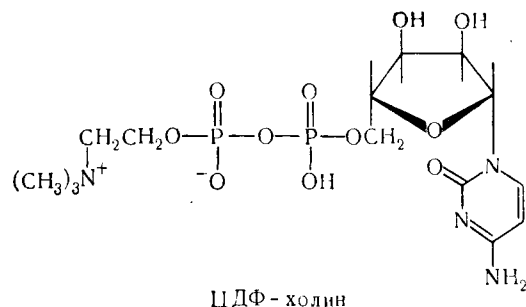
аминокислот в следующем порядке: D-глутаминовая кислота, L-лизин, D-аланин и D-аланин (С-концевая группа) [179, 185, 186].

Подтверждение структуры пентапептидного производного уридиндифосфо-N-ацетилмурамовой кислоты получено при изучении биосинтеза этого соединения, включая использование специфических блокировок обмена. В экстрактах из *Staphylococcus aureus* и других бактерий обнаружен прямой ферментативный перенос енолпирувата из 2-фосфоенолпирувиновой кислоты в положение 3 N-ацетилглюкозаминного остатка в молекуле уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамина с выделением неорганического фосфата [187]. Получающаяся уридиндифосфо-N-ацетилглюкозаминпирувиновая кислота является, по-видимому, предшественником производного молочной кислоты — уридиндифосфо-N-ацетилмурамовой кислоты, которая накапливается (в дополнение к уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамину и цитидиндифосфорибиту) в *Staphylococcus aureus* при угнетении последнего некоторыми образцами красителя генцианового фиолетового [188]. Угнетение пенициллином приводит к накоплению УДФ-N-ацетилмурамат-L-аланина, а из *S. aureus*, выращенного на среде с недостатком лизина, выделена УДФ-N-ацетилмурамат-L-аланил-D-глутаминовая кислота [189]. Применение оксамицина, конкурентного антагониста включения D-аланина, вызывает накопление УДФ-N-ацетилмурамат-L-аланил-D-глутамил-L-лизина [190], а обработка пенициллином тормозит перенос N-ацетилмураматпентапептида из УДФ-N-ацетилмурамат-L-аланил-D-глутамил-L-лизил-D-аланил-D-аланина в клеточную стенку, в которой аланин, лизин, глутаминовая и мурамовая кислоты содержатся в той же пропорции и конфигурации [191]. Присутствие D-аминокислот, без сомнения, придает клеточной оболочке бактерии устойчивость к расщеплению многими протеолитическими ферментами [185, 186].

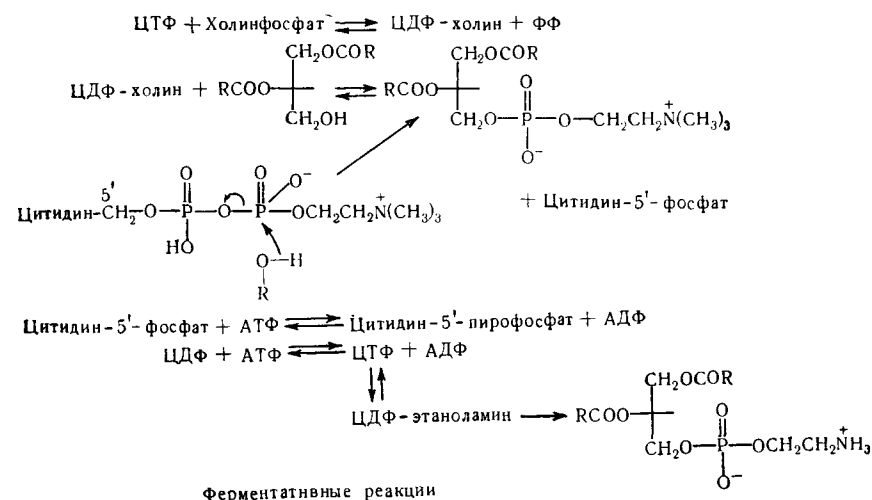
Накопление этих промежуточных продуктов является результатом торможения специфических ферментативных реакций, многие из которых охарактеризованы; частично очищены катализирующие их ферменты. Постепенным добавлением соответствующих аминокислот к производному молочной кислоты и уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамина был осуществлен ферментативный синтез трипептидного производного, которое затем сразу превращали в пентапептид путем добавления дипептида D-аланил-D-аланина; кофакторами в каждой реакции служили аденозин-5'-трифосфат и ионы марганца [192]. Несмотря на то что оксамицин не влияет на эту последнюю ферментативную реакцию, он подавляет превращение L-аланина в D-аланин и синтез дипептида D-аланина [193].

В обработанном пенициллином *Streptococcus faecalis* недавно обнаружено гексапептидное производное, в котором ε-аминогруппа лизинового остатка ацилирована L-аланином [474].

Для ферментативного включения фосфохолина в лецитин необходим цитидин-5'-трифосфат, причем было найдено, что «активными» формами фосфохолина и фосфоэтаноламина являются P^1 -цитидин-5'- P^2 -холинпирофосфат и P^1 -цитидин-5'- P^2 -этаноламинпирофосфат соответственно [202]. Строение этих соединений легко было подтверждено синтезом — как ферментативным из цитидин-5'-трифосфата и фосфохолина (или фосфоэтаноламина), так и химическим [203].

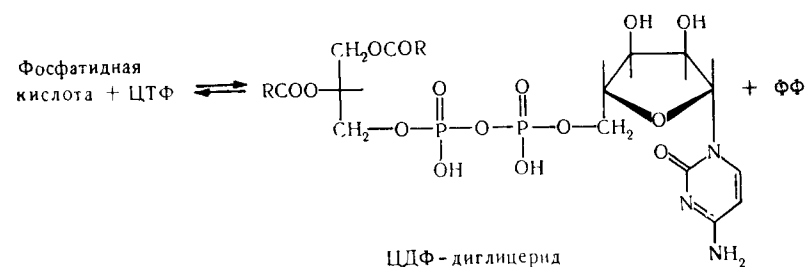


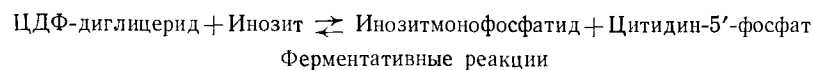
В присутствии соответствующих трансфераз смешанные ангидриды реагируют с α , β -диглицеридами, образуя лецитин или фосфатидилэтаноламин с выделением цитидин-5'-фосфата [204]. Аналогичная ферментативная реакция цитидиндифосфохолина с N-ацетил-DL-трео-транс-сфингозином дает сфингомиелин [205]. Требуются сравнительно небольшие количества цитидиновых промежуточных продуктов, так как под действием аденозин-5'-трифосфата и фосфокиназ [206] происходит дальнейшее фосфорилирование цитидин-5'-фосфата до цитидин-5'-трифосфата с последующей регенерацией необходимого цитидиндифосфохолина (или соответствующего производного этаноламина). Как и в случае многих биохимических реакций такого рода, активация фосфохолин-трансферазных



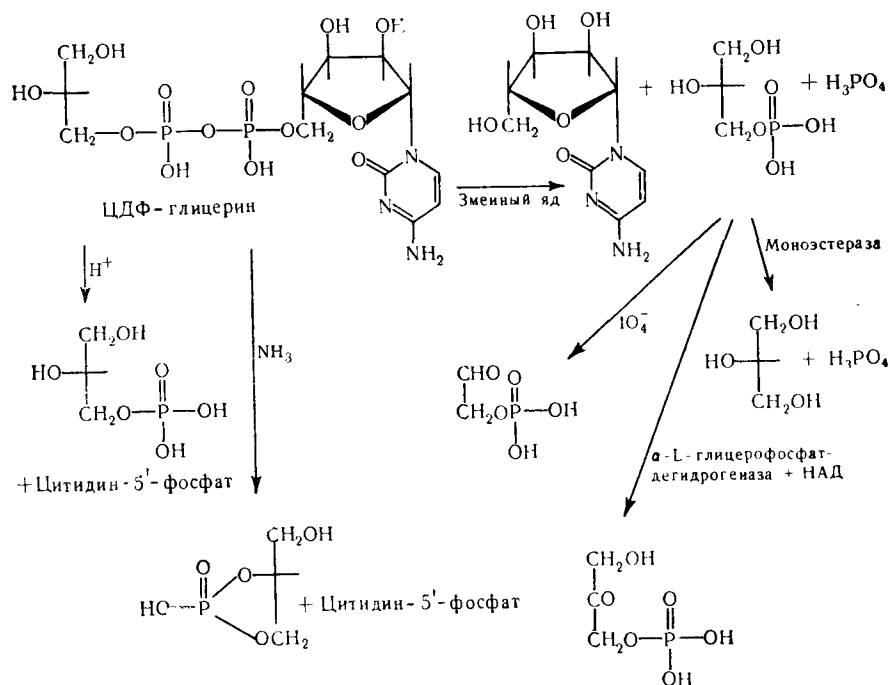
ферментных систем требует наличия ионов магния (или марганца) [203], по-видимому, для образования комплексов с субстратами.

Несмотря на широкое распространение [202, 207, 208] таких трансфераз и цитидиновых смешанных ангидридов, биосинтез фосфолипидов может осуществляться другими путями, предусматривающими возможное участие глицерофосфата или фосфатидных кислот через образование соответствующих нуклеотидных смешанных ангидридов. Так, экстракты из *Escherichia coli* катализируют образование фосфатидилсерина (последующее декарбоксилирование дает фосфатидилэтаноламин) и цитидин-5'-фосфата из цитидиндифосфоглицерида и L-серина [209]. Было показано, что синтетический цитидиндифосфодипальмитин реагирует с инозитом в присутствии микросом из печени цыпленка, образуя инозитмонофосфатид и цитидин-5'-фосфат [210]. Цитидиндифосфоинозит (выделенный из срезов поджелудочной железы утки, инкубированных в присутствии инозита-2- H^3) также может принимать участие в биосинтезе фосфатидов [211].





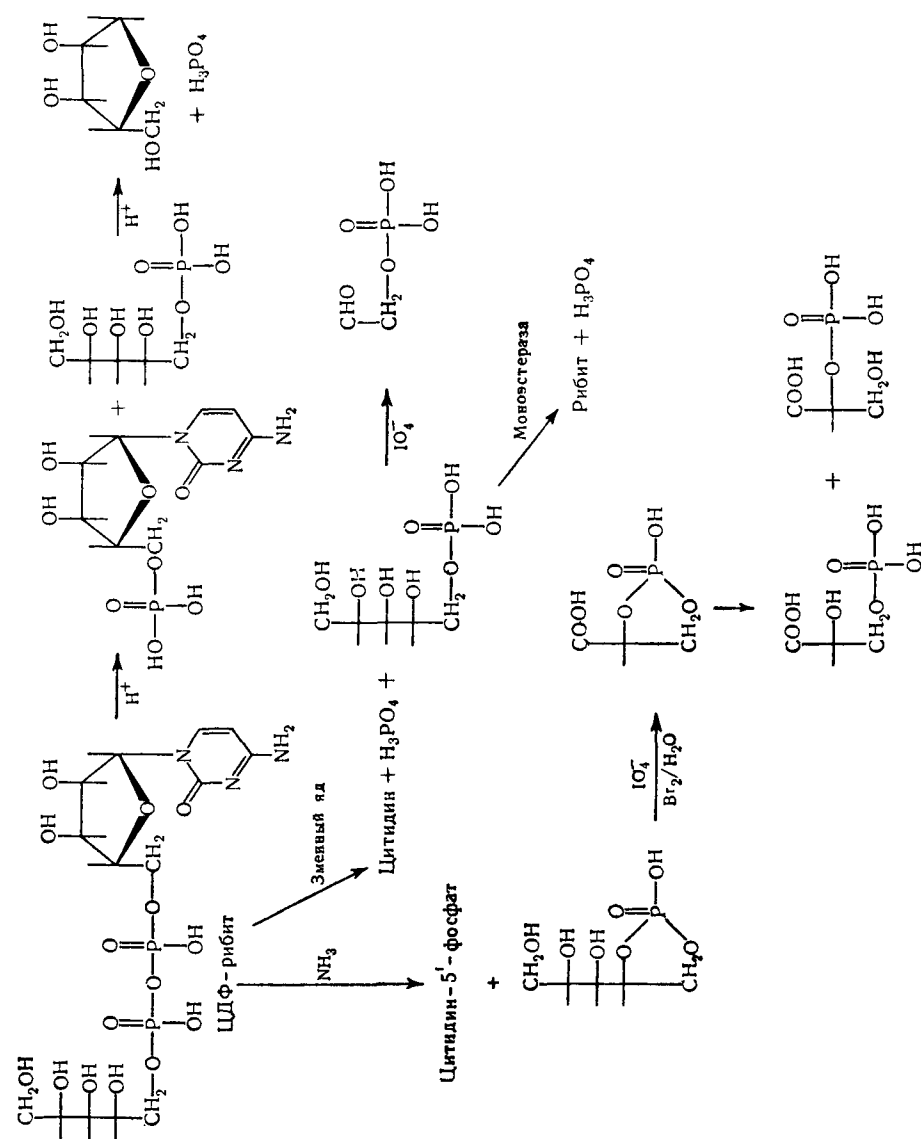
Цитидиндифосфоглицерин и цитидиндифосфорибит впервые выделены из *Lactobacillus arabinosus* [212—214], а в настоящее время обнаружены в ряде бактерий [215]. Кислотный гидролиз цитидиндифосфоглицерина (ЦДФ-глицерина) дает цитидин-5'-фосфат и α -глицерофосфат (наряду с небольшими количествами β -изомера), тогда как при обработке водным раствором аммиака образуется мононуклеотид и глицеро-1,2-(2,3)-циклофосфат. Последний легко идентифицировать вследствие его устойчивости к периодатному окислению и благодаря тому, что при кислотном или щелочном гидролизе получается смесь α - и β -глицерофосфатов [216]. Ферментативный гидролиз ЦДФ-глицерина ядом гремучей змеи (*Crotalus atrox*), который содержит пирофосфатазу и 5'-нуклеотидазу, дает цитидин, неорганический фосфат и глицерофосфат. При периодатном окислении глицерофосфата образуется фосфогликольальдегид, что указывает на α -положение фосфатной группы; конфигурация α -глицерофосфата была определена ферментативным окислением в присутст-



вии никотинамидадениндинуклеотида и глицерофосфатдегидрогеназы, в результате которого образовался фосфодиоксиацетон. Поскольку фермент специфичен к $\text{L-}\alpha$ -глицерофосфату, то структура цитидиндифосфоглицерина представляется как P^1 -цитидин-5'- P^2 - L- глицерин- α -пирофосфат [217]. Окончательное подтверждение получено синтезом этого смешанного ангидрида химическими методами и обратимым ферментативным пирофосфоролизом с цитидин-5'-трифосфатом и $\text{L-}\alpha$ -глицерофосфатом [218].

Аналогичные методы расщепления были применены для установления строения цитидиндифосфорибита [219]. Обработка аммиаком приводит к цитидин-5'-фосфату и рибит-1,2(4,5)-циклофосфату; после кислотного гидролиза в мягких условиях обнаружены нуклеозид-5'-фосфат, рибит-1(5)-фосфат и другие рибитфосфаты, образующиеся в результате катализируемой кислотой миграции фосфатной группы. При дальнейшей обработке кислотой получается неорганический фосфат и 1,4-ангидрорибит, причем в примененных условиях образования рибита не наблюдается [220]. Ферментативный гидролиз цитидиндифосфорибита змеиным ядом дает цитидин, неорганический фосфат и рибитфосфат, который можно расщепить ферментативно (моноэстеразой из предстательной железы) на рибит и ортофосфат. В результате периодатного окисления рибитфосфата получается фосфогликольальдегид, что указывает на этерификацию первичной гидроксильной группы. Конфигурация этого соединения определена с помощью специфических ферментов [217]. Периодатное окисление упомянутого выше рибит-1,2(4,5)-циклофосфата с последующим окислением продукта бромной водой дает 2,3-циклофосфат глицериновой кислоты, из которого после кислотного гидролиза получается смесь 2- и 3-фосфоглицериновых кислот. Они полностью обнаруживают способность быть субстратами гликолиза, катализируемого ферментативной системой из мышц кролика, которая специфична к глицериновой кислоте D-конфигурации; исходя из этого, цитидиндифосфорибит представляет собой P^1 -цитидин-5'- P^2 -D-рибит-5-пирофосфат. Синтез цитидиндифосфорибита из цитидин-5'-фосфата и D-рибозо-5-фосфата (с последующим восстановлением цитидиндифосфорибозы) послужил окончательным доказательством такой структуры.

Описан ферментативный синтез цитидиндифосфоглицерина и цитидиндифосфорибита из цитидин-5'-трифосфата и $\text{L-}\alpha$ -глицерофосфата или D-рибитфосфата соответственно [218]. Эти ангидриды вероятнее всего принимают участие в биосинтезе тейхоевых кислот, выделенных из ряда бактериальных клеток. Кроме рибита (или глицерина), эти полимеры содержат также аланин, глюкозу или глюкозамин, причем фактический состав тейхоевой кислоты в значительной мере определяется видом организма, из которого она выделена [221, 222]. При выращивании *Staphylococcus aureus*



в присутствии пенициллина накапливаются весьма значительные количества производного цитидиндифосфата, по-видимому цитидиндифосфорибита [223] (ср. действие генцианвиолета, стр. 209).

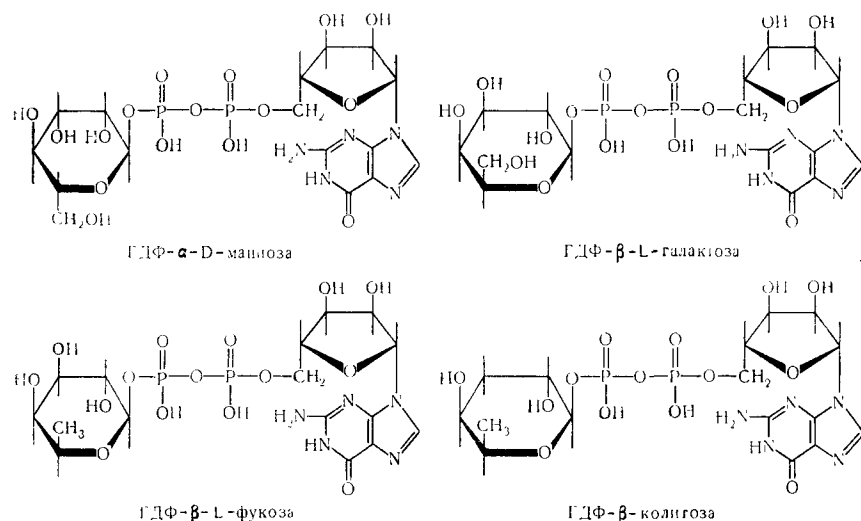
Известны другие производные цитидиндифосфата, связанные с биосинтезом полисахаридов клеточной оболочки. Из штаммов *Salmonella enteritidis* выделена цитидиндифосфотивелоза (3,6-дидезокси-D-манноза); родственный мутантный (с недостатком УДФ-галактозо-4-эпимеразы) штамм *Salmonella typhimurium* содержит ЦДФ-абеквозу (3,6-дидезокси-D-галактозу). Присутствующий в каждом случае дидезоксисахар соответствует дидезоксисахару, содержащемуся в клеточной стенке дикого штамма [224].

ПРОИЗВОДНЫЕ ГУАНОЗИН-5'-ПИРОФОСФАТА

В последние годы выделен и идентифицирован ряд Р¹-гуанозин-5'-Р²-углевод-1-пирофосфатов. Гуанозиндифосфоманноза [225] встречается в дрожжах (содержащих маннан), а гуанозиндифосфофукоза выделена из штамма *Aerobacter aerogenes* [226], синтезирующего полисахарид, содержащий L-фукозу, а также из овечьего молока [227]. Глюкозные и фруктозные аналоги обнаружены в *Eremothecium ashbyii* [228], а из *Escherichia coli* выделена гуанозиндифосфоколитоza (3,6-дидезокси-L-галактоза) [229]. Гуанозиндифосфогукоза присутствует также в молочных железах коровы; описан ее ферментативный синтез из гуанозин-5'-трифосфата и α-D-глюкозо-1-фосфата [472]. Из дрожжей выделена гуанозиндифосфоальдогептоза, причем гептоза представляет собой D-глицеро-D-манногептозу [230]. В экстрактах из красной водоросли *Porphyra perforata* J. G. Agardh обнаружены как гуанозиндифосфо-D-манноза, так и гуанозиндифосфо-L-галактоза [231]. Для галактозы, освобождающейся при кислотном гидролизе в мягких условиях, установлена L-конфигурация на основании ее устойчивости к окислению специфической D-галактозодегидрогеназой. (Следует заметить, что уридиндифосфогалактоза из той же водоросли содержит исключительно D-галактозу.) Восстановление свободной гексозы боргидридом натрия дает глицит; расщепление ангидрида пирофосфатазой приводит к получению гуанозин-5'-фосфата и фосфосахара [231].

Для определения строения различных ангидридов применяли в основном обычные гидролитические методы. Дальнейшее подтверждение строения Р¹-гуанозин-5'-Р²-маннозо-1-пирофосфата как производного α-D-маннозы основывается на относительной устойчивости ангидрида к гидролизу аммиаком и на ферментативном синтезе его из гуанозин-5'-трифосфата и α-D-маннозо-1-фосфата [232].

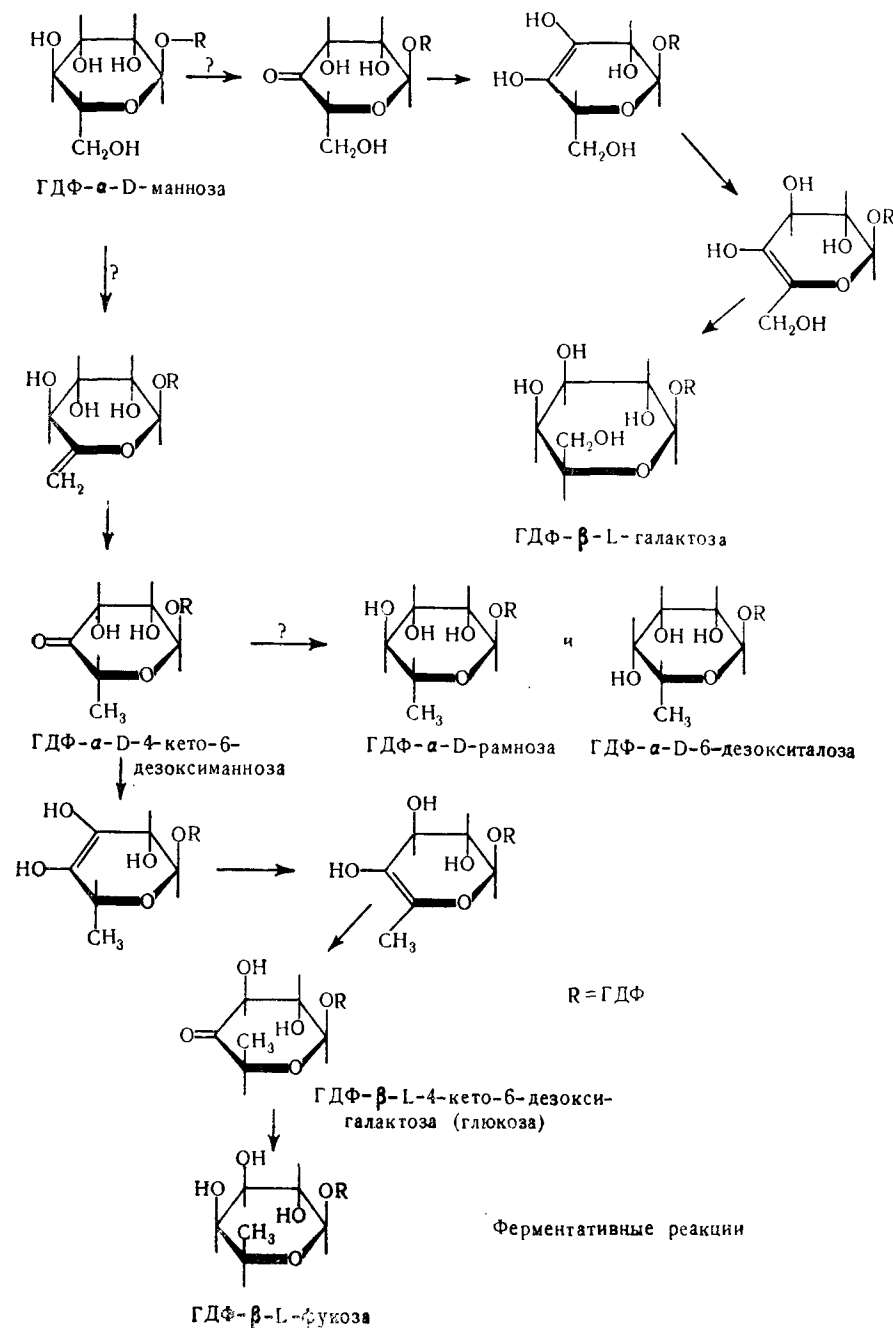
Ферментативное превращение гуанозиндифосфо- α -D-маннозы в гуанозиндифосфо-L-фукозу [233] происходит через промежуточное образование гуанозиндифосфо-4-кето-6-дезоксиманнозы [230, 234, 235]. Каталитическое (родий/ H_2) восстановление этого промежуточного продукта с последующим кислотным гидролизом дает смесь 6-дезоксид-талозы и 6-дезоксид-маннозы. Другой промежуточный продукт, ГДФ-4-кето-6-дезоксид-L-галактоза, образуется, вероятно, в результате ферментативной инверсии эндоольной группировки с последующим восстановлением продукта до ГДФ-L-фукозы [235].



Гуанозиндифосфоманноза может быть также превращена в гуанозиндифосфорамнозу и гуанозиндифосфо-6-дезокситалозу под действием неочищенных экстрактов из почвенных бактерий [236]. Как D-рамноза, так и D-6-дезокситалоза содержатся в полисахариде, выделенном из того же источника, и в этом случае (в противоположность тимидиндифосфо-L-рамнозе) гексоза в ангидриде присутствует, вероятно, в D-конфигурации. [Ср. ЦДФ-абеквозу (3,6-дидезокси-D-галактоза) и ГДФ-колитозу (3,6-дидезокси-L-галактоза), УДФ-D-галактозу и ГДФ-L-галактозу.]

ПРОИЗВОДНЫЕ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ

Из яйцеклеток морского ежа выделен дезоксицитидиндифосфо-холин (аналогичный цитидиндифосфохолину) [237]. Вместе с дезоксицитидиндифосфоэтаноломином он также обнаружен в экстрактах

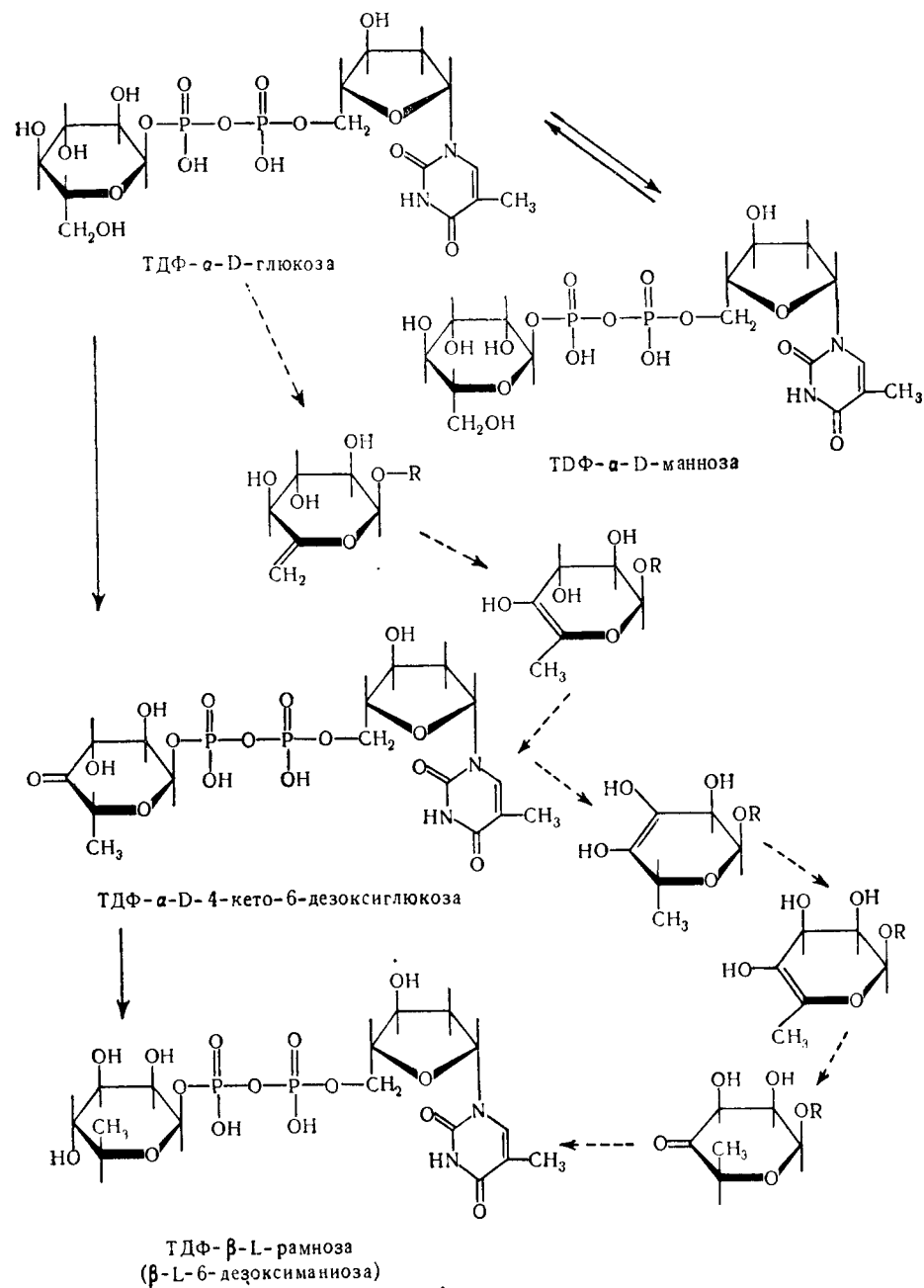


из зобной железы телят [238]. Тогда как дезоксицитидиндифосфохолин почти так же активен в ферментативном синтезе лецитина, как производное рибозы, дезоксицитидиндифосфотаноламин значительно менее активен, чем цитидиндифосфотаноламин, в ферментативном синтезе фосфатидилэтаноламина [239].

Из различных бактерий выделены углеводные производные тимидиндифосфата [240], такие, как тимидиндифосфорамноза [241—244] и тимидиндифосфоманноза [243, 244]. Спиртовые экстракты *Streptomyces griseus* содержат также тимидиндифосфорибозу. (Гидролиз при pH 2 дает тимидин-5'-пирофосфат и рибозу, указывая на наличие связи при атоме C₁ рибозы [245].) Точные биологические функции этих соединений еще не ясны, но производное маннозы (выделенное из *Streptomyces griseus*) может служить промежуточным соединением в биосинтезе стрептомицина В, а тимидиндифосфорамноза связана, возможно, с синтезом иммуноспецифических полисахаридов, входящих в состав капсул. В результате переноса остатка рамнозы из тимидиндифосфо-L-рамнозы на 3-кверцетин-D-глюкозид образуется рутин, 3-кверцетин-O-L-рамнозил-(1 → 6)-D-глюкозид; реакция катализируется растворимыми ферментами из листьев маш-фасоли [246]. Этот ангидрид участвует также в биосинтезе L-рамнозил-(1 → 3)-L-рамнозил-β-оксидеканоил-β-оксидекановой кислоты (липида, выделяемого *Pseudomonas aeruginosa*) из β-оксидеканоилкофермента А [247].

Бесклеточные экстракты *Pseudomonas aeruginosa* осуществляют ферментативный синтез тимидиндифосфоглюкозы из тимидин-5'-трифосфата и α-D-глюкозо-1-фосфата и превращают тимидиндифосфоглюкозу в тимидиндифосфорамнозу [248]. Те же реакции [249] катализируются ферментными препаратами из *Streptococcus faecalis* и *Escherichia coli*. Восстановленный кофермент II участвует в этом превращении тимидиндифосфо-α-D-глюкозы в тимидиндифосфо-β-L-рамнозу (восстановление при атоме C₆ и эпимеризация при C₃, C₄ и C₅ [250]) через промежуточное образование производных 4-кето-6-дезоксигексозы [251—253].

Инкубация тимидиндифосфоглюкозы с экстрактами из клеток *Pseudomonas aeruginosa*, разрушенных ультразвуком, в отсутствие восстановленного кофермента II (но в присутствии кофермента I) приводит к получению соединения, являющегося, по-видимому, тимидиндифосфо-4-кето-6-дезоксиглюкозой. Восстановление ангидрида боргидридом натрия с последующим кислотным гидролизом продукта приводит к смеси 6-дезоксигалактозы (фукозы) и 6-дезоксиглюкозы (но не рамнозы или 6-дезокситалозы). При периодатном окислении кетогексозы, полученной в результате кислотного гидролиза, образуется D-молочная кислота и ацетальдегид [253]. Ферментативное восстановление ТДФ-4-кетоглюкозы с помощью меченного тритием кофермента II в восстановленной форме пока-



зало, что тритий из кофермента включается в рамнозу образующейся ТДФ-рамнозы. Дальнейшее исследование с применением в качестве растворителя воды, меченной тритием, позволило предположить, что эпимеризация при C₃ и C₅ происходит в результате кето-енольных перегруппировок [254]. Таким образом было строго доказано, что ТДФ-α-D-4-кето-6-дезоксиглюкоза является промежуточным продуктом в ферментативном синтезе ТДФ-L-рамнозы из ТДФ-D-глюкозы, катализируемом экстрактами из клеток *Escherichia coli*, разрушенных ультразвуком [255]. Гидролиз выделенного промежуточного продукта пирофосфатазой дает тимидин-5'-фосфат и 4-кето-6-дезоксиглюкозо-1-фосфат. (Расщеплению ангидрида соответствует заметное ослабление поглощения при 320 мμ и сдвиг максимума поглощения с 320 к 333 мμ. Поглощение в этой области характерно для 4-кетосахаров.)

Ферментный препарат из *Streptomyces griseus* катализирует взаимопревращение ТДФ-α-D-глюкозы и ТДФ-маннозы [244]. Установлено, что структура последнего нуклеотида представляет собой P¹-тимидин-5'-P²-α-D-маннозо-1-пирофосфат. Окисление периодатом, а затем бромной водой с последующим кислотным гидролизом продукта приводит к D-глицериновой кислоте, конфигурация которой установлена ферментативным фосфорилированием и которая представляет собой 3-фосфо-D-глицериновую кислоту. Устойчивость ТДФ-маннозы к гидролизу аммиаком в условиях, при которых происходит расщепление УДФ-α-D-глюкозы (цис-C₁- и C₂-группы), указывают на α-конфигурацию (транс-C₁- и C₂-группы). Окончательное подтверждение строения получено синтезом ангидрида из тимидин-5'-фосфоамида и α-D-маннозо-1-фосфата [244].

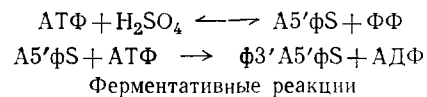
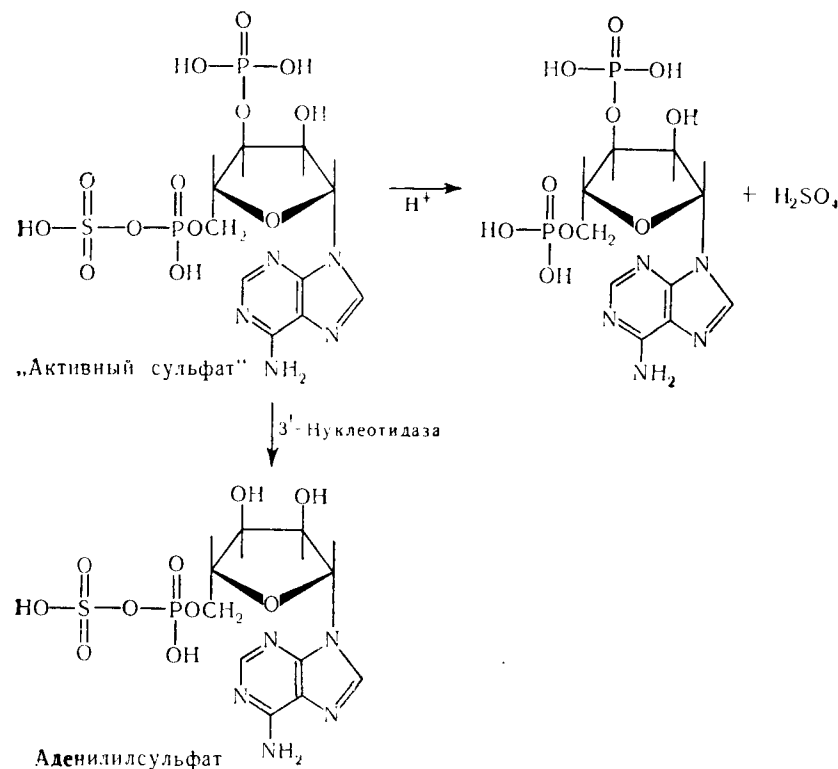
Из *Streptococcus faecalis*, выращенного на D-галактозе, выделена тимидиндифосфогалактоза; синтез осуществляется под действием индуцированной пирофосфорилазы из тимидин-5'-трифосфата и галактозо-1-фосфата [467]. В присутствии соответствующей эпимеразы этот ангидрид находится в равновесии с ТДФ-глюкозой [467, 468].

Описан также ферментативный синтез тимидиндифосфоглюкозамина из α-D-глюкозамин-1-фосфата и тимидин-5'-трифосфата в присутствии экстрактов из *Pseudomonas aeruginosa* [256]. При обработке получающегося ангидрида ацетилкоферментом А образуется тимидиндифосфо-N-ацетилглюкозамин, который взаимосвязан с соответствующим производным N-ацетилгалактозамина. Из штаммов *Escherichia coli* выделены другие ТДФ-ацетиносакхары, в которых аминокгруппа не находится у атома C₂ [469].

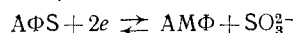
АКТИВНЫЙ СУЛЬФАТ

Ферментативный синтез сульфозфиров фенолов [257, 258], хондроитина [259] и ряда мукополисахаридов [260] протекает

через промежуточное образование сульфопроизводного, известного под названием «активного сульфата». Кислотный гидролиз этого соединения дает аденозин-3',5'-дифосфат; при обработке специфической 3'-нуклеотидазой получается аденилил-5'-сульфат (аденозин-5'-фосфосульфат). На основании этого «активный сульфат» должен представлять собой 3-фосфоаденилил-5'-сульфат (аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфат) [261]. Подтверждение такого строения получено химическим синтезом активного сульфата и продуктов его распада. Биосинтез этого промежуточного соединения протекает в две стадии, состоящие в пирофосфоролизе между АТФ и сульфатом и последующем фосфорилировании (с помощью АТФ) образующегося аденозин-5'-фосфосульфата [262—264]. (При фосфоролизе между аденозин-5'-пирофосфатом и сульфатом, катализируемым АДФ-сульфорилазой, образуется также аденилилсульфат [264].)



Экстракты из дрожжей катализируют восстановление «активного сульфата» с помощью дигидро-НАДФ до аденозин-3',5'-дифосфата и сульфита [265—268]. Аналогично аденилсульфат превращается в аденозин-5'-фосфат и сульфит под действием экстрактов из *Desulphovibrio desulphuricans* [269].

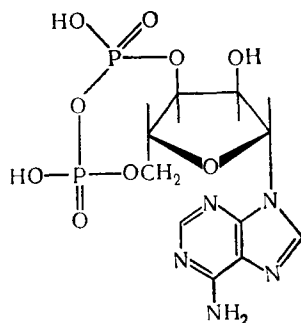


Обратимость этой реакции, возможно, объясняет образование аденилсульфата в качестве промежуточного продукта [270, 271] при окислении тиосульфата *Thiobacillus thioparus*.

Обнаружены селеновые аналоги этих ангидридов [272]. Описано выделение из печени лосося сукциладенозин-5'-фосфосульфата, связанного с серином и глутаминовой кислотой [273].

АДЕНОЗИН-3',5'-ПИРОФОСФАТ

Этот внутренний ангидрид был выделен из красной водоросли *Porphyra perforata* J. G. Agardh. Поведение этого соединения при электрофорезе указывает на присутствие в молекуле двух первичных фосфорильных ОН-групп; в результате кислотного гидролиза или обработки пирофосфатазой образуется аденозин-3',5'-дифосфат. При дальнейшем расщеплении дифосфата под действием неспецифической фосфатазы получается смесь аденозин-3'-фосфата

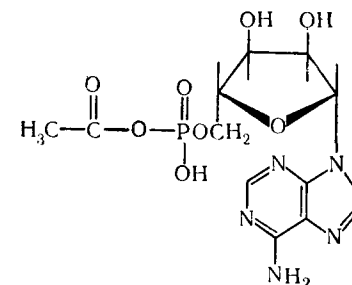


и аденозин-5'-фосфата [231]. На основании этих данных соединение представляет собой аденозин-3'(P¹), 5'(P²)-пирофосфат.

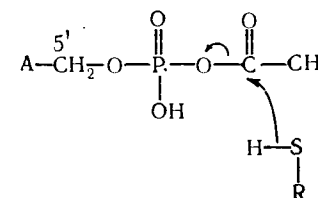
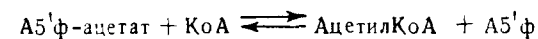
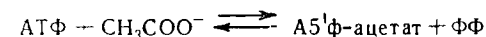
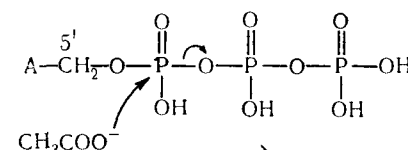
СМЕШАННЫЕ АНГИДРИДЫ НУКЛЕОТИДОВ И КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Одна из многих биологических функций аденозин-5'-трифосфата состоит в «активации» различных кислот посредством образования смешанного ангидрида. Хотя кофермент А представляет собой конеч-

ный переносчик и «активатор» многих жирных кислот, биосинтез промежуточного S-ацилкофермента А требует предварительного образования ацилангидрида, способного осуществлять S-ацилирование. Так, например, в случае ацетата ферментативное образование



Аденилацетат



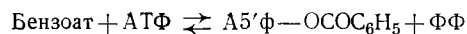
Ферментативные реакции

S-ацетилкофермента А, как установлено, предусматривает использование аденилацетата, образующегося в результате обратимой реакции между аденозин-5'-трифосфатом и ацетатом [274].

Хотя промежуточный аденилацетат выделить не удалось (по-видимому, вследствие его прочной связи с ферментом),

при проведении реакции в отсутствие кофермента А из АТФ, ацетата и гидроксилamina образуется ацетилгидроксамовая кислота, что служит признаком образования ацилангидрида. С помощью той же ферментной системы синтетический аденилилацетат превращается в аденозин-5'-трифосфат в присутствии пирофосфата и в S-ацетилкофермент А при наличии кофермента А. Механизм реакции полностью расшифрован благодаря применению меченых атомов, с помощью которых установили, что (1) обмен неорганического пирофосфата- P^{32} с АТФ требует присутствия ацетата; (2) обмен аденозин-5'-фосфата- C^{14} с АТФ зависит от присутствия ацетата и кофермента А и (3) для обмена ацетата- C^{14} с S-ацетилкоферментом А необходимо присутствие как аденозин-5'-фосфата, так и неорганического пирофосфата [275]. Кроме того, при ферментативном образовании S-ацетилкофермента А из ацетата- O^{18} , кофермента А и аденозин-5'-трифосфата атомы O^{18} переносятся на образовавшийся аденозин-5'-фосфат [276].

Подобно этому промежуточным продуктом превращения масляной кислоты в бутирилкофермент А является бутириладенилат [277]; биохимическое карбоксилирование бутирилкофермента А двуокисью углерода с помощью аденозин-5'-трифосфата приводит к получению 2-этилмалоилкофермента А [278]. Аналогично аденилилбензоат и S-бензоилкофермент А являются промежуточными продуктами в ферментативном синтезе гиппуровой кислоты [279, 280].



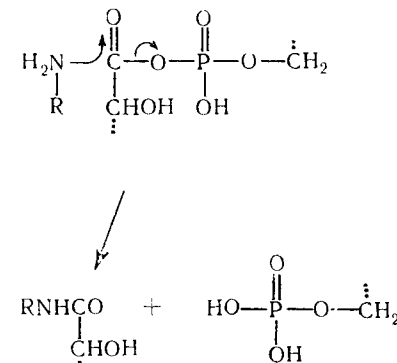
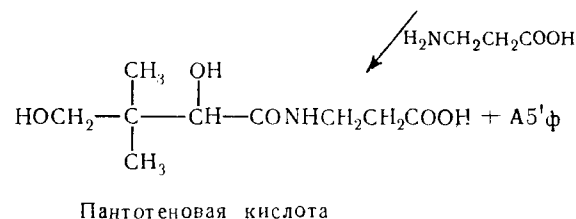
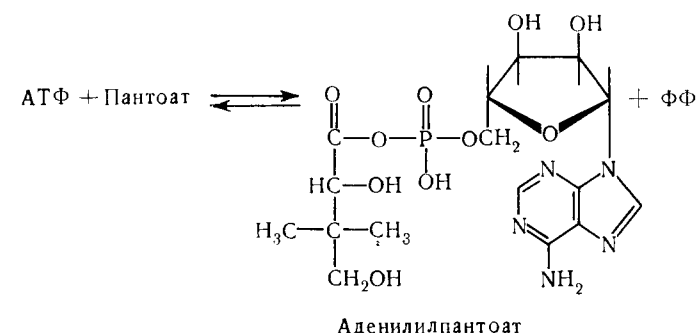
(КоА — SH = тиоловая форма кофермента А)

Аналогичная последовательность реакций имеет место при биосинтезе фенилацетилглутамина из фенилуксусной кислоты, АТФ и L-глутамина [281]; однако в случае пантотеновой кислоты (предшественника КоА) обратимый пирофосфоролит АТФ в результате нуклеофильной атаки пантотеновой кислоты дает аденилилпантоат, который затем непосредственно ацилирует аминокгруппу β-аланина, и кофермента А не требуется [282].

На основе образования гидроксамовой кислоты и обмена неорганического пирофосфата с АТФ было также постулировано существование и других ациладенилатов в виде связанных с ферментом промежуточных продуктов [283—287].

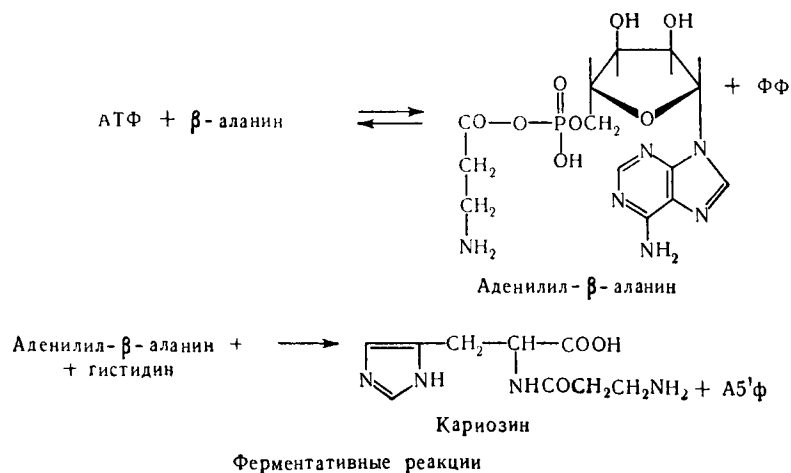
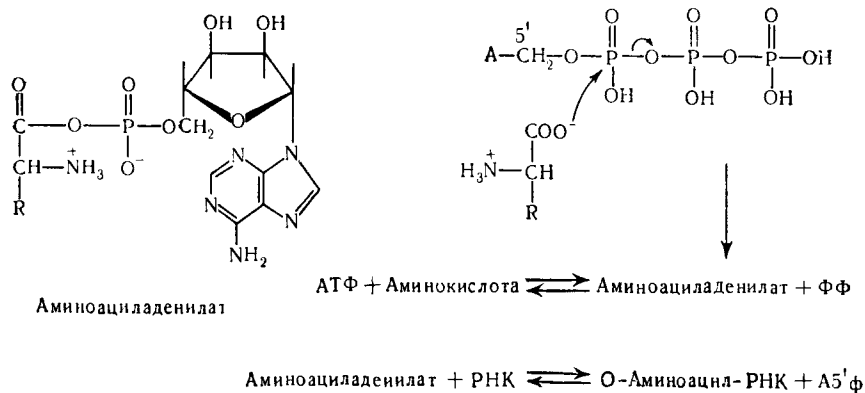
Аминоациладенилаты играют важную роль в полимеризации или включении аминокислот в белки [288]. Подобно ациладенилатам, эти промежуточные продукты образуются в результате обратимого ферментативного пирофосфоролита АТФ и либо прочно удерживаются ферментом, либо имеют короткий период существования

живаются ферментом, либо имеют короткий период существования [289, 290]. Исследование очищенных активирующих ферментов позволяет предположить, что для каждой природной аминокислоты существует свой специфический фермент. Применение очищенных ферментов помогло также выделить некоторые аминоациладенилаты и позволило сравнить их с синтетическими ангидридами [291—293]. В организме осуществляется перенос аминокислоты из смешанного ангидрида (который действует как простой ацилирующий агент) на 2'- или 3'-гидроксильную группу концевой нуклеозида в специфическом переносчике — «растворимой РНК» — с после-



Ферментативные реакции

дующим включением в белок [288, 294, 295]. Роль определенной последовательности нуклеотидов в этих транспортных нуклеиновых кислотах была продемонстрирована подавлением ферментативного аминоацилирования (лейцином) после обработки растворимой РНК (из *Escherichia coli*) азотистой кислотой, в результате которой из всей полинуклеотидной цепи дезаминируется лишь один нуклеотид [296]. Хотя ферментные системы строго специфичны для L-аминокислот, ряд аналогов триптофана (5-фтор-, 6-фтор-, 7-азатриптофаны) могут активироваться в обменной реакции АТФ с пирофосфатом и способны включаться в белки; при таком «ошибочном» биосинтезе белка тормозится рост организма. Другие ана-

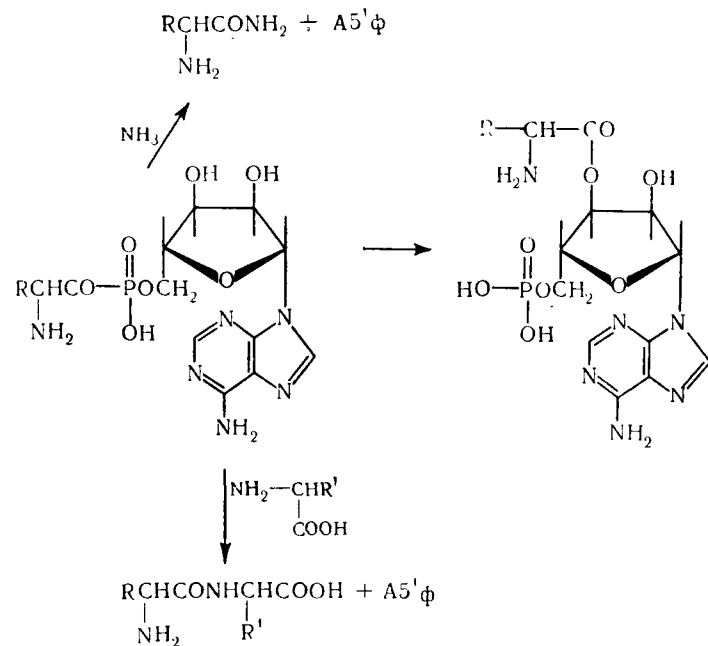


логи триптофана (5-метил-, 6-метил-) не активируются и подавляют рост немедленно [297].

Доказательство прямого участия аминоациладенилатов в биосинтезе отдельных пептидных связей получено синтезом карнозина из β-аланиладенилата и гистидина при использовании препаратов растворимых ферментов, выделенных из скелетной мускулатуры кролика и цыпленка [298].

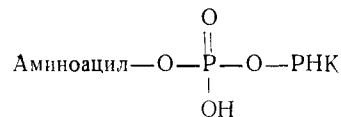
СВОЙСТВА АЦИЛ- И АМИНОАЦИЛАДЕНИЛАТОВ

В противоположность аденозин-5'-фосфату ациладенилат не изменяется при действии 5'-нуклеотидазы или дезаминазы аденозин-5'-фосфата. Смешанные ангидриды наиболее устойчивы в слабнокислом интервале pH, но быстро разрушаются при pH 2 (или ниже) при 100°, а при pH 10 (или выше) быстрый гидролиз происходит даже при 0° [299]. α-Аминоациладенилаты проявляют аналогичную неустойчивость, но при pH 7,2 они заметно менее устойчивы, чем бензоиладенилат; β-аланиладенилат занимает промежуточное положение. Устойчивость к гидролизу в нейтральной среде увеличивается при защите аминогруппы, как в случае карбобензоксинаминоациладенилатов [300]. Все эти соединения при обработке гидроксиламином дают гидроксамовые кислоты. Как смешанные ангидриды, они являются активными ацилирующими агентами в ряде неферментативных реакций. Так, например, при реакции аденилацетата с глицином, лейцином, цистином или глицилглицином образуются соответствующие N-ацетильные производные и адениловая кислота, а с глутатионом и коферментом А происходит S-ацетилирование. Скорость переноса ацетила сильно увеличивается в присутствии небольших количеств имидазола, и обработка аденилацетата имидазолом вызывает образование, кроме ацилимидазола и адениловой кислоты, еще и 2' (или 3')-О-ацетиладенозин-5'-фосфата [301]. Аналогичная этерификация гидроксильных групп имеет место и с аминоациладенилатами. Они легко изомеризуются в 2' (или 3')-аминокислотные эфиры аденозин-5'-фосфата, а обработка АТФ триптофаниладенилатом в водном растворе приводит к образованию 2' (или 3')-О-триптофаниладенозин-5'-трифосфата наряду с политриптофаном и обычными продуктами гидролиза смешанного ангидрида [302]. Внутримолекулярная этерификация продемонстрирована также реакцией триптофаниладенилата с C¹⁴-аденозин-5'-фосфатом с образованием меченого 2' (или 3')-О-триптофаниладенозин-5'-фосфата [300]. Такие эфиры аминокислот при подходящих условиях легко дают гидроксамовые кислоты при обработке гидроксиламином. Аминоациладенилаты быстро реагируют с аммиаком, образуя амиды аминокислот, и с аминокислотами, образуя пептиды [300], что аналогично поведению ациладени-



лата [301] и фосфоангидридов аминокислот [303, 304]. Перенос аминоацильной части молекулы аденилата на белок может также происходить неферментативным путем [300, 305].

При таком неферментативном переносе на рибонуклеиновую кислоту образуются производные аминокислот, сильно различающиеся по устойчивости [300]. Несомненно, некоторые из них образуются в результате ацилирования 6-аминогрупп цитозиновых остатков; кроме того, может происходить этерификация гидроксильных групп рибозы и обмен анионами в результате нуклеофильной атаки концевым моноэтерифицированным фосфатом. При этом образуются АМФ и смешанный ангидрид типа:



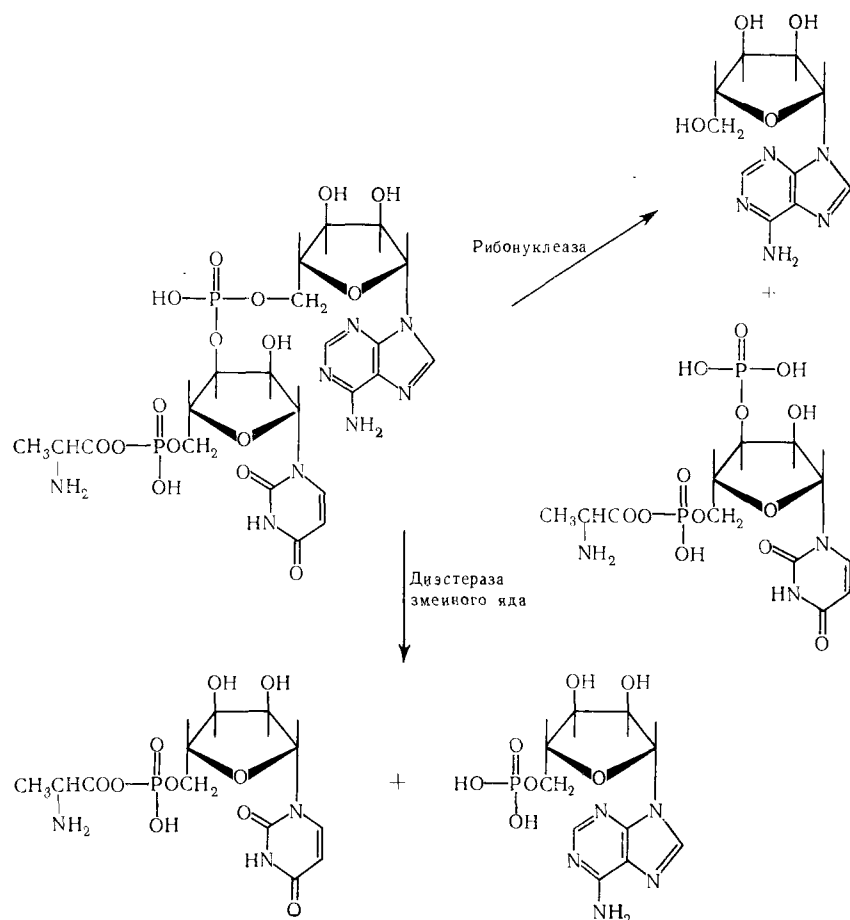
ПРОЧИЕ АНГИДРИДЫ И РОДСТВЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Ввиду биологической важности производных адениловой кислоты основное внимание было сосредоточено на ацил- и аминоацил-ангидридах аденозин-5'-фосфата. Однако в клетках асцитной карциномы Эрлиха было обнаружено производное аспарагиновой кислоты и уридин-5'-фосфата [306], а в экстрактах из дрожжей (*Torulopsis utilis*) отмечено также присутствие аспарагинового, глутаминового, аргининового и аланинового производных уридин-5'-пирофосфата [307]. Из печени и лактирующих млечных желез выделены производные глутаминовой и аспарагиновой кислот и аденозин-5'-пирофосфата [308]. В связи с рассмотрением такого рода соединений интересно отметить, что в пекарских дрожжах обнаружена обусловленная нуклеозид-5'-трифосфатом активация пептидов, которая связана с протеолитическими процессами (поскольку к диализированной неочищенной фракции белка не было добавлено никаких аминокислот или пептидов). На 1 моль образовавшегося (из активированного пептида) гидроксамата приходилось стехиометрическое количество освобожденного неорганического фосфата. Та же ферментативная фракция катализирует обмен радиоактивного фосфата с каждым из четырех рибонуклеозид-5'-трифосфатов [309].

Из спиртового экстракта пивных дрожжей выделено неустойчивое производное гуанозин-3'-фосфата [310]; возможно, оно представляет производное гуанозин-2',3'-циклофосфата. Последний выделен из *Chromobacterium violaceum*; предшественник его неизвестен [311].

Описаны различные нуклеотидпептидные соединения (строение некоторых из них к настоящему времени полностью не установлено), начиная от связанных с белками нуклеотидов [312] и кончая связанными с нуклеиновыми кислотами пептидами [313—315] или аминокислотами [316]. Из пекарских дрожжей и из *Saccharomyces cerevisiae* [317—321] выделены активированные по карбоксилу пептиды, связанные с нуклеотидами или олигонуклеотидами (как ангидридной, так и сложноэфирной связью) [465]. К числу этих соединений относится ангидрид тетрапептида и уридин-5'-фосфата, содержащий две молекулы аргинина и две молекулы аланина [322]. Это соединение представляет собой аргинилаланиларгинилаланил-5'-уридилат [323]. Из пивных дрожжей выделены другие ангидриды пептидов и уридин-5'-фосфата неизвестного пока строения. Кроме того, выделено и частично охарактеризовано несколько аминокислотных и пептидных ангидридов динуклеотида аденилил-5':3'-уридин-5'-фосфата [324, 325]. Один из них представляет собой аланиновое производное этого динуклеотида. Обработка его рибонуклеазой приводит к аденозину и аланилуридин-3',5'-дифосфату, тогда как при гидролизе диэстеразой змеиного яда получается адено-

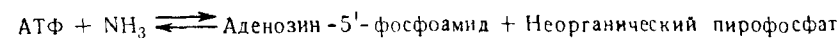
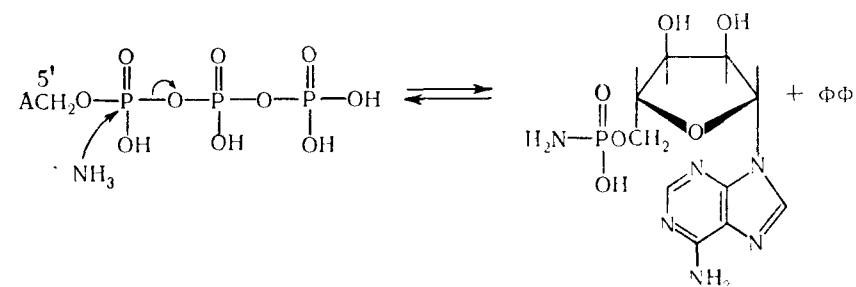
зин-5'-фосфат и уридил-5'-аланин [324, 325]. Общие свойства этого соединения и строение продуктов его гидролиза позволяют приписать ему указанную на схеме структуру; подтверждение такого строения получено синтезом этого ангидрида из динуклеотида и свободной аминокислоты при действии дициклогексилкарбодиимида [466].



В экстрактах бактерий [326, 327], грибов, тканях кролика [326] и печени млекопитающих [328—330] установлено присутствие нуклеотидпептидных производных, некоторые из которых имеют активированную карбоксильную группу. Безбелковые экстракты из печени морской свинки содержат ряд олигонуклеотидпептидов

с активированной карбоксильной группой [331, 332]. В состав этих производных входят, кроме пептидных компонентов, также и аденин, гуанин, цитозин, урацил и тимин; их образование наблюдалось как *in vivo*, так и *in vitro* [333]. В экстрактах хлореллы и дрожжей встречаются серусодержащие пептиднуклеотидные и пептидполидезоксинуклеотидные соединения [334—336]. Выделенные из *Streptococcus faecalis* нуклеотидпептиды имеют, вероятно, структуру полиадениловой кислоты, этерифицированной аминокислотным остатком по гидроксильной группе рибозы (находящейся, по-видимому, на конце цепи) [337].

Из *Polyporus squamosus* выделен комплекс пептида с цитидиловой кислотой [338]. Кислотный гидролиз его приводит к образованию цитидин-2'- и цитидин-3'-фосфатов; в исходном соединении не исключено наличие фосфоамидной связи. Аналогичное производное было обнаружено в кислых экстрактах мицелия *Penicillium urticae*. Присутствие фосфоамидной связи возможно также в обнаруженных в продуктах щелочного гидролиза рибонуклеиновой кислоты щелочностабильных комплексах [339, 340]. Здесь уместно, по-видимому, упомянуть, что первичным продуктом ферментативной активации аммиака в различных организмах является аденозин-5'-фосфоамид, образующийся из АТФ в результате обычной реакции пирофосфоролита [341].



Ферментативная реакция

Нуклеотидпептид, выделенный из печени быка, является, по-видимому, производным аденозин-(3'-фосфат)-5'-пирофосфата [342]. При ферментативном удалении 3'-фосфатной группы (под действием специфической 3'-нуклеотидазы) нуклеотидпептидная связь не затрагивается; продукт, кроме того, реагирует с периодатом. Поскольку это соединение сравнительно устойчиво как к кислотам, так и к щелочам и не образует гидроксисоединений с гидроксил-

амином, любая ангидридная или фосфоамидная структура в этом случае маловероятна. Пептид содержит глицин, β -аланин, глутаминовую кислоту (NH_2 -концевая), цистеиновую кислоту, таурин и компонент неустоявшегося строения, обладающий положительной реакцией на нингидрин. Если последний окажется оксиаминокислотой, то в структуре нуклеотидпептида возможно было бы присутствие эфирной связи между β -фосфатом аденозин-(3'-фосфат)-5'-пирофосфата и пептидом (через неидентифицированный компонент), т. е. нуклеотидпептид представлял бы собой P^1, P^2 -диалкилпирофосфат [342].

До сих пор неясно точное биологическое значение большинства соединений такого рода. Отмечено образование нуклеотидпептидов при распаде сывороточного альбумина, добавленного к митохондриальной фракции печени [343]. Возможно, нуклеотидпептиды являются продуктами катаболизма [344], а не предшественниками нуклеопротеидов, белков или нуклеиновых кислот в их синтезе *de novo*. В растущих дрожжах количество нуклеотидпептидных производных низко по сравнению с количеством свободных нуклеотидов и кажется очень маловероятным, чтобы они играли какую-то роль в синтезе белка [345]. Однако такая функция была постулирована [346], в частности, в отношении дрожжей.

СИНТЕЗ НУКЛЕОТИДАНГИДРИДОВ

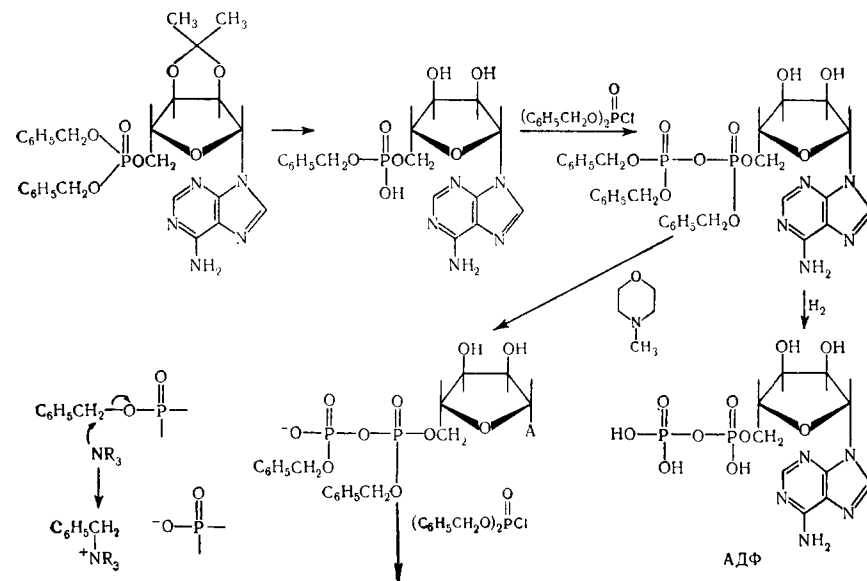
Синтез нуклеотидкоферментов состоит, по существу, в реакции нуклеотида (или защищенного нуклеотида) с другой кислотой с образованием ангидрида. Исследования в этой области были в основном направлены на приспособление и модификацию старых методов классической органической химии, применение карбодиимидов и родственных им реагентов и фосфоамидов. Сравнительно недавно разработан и нашел широкое применение простой, быстрый и эффективный метод, заключающийся в направленном нуклеофильном замещении одного из компонентов нуклеотидангидрида третьей кислотой (обмен анионов, аналогичный наблюдаемому в ферментативном синтезе нуклеотидкоферментов). Время от времени применялись и другие методы, такие, как этерификация предобразованного пирофосфата, но они имели в основном весьма незначительный успех.

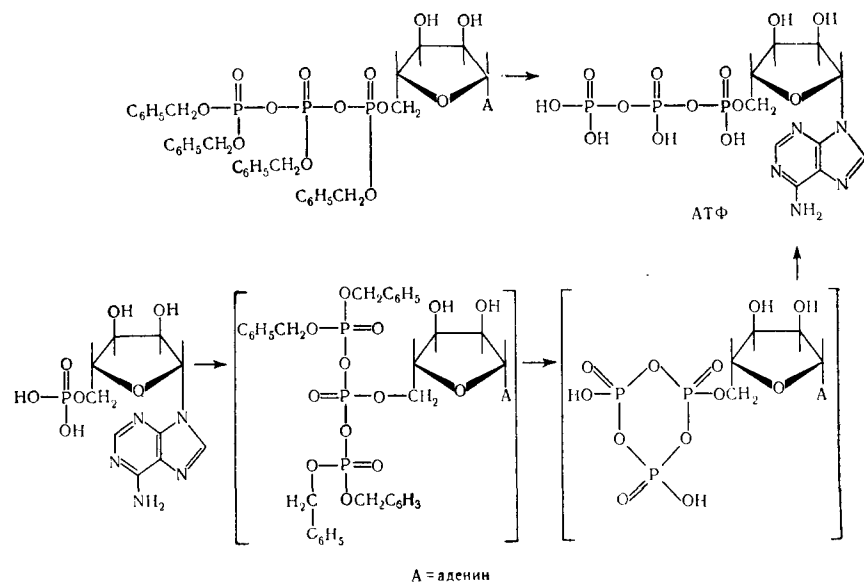
КЛАССИЧЕСКИЙ МЕТОД

Первый синтез нуклеотидкофермента (аденозин-5'-пирофосфата) был осуществлен в 1947 г. Беддиди и Тоддом [347], применившими классический метод получения смешанных ангидридов — обработку соли кислоты хлорангидридом. После кислотного гидролиза 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-дibenзилфосфата в мягких усло-

виях был получен аденозин-5'-бензилфосфат, серебряную соль которого обрабатывали дибензилхлорфосфатом для получения аденозин-5'-трибензилпирофосфата. После удаления бензильных групп каталитическим гидрогенолизом получившийся аденозин-5'-пирофосфат был выделен в виде акридинового комплекса. Расширение этого метода путем использования образования четвертичного основания [348] с N-метилморфолином для избирательного удаления одной бензильной группы из полностью этерифицированного аденозин-5'-пирофосфата позволило получить аденозин-5'-трифосфат в результате обработки серебряной соли пирофосфата дибензилхлорфосфатом с последующим гидрогенолизом бензильных групп [349]. При применении фенольных растворителей происходит частичное дебензилирование неустойчивых полностью защищенных полифосфатов, поэтому удаление бензильной группы путем образования четвертичного основания оказывалось в этих случаях ненужным. Благодаря такому *in situ* фенольному дебензилированию промежуточного бензилированного аденозин-5'-трифосфата побочные реакции диспропорционирования были сведены к минимуму и тем самым улучшен выход конечного продукта.

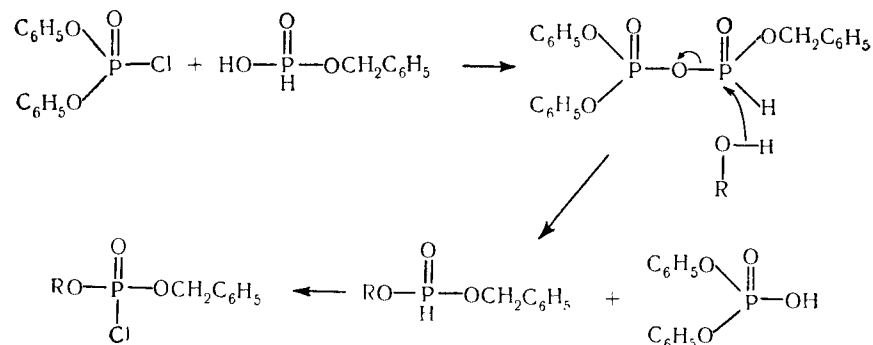
В другом синтезе аденозин-5'-трифосфата дисеребряная соль аденозин-5'-фосфата непосредственно обрабатывалась избытком дибензилхлорфосфата с последующим гидрогенолизом продукта [350]. Получившийся трифосфат оказался идентичен природному АТФ,



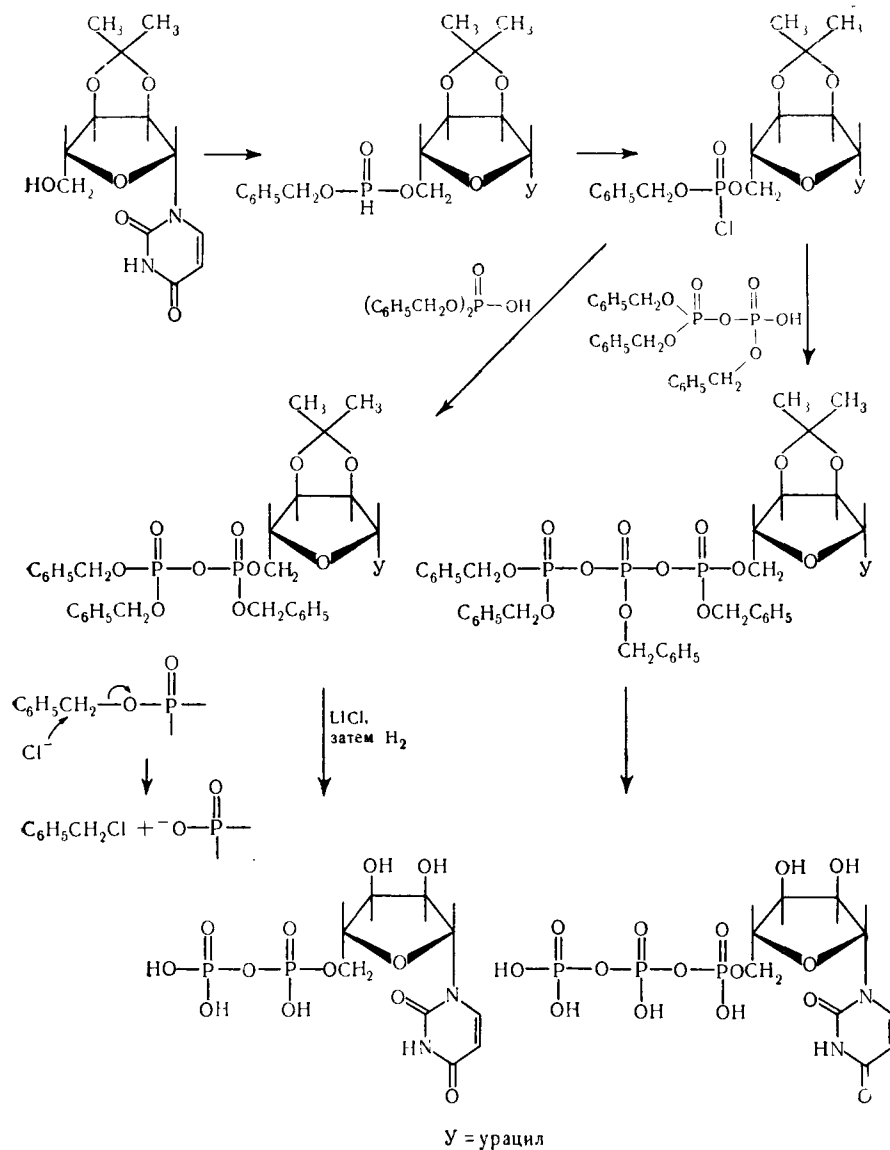


и не получено никаких доказательств образования ожидаемой изомерной формы, отсутствие которой было, по-видимому, обусловлено образованием циклического триметафосфата (или бензилированного промежуточного продукта) с последующим раскрытием цикла. С другой стороны, частичное дебензилирование может происходить на стадии конденсации, приводящее к образованию диэтерифицированного пирофосфата с последующей его реакцией с дибензилхлорфосфатом.

Со времени этого раннего исследования введение ряда новых методов значительно облегчило разработку более удобных спосо-

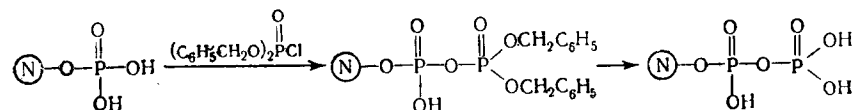


бов синтеза. Тем не менее классический метод, несмотря на присущие ему существенные недостатки, оказался довольно успешным, особенно при использовании смешанного ангидрида бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот в качестве реагента для синте-

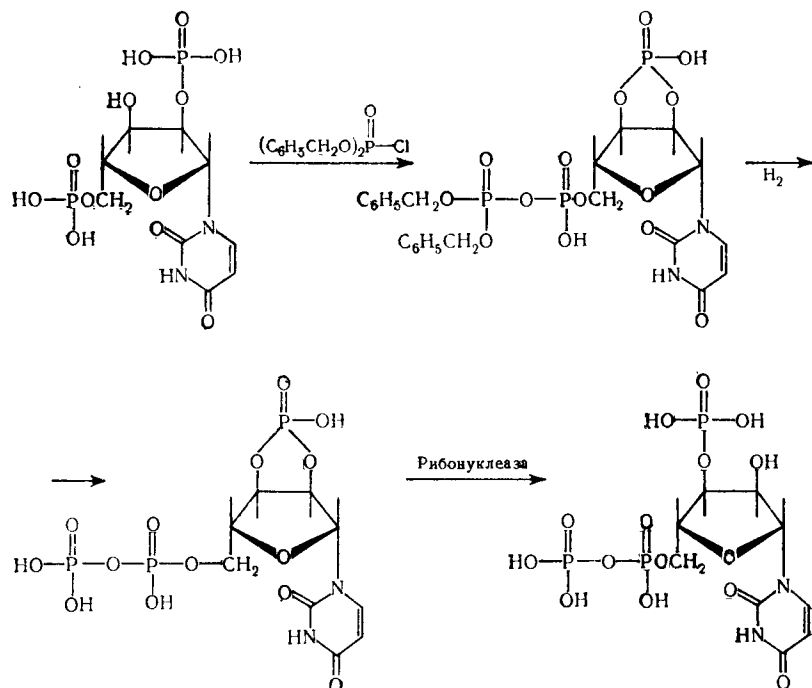


за нуклеозидбензилфосфитов [351]. Как и дибензилфосфит, эти производные могут окисляться до хлорфосфата под действием N-хлорсукцинимиды [352] (см. схему на стр. 236).

Обработка 2',3'-О-изопропилиденуридин-5'-бензилхлорфосфата триэтиламиниевой солью дибензилфосфата дала продукт, из которого бензильные группы были удалены нуклеофильным замещением хлоридом лития (или обработкой фенолом) с последующим каталитическим гидрогенолизом оставшихся бензильных групп. После снятия изопропилиденовой защитной группы кислотным гидролизом в мягких условиях получен уридин-5'-пирофосфат [352]. Аналогичным образом при реакции 2',3'-О-изопропилиденуридин-5'-бензилхлорфосфата с триэтиламиниевой солью трибензилпиро-

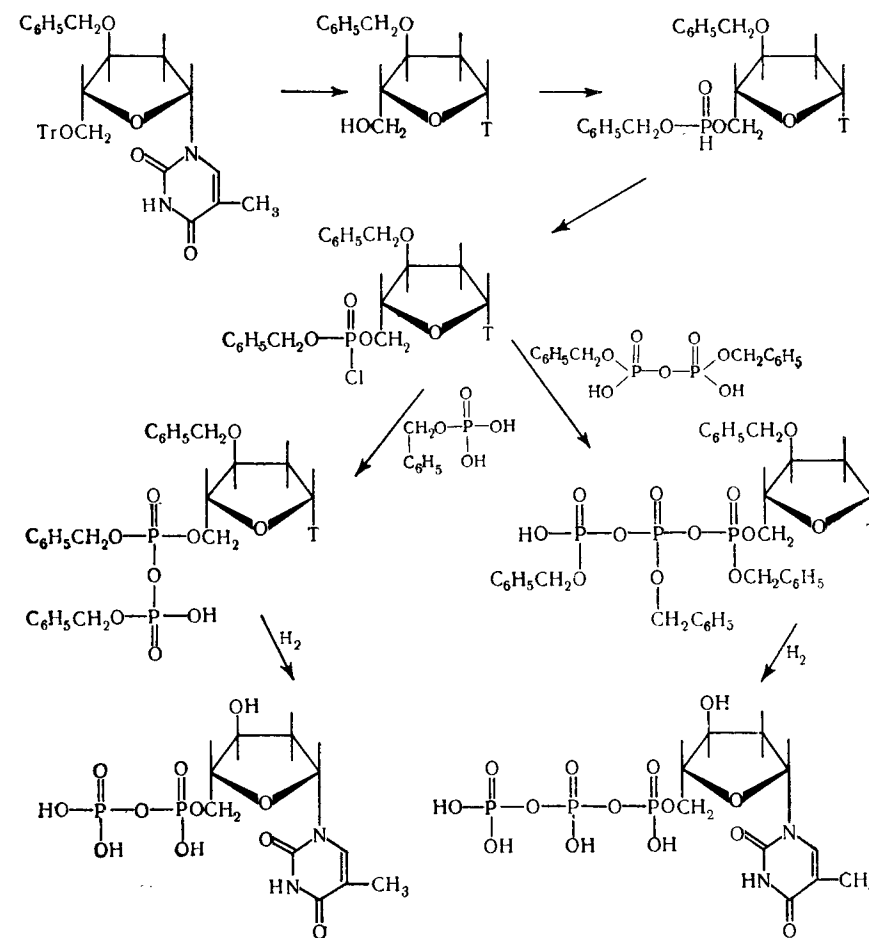


(N) = нуклеозид-5' (рибо или дезоксирибо)



фосфата с последующим удалением защитных групп образуется уридин-5'-трифосфат [353] (см. схему на стр. 237).

Поскольку тетраэфиры пирофосфатов особенно чувствительны к самым разнообразным обменным реакциям вследствие анионной атаки [354], выходы в реакции такого типа были значительно улучшены применением в реакции с хлорфосфатом соли фосфомоноэфира, так как получающийся промежуточный триэтерифицированный пирофосфат, будучи ионизированным, гораздо более устойчив к нуклеофильной атаке. Так, например, аденозин-5'-, уридин-5'- и тимидин-5'-пирофосфаты легко получают с очень высокими

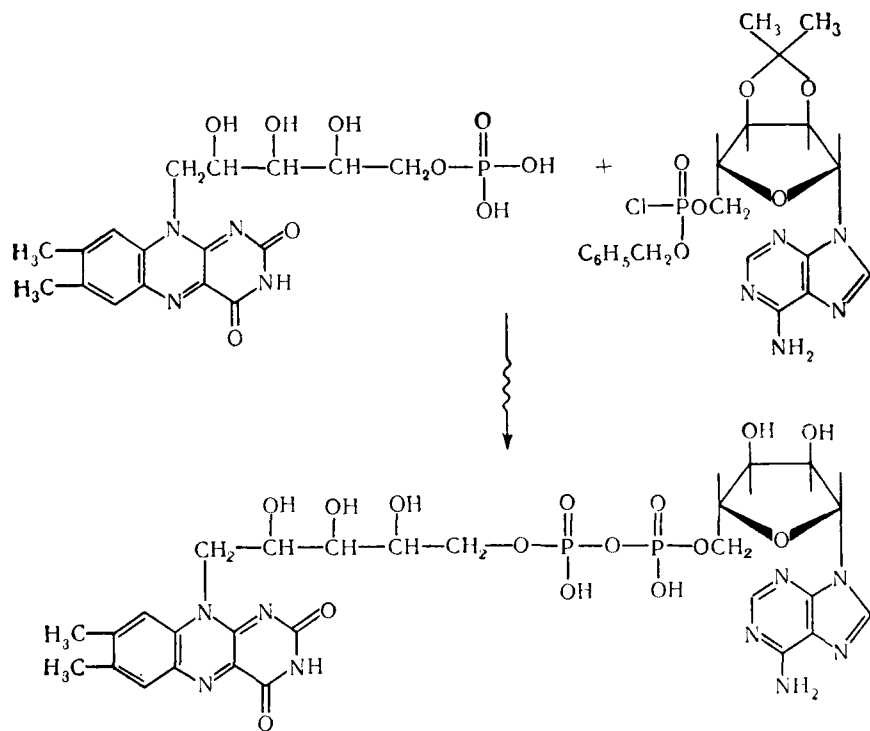


Tg = трифенилметил
T = тимин

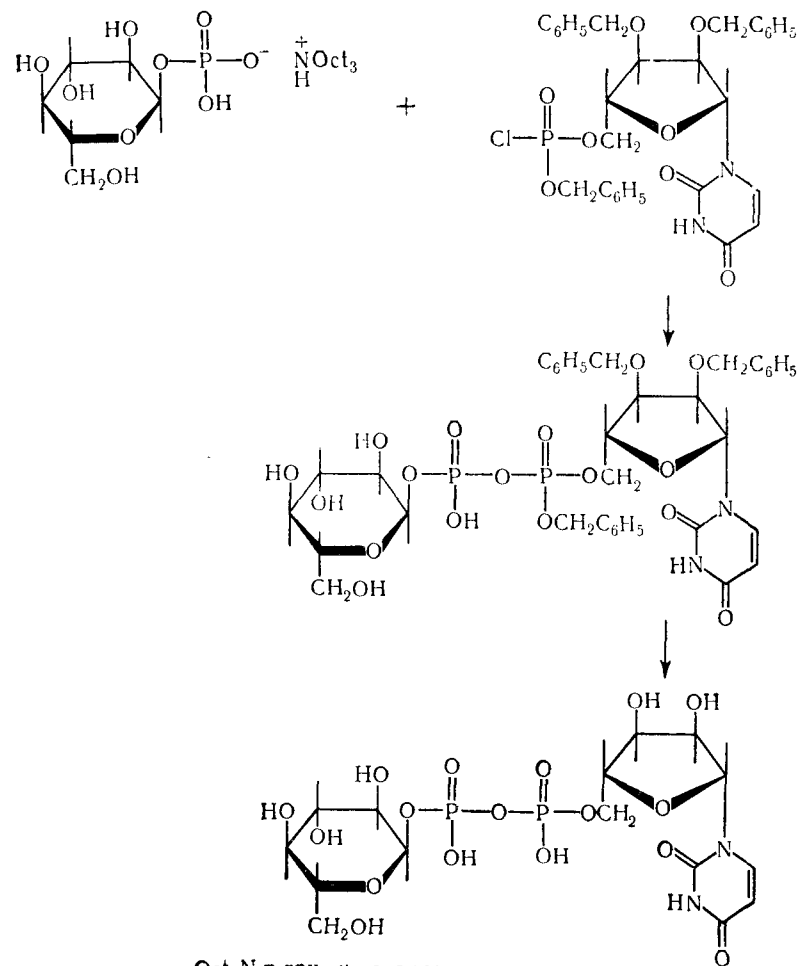
выходами при обработке три-*n*-октиламмониевой соли нуклеотида дибензилхлорфосфатом с последующим удалением бензильных групп из продукта посредством гидрогенолиза [355]. Этот метод был также использован для синтеза 4-азауридин-5'-пирофосфата [356], N¹-метилуридин-5'-пирофосфата [357] и других нуклеозид-5'-пирофосфатов [358]. По причинам растворимости метилтри-*n*-октиламмониевые соли гуаниновых и цитозиновых нуклеотидов особенно полезны при реакциях такого типа [358]. При аналогичной обработке уридин-2'(3'),5'-дифосфата дибензилхлорфосфатом с последующим гидрогенолизом продукта получается уридин-2',3'-циклофосфат-5'-пирофосфат [355] (см. схему на стр. 238).

Для получения тимидин-5'-пирофосфата был использован другой метод, состоящий в синтезе защищенного нуклеозид-5'-бензилхлорфосфата с последующей его конденсацией с бензилфосфатом. Такой путь был применен для синтеза тимидин-5'-трифосфата, исходя из дибензилпирофосфата [359] (см. схему на стр. 239).

Первый синтез кофермента, диэфира пирофосфорной кислоты, — синтез флавинаденидинуклеотида — также был осуществлен с по-



мощью хлорфосфатного метода. Кроме обычных технических трудностей, задача усложнялась присутствием смежной гидроксильной группы, которая могла атаковать промежуточный этерифицированный пирофосфат (смешанный ангидрид) с образованием рибофла-

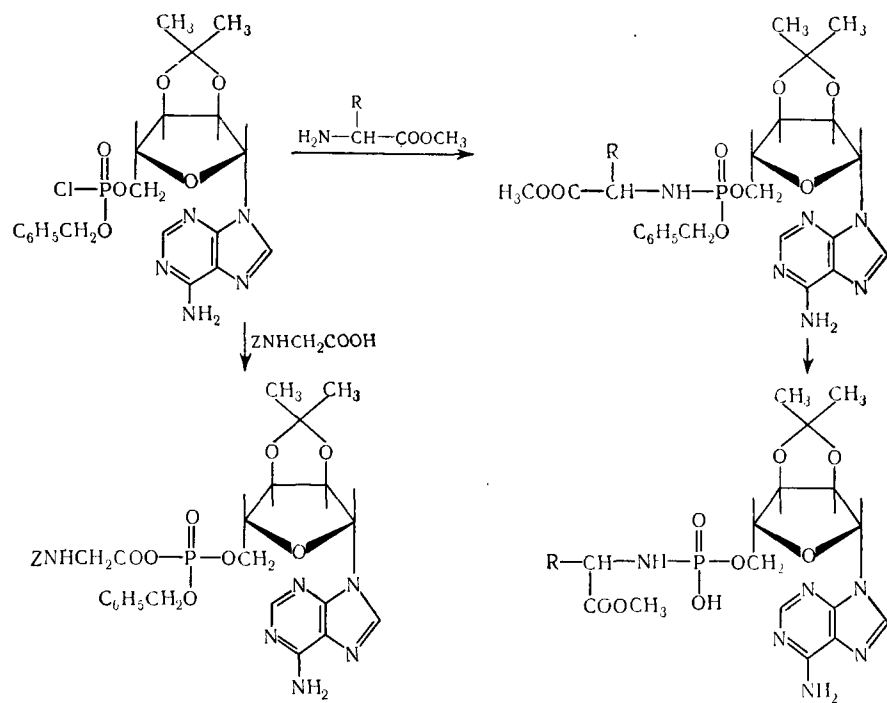


Oct₃N = три-*n*-октиламин

вин-4',5'-циклофосфата [360]. Тем не менее Кристи, Кеннеру и Тодду удалось получить ФАД путем обработки моноталлиевой соли рибофлавин-5'-фосфата 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-бензилхлорфосфатом в растворе фенола. При фенольном дебензилировании продукта с последующим кислотным гидролизом в мягких

условиях для удаления изопропилиденовой защитной группы получается сложная смесь, содержащая около 6% кофермента, из которой с помощью хроматографических методов был выделен чистый ФАД [361].

Довольно низкий выход обусловлен до некоторой степени условиями гидролиза, необходимыми для удаления защитных групп. Поскольку уридиндифосфоглюкоза (УДФГ) менее устойчива, чем ФАД, то для защиты нуклеозидных гидроксильных групп вместо изопропилиденовых были применены бензильные группы (легко удаляемые гидролизом). Трудности в отношении растворимости α -D-глюкозо-1-фосфата были преодолены применением солей с аминами, содержащими длинные углеродные цепи. Бензилирование 5'-О-тритилуридина с последующим удалением тритильной группы дает 2',3'-ди-О-бензилуридин, из которого после фосфорилирования смешанным ангидридом бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот получается 2',3'-ди-О-бензилуридин-5'-бензилфосфит. Обработка хлорфосфата моно(три-*n*-октиламмониевой) солью α -D-глюкозо-1-фосфата в бензольном растворе дает продукт, из кото-



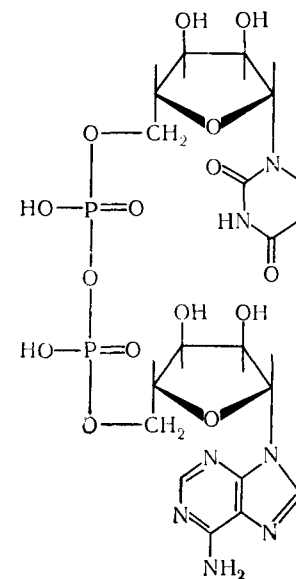
Z = карбобензокси

рого после удаления бензильных групп каталитическим гидрогенолизом получается УДФГ [362]. Аналогичным образом при использовании α -D-галактозо-1-фосфата осуществлен первый синтез уридиндифосфогалактозы [362] (см. схему на стр. 241).

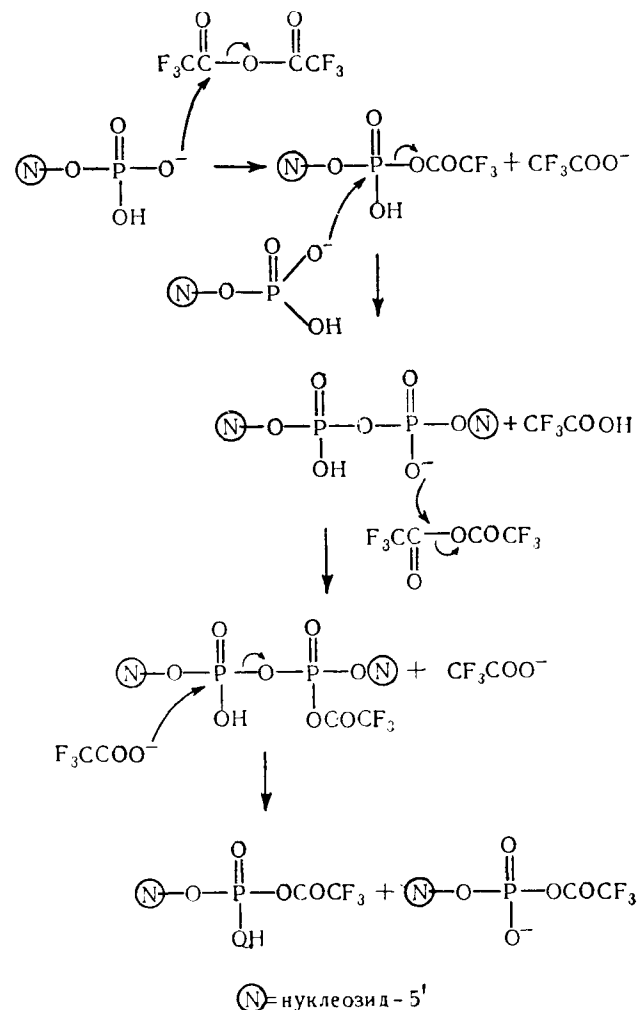
Промежуточный нуклеозидхлорфосфат применен также для получения смешанных ангидридов 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-бензилфосфата и карбобензоксиаминокислот (лейцина и глицина) [363, 364]. При реакции того же нуклеозидхлорфосфата с аминокислотами, имеющими защищенную карбоксильную группу, образуются фосфоамидные производные, из которых после удаления бензильной группы посредством гидрогенолиза получают моноэфиры фосфоамидов (см. схему на стр. 242).

Неудобство использования полностью этерифицированных пирофосфатных продуктов было продемонстрировано на примере синтеза P^1 -аденозин-5'- P^2 -уридин-5'-пирофосфата из 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-бензилхлорфосфата и 2',3'-О-изопропилиденуридин-5'-бензилфосфата, или из аденозинбензилфосфата и уридинхлорфосфата. После удаления бензильных групп (обработкой тиоцианатом аммония) и изопропилиденовых групп (кислотным гидролизом) в обоих случаях был получен также симметричный динуклеозидпирофосфат [365].

Хотя в пирофосфатном синтезе широко применялись хлорфосфаты, можно использовать и ангидриды нуклеотидов с другими кис-

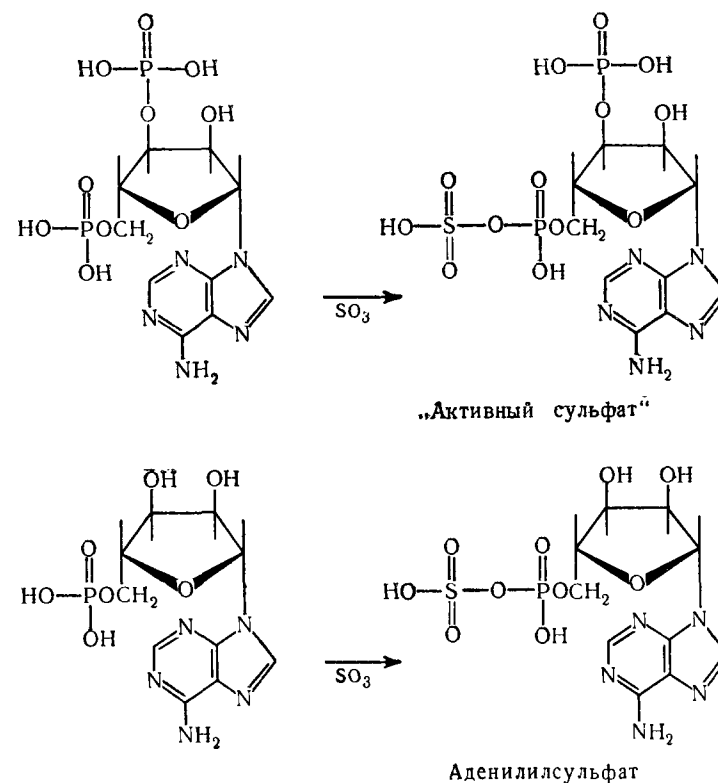


лотами, такими, как дифенилфосфорная кислота, *n*-толуолсульфокислота или трифторуксусная кислота (в пределах ограничений, налагаемых обменными реакциями). Так, например, обработка нуклеозид-5'-фосфата трифторуксусным ангидридом дает P¹, P²-ди-



нуклеозид-5'-пирофосфат, но промежуточный смешанный ангидрид получить не удается [366]. При обработке смеси аденозин-5'-фосфата и никотинамиднуклеотида трифторуксусным ангидридом был получен с низким выходом никотинамидадениндинуклеотид (наряду

с двумя симметричными пирофосфатами) [367]. Тем же способом из смеси рибофлавин-5'-фосфата и нуклеозид-5'-фосфата были получены флавинадениндинуклеотид и гуаниновый, цитозиновый, урациловый и никотинамидный его аналоги [368]. Трифторуксусный



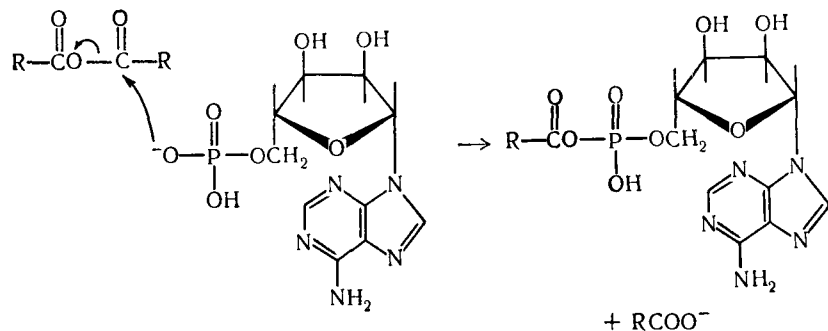
ангидрид является отчасти расщепляющим реагентом, будучи эффективным как для расщепления, так и для синтеза пирофосфатных связей [367].

Как аденил-5'-сульфат (аденозин-5'-фосфосульфат), так и аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфат («активный сульфат») были получены обработкой соответствующего нуклеотида комплексом пиридина с серным ангидридом в водном растворе бикарбоната натрия [369, 370]. При обработке аденозин-5'-пирофосфата этим комплексом получается аденозин-5'-пирофосфорилсульфат с чрезвычайно низким выходом [371].

АЦИЛАДЕНИЛАТЫ

При действии алкилхлорформиата на нуклеотиды в водных или безводных растворах были получены ангидриды нуклеозид-5'-фосфатов с эфирами угольной кислоты [358]. Они устойчивы к действию яда гремучей змеи. При определенных условиях может образоваться ангидрид эфира угольной кислоты [372].

Простой и эффективный метод синтеза смешанных ангидридов нуклеозид-5'-фосфатов и карбоновых кислот заключается в реакции нуклеотида с ангидридом карбоновой кислоты. Так, обработка рибофлавин-5'-фосфата уксусным ангидридом в водном пиридине дает рибофлавин-5'-ацетилфосфат, а из аденозин-5'-фосфата получается соответствующий аденилацетат [373, 374]. Аналогичным способом из аденозин-5'-фосфата и ангидрида соответствующей карбоновой кислоты получены бензоил- [375], пропионил- [376], бутирил- [377], капроноил- [378, 417], каприлоил- [378, 417], пальмитил- [379] и липоиладенилаты [380]. Для получения ацетил- [374] и гиппуриладенилатов [375] был применен хлорангидрид карбоновой кислоты.

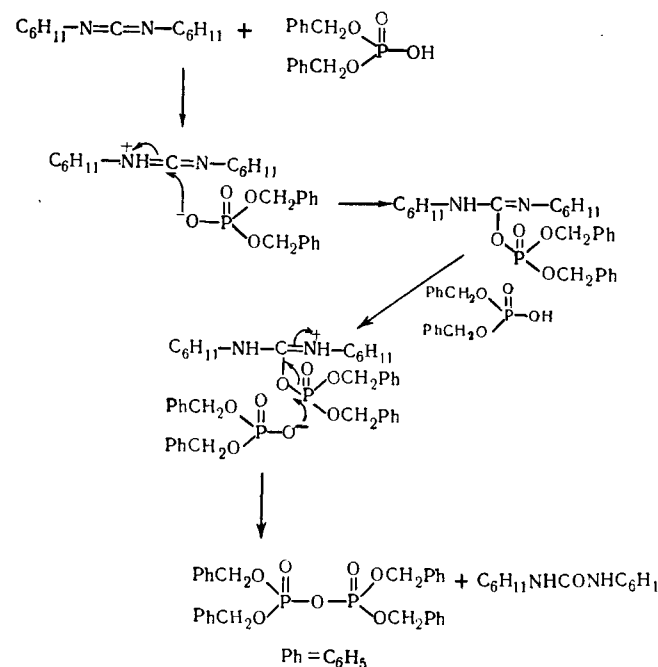


Однако обработка нуклеотида 0,5 моля уксусного ангидрида приводит к образованию P^1, P^2 -диаденозин-5'-пирофосфата [381] в результате нуклеофильного замещения аденозин-5'-фосфатом ($pK \sim 6,0$) более сильного ацетатного аниона ($pK \sim 4,8$) в промежуточном аденилацетате. О расщепляющей способности трифторуксусного ангидрида упоминалось выше; P^1, P^2 -диаденозин-5'-пирофосфат также расщепляется уксусным ангидридом (вследствие аддитивных свойств карбонильной группы), но устойчив к нуклеофильной атаке ионом ацетата, поскольку это означало бы освобождение менее устойчивого аниона.

Биохимический интерес к процессам активации и переноса жирных кислот стимулировал синтез главным образом ациладенилатов. Те же методы применимы, но-видимому, и к другим нуклеозид-5'-фосфатам.

КАРБОДИИМИДЫ И РОДСТВЕННЫЕ РЕАГЕНТЫ

Вследствие трудностей, встречающихся при синтезе коферментов классическим методом, применение его несколько ограничено, и поэтому возникла необходимость в более эффективных, пусть даже менее изящных, методах. Первые исследования показали, что при обработке алифатической кислоты замещенными карбодиимидами можно получить ангидриды карбоновых кислот [382]. Применение реагентов такого типа, особенно дициклогексилкарбодиимида, для синтеза пирофосфатов из фосфорной кислоты и ее эфиров предоставило сравнительно простой метод синтеза нуклеотидангидридов [383]. Хотя этому методу свойственны некоторые недостатки, как, например, отсутствие в некоторых случаях [384] воспроизводимости приводимых в литературе выходов и образование всех трех возможных ангидридов для данной пары кислот в случае, когда анионы сравнимы по нуклеофильности, все же карбодии-

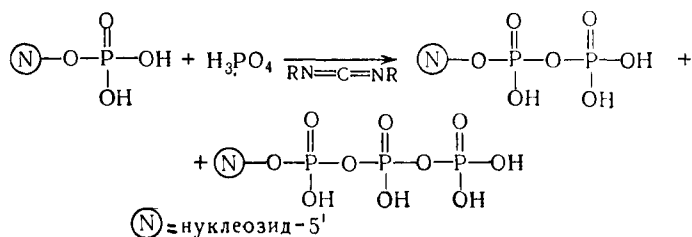


ими́ды и родственные им реагенты нашли успешное применение для синтеза большого числа нуклеотидных производных. Если кофермент или ангидрид содержат *цис*-гидроксильную группу, смежную с пирофосфатной связью (например, флавинаденинди-

нуклеотид, уридиндифосфоглюкоза), выходы очень низки из-за образования циклического фосфата [385, 386]. В общем, однако, применение соответствующих условий реакции позволяет достигнуть удовлетворительных выходов.

При обработке дибензилфосфорной кислоты дициклогексилкарбодиимидом в безводной среде быстро образуется тетрабензилпирофосфат и выделяется дициклогексилмочевина [383].

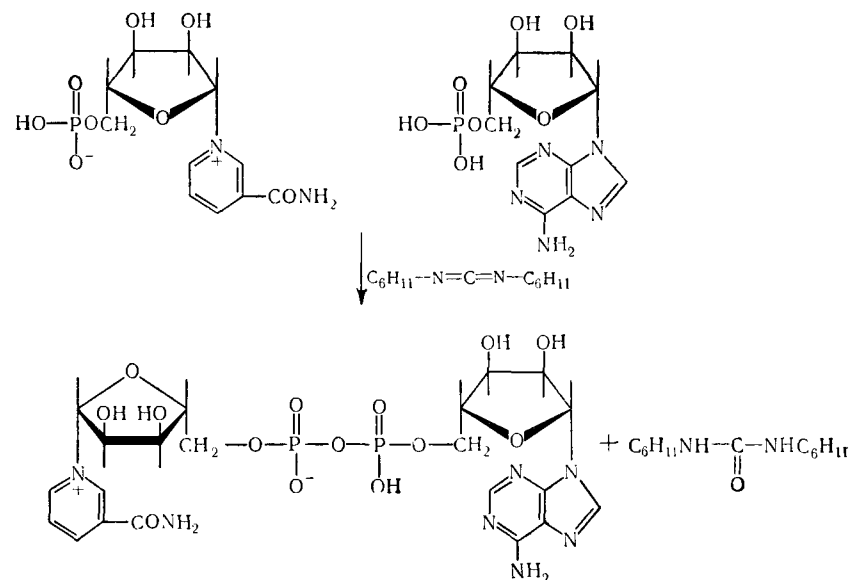
При использовании того же реагента были получены различные аналогичные пирофосфаты, включая P^1, P^2 -дифенилпирофосфат, и было обнаружено, что хотя выходы лучше при проведении реакции в безводной среде, присутствие воды существенно не препятствует реакции при применении избытка карбодиимида [383]. Приложение этого метода к нуклеотидам показало, что P^1, P^2 -диуридин-5'-пирофосфат можно получить из пиридиниевой соли уридин-5'-фосфата и дициклогексилкарбодиимида в пиридине [366]. Нуклеозид-5'-полифосфаты были синтезированы аналогичным способом, конденсацией мононуклеотидов с фосфорной кислотой; при этом получались сложные смеси, состав которых можно было в некоторой степени контролировать изменением соотношения реагирующих веществ и условий реакции. И в этом случае безводная среда не являлась существенным фактором, но в присутствии воды (для повышения растворимости нуклеотидов) необходим большой избыток карбодиимида и предпочтительно применение безводных пиридиновых растворов три-*n*-бутиламмониевых солей нуклеотидов [387]. Общая применимость метода была продемонстрирована синтезом пирофосфатов и трифосфатов (выделенных с помощью ионообменной хроматографии) всех основных природных нуклеозидов, а также



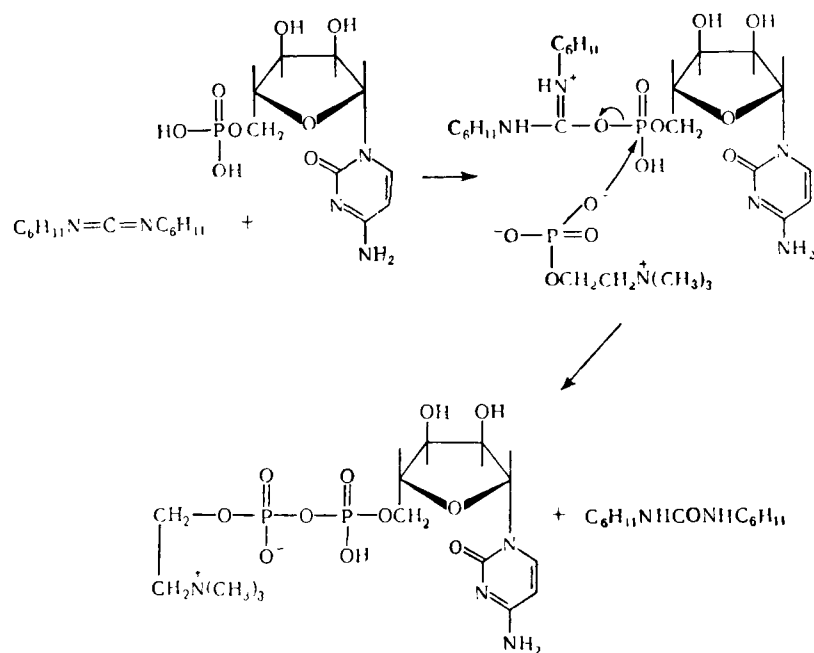
их аналогов, таких, как 8-азагуанозин [388].

Применение этого метода для синтеза некоторых несимметричных дизфиров пирофосфатов также оказалось весьма успешным. Так, например, реакция дициклогексилкарбодиимида со смесью N-D-рибофуранозилникотинамид-5'-фосфата и аденозин-5'-фосфата в водном пиридине дает в качестве основного продукта никотинамидадениндинуклеотид (НАД), значительно меньшее количество диадено-

зин-5'-пирофосфата и очень мало P^1, P^2 -ди(никотинамиднуклеозид-5')-пирофосфата [389]. С помощью ионообменной хроматографии смеси был получен неочищенный препарат НАД, состоящий в основном из активной β -формы вместе с некоторым количеством α -аномера. Алкогольдегидрогеназой из дрожжей β -форма была восстановлена до щелочеустойчивого дигидропроизводного, а неизменившийся α -изомер был разрушен обработкой щелочью. Повторное окисление дигидросоединения позволило получить чистую β -форму никотинамидадениндинуклеотида, идентичную природному коферменту. Аналогичная процедура после замены аденозин-5'-фосфата смесью аденозин-2',5'- и аденозин-3',5'-дифосфатов дает никотинамидадениндинуклеотид-2'-фосфат (НАДФ, кофермент II), наряду с изомерной, не встречающейся в природе формой, содержащей 3'-фосфатную группу в аденозиновой части молекулы [389].



При действии дициклогексилкарбодиимида на смесь фосфохолина и цитидин-5'-фосфата получается цитидиндифосфохолин с низким выходом в смеси с P^1, P^2 -дихитидинпирофосфатом, причем образования P^1, P^2 -дихитидинпирофосфата не обнаружено [390]. Как и в случае никотинамиднуклеотида, вследствие биполярного характера фосфохолина его анион является, по-видимому, более слабым нуклеофилом, чем цитидин-5'-фосфат (или аденозин-5'-фосфат), и, следовательно, первоначальное присоединение фосфата к карбодиимиду происходит предпочтительно по фосфату пиримидинового (или

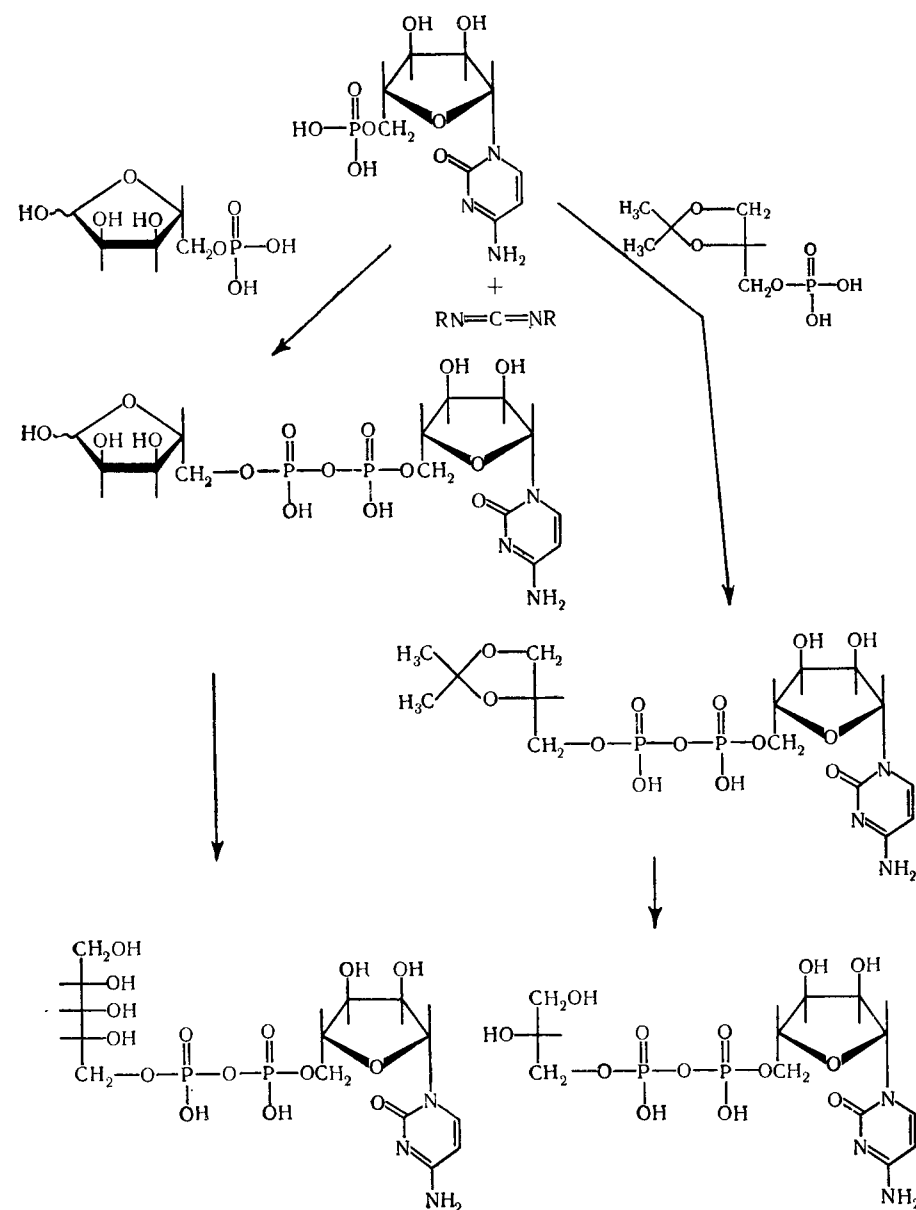


пуринового) нуклеотида, а затем следует менее специфичная нуклеофильная атака аддукта любым из этих двух анионов [391].

Тем же методом получены аналогичные аденозин-, гуанозин- и уридиндифосфохолины [390], а также промежуточные продукты липидного обмена, такие, как цитидиндифосфоэтанолламин [390] и цитидиндифосфодиглицериды [392] (ЦДФ-дипальмитин и ЦДФ-дилаурин). Для синтеза цитидиндифосфоглицерина необходимо защитить глицериновый остаток, во избежание циклизации. Цитидиндифосфоглицерин был получен из цитидин-5'-фосфата и 1,2-О-изопропилиден-L-глицерин-3-фосфата под действием дициклогексилкарбодиимида с последующим удалением изопропилиденовой защитной группы [393].

В случае синтеза цитидиндифосфорибита нет необходимости защищать спиртовые группы благодаря применению в пиродифосфатном синтезе цитидин-5'-фосфата и D-рибофуранозо-5-фосфата (с использованием приблизительно 10^2 молярного избытка дициклогексилкарбодиимида) с последующим восстановлением получившейся цитидиндифосфорибозы боргидридом натрия [394].

Из других примеров применения дициклогексилкарбодиимида можно упомянуть синтез аденозин-5'-фосфосульфата [395] (реак-



ционная смесь в этом случае становится сложнее вследствие сульфотерификации углеводных гидроксильных групп), а также люциферил- и оксиферилладенилатов (являющихся промежуточными продуктами реакций, обуславливающих свечение у светляков) [396]. При обработке этим реагентом смеси фосфата дегидроэпиандростерона и аденозин-5'-пирофосфата получено производное Р¹-аденозин-5'-Р³-стероидтрифосфата [397, 398].

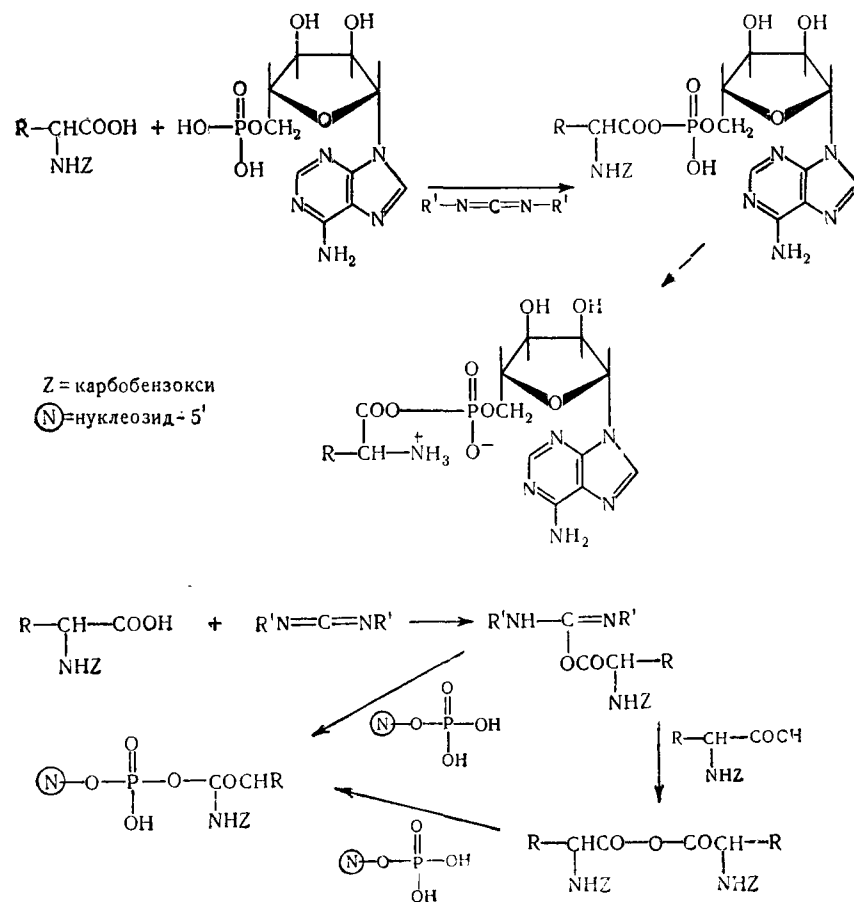
АМИНОАЦИЛАДЕНИЛАТЫ

Смешанные ангидриды аминокислот и аденозин-5'-фосфата (и, по-видимому, других нуклеозид- и дезоксинуклеозид-5'-фосфатов) можно получить при обработке смеси нуклеотидов и свободных аминокислот дициклогексилкарбодиимидом в водном пиридине [399]. Значительно более высокие выходы получаются при использовании N-карбобензоксикаминокислот с последующим удалением защитных групп из продукта гидрированием [400, 401]. В другом методе с использованием бензилмеркаптоформильных производных аминокислот свободный ациладенилат получается окислением защищенного промежуточного продукта надбензойной кислотой [402].

Поскольку карбобензоксикаминокислоты и нуклеотиды сильно различаются по своему нуклеофильному характеру, смешанные ангидриды получаются с довольно высокими выходами, а динуклеозидпирофосфат — лишь в незначительном количестве. В образовании первоначального аддукта участвует, вероятно, аминокислота (т. е. более сильный нуклеофильный агент), затем он атакуется анионом нуклеотида, давая смешанный ангидрид [403]. При атаке аддукта карбоксил-ионом может получиться ангидрид карбобензоксикаминокислоты, который затем быстро вступил бы в реакцию с нуклеотидом (или любым динуклеозид-5'-пирофосфатом) также с образованием смешанного ангидрида.

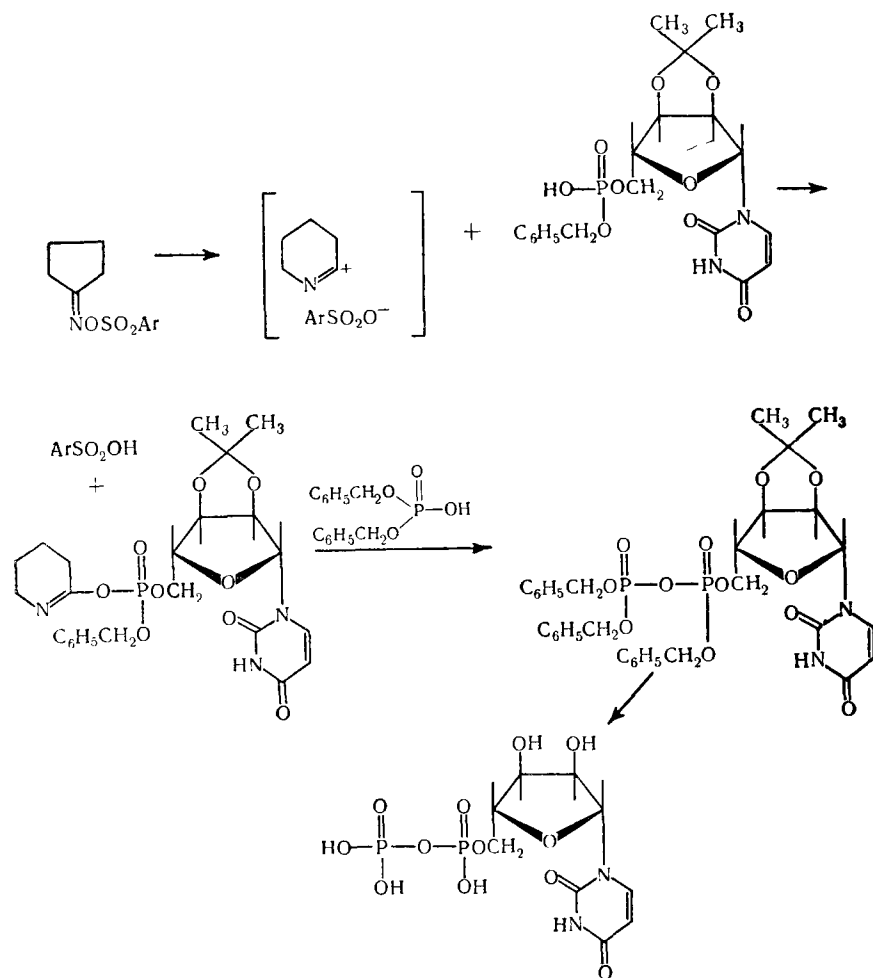
Распространение этого метода на синтез смешанных ангидридов пептидов и нуклеотидов не дает достаточно удовлетворительных результатов, но все же дициклогексилкарбодиимидный метод был применен для получения, правда с низким выходом, лейцил-глициладенилата [404], глицил-L-лейциладенилата [405], глицил-глициладенилата [405] и L-аргинил-L-аланил-L-аргинил-L-аланилуридил-5'-ата [406], исходя из нуклеотида и соответствующего пептида.

С помощью дициклогексилкарбодиимида были также получены ангидриды жирных кислот и аденозин-5'-фосфата. Учитывая примененные условия реакции, кажется весьма вероятным, что первой ступенью реакции является образование *in situ* диацилангидрида, который затем реагирует с нуклеотидом [407, 418].



РОДСТВЕННЫЕ РЕАГЕНТЫ

Другие изученные карбодиимиды, в том числе ди-*n*-толилкарбодиимид, оказались в основном менее подходящими, чем дициклогексилкарбодиимид; иногда наблюдалось образование ацилмочевин. Реакция кислоты с карбодиимидом, согласно предполагаемому механизму [391], зависит от основности карбодиимида и нуклеофильности кислоты. Присутствие оснований в реакционной среде и их природа также оказывают некоторое влияние, поскольку карбодиимид и такое основание конкурируют за протон. Кроме того, на скорость реакции до некоторой степени влияет природа растворителя.

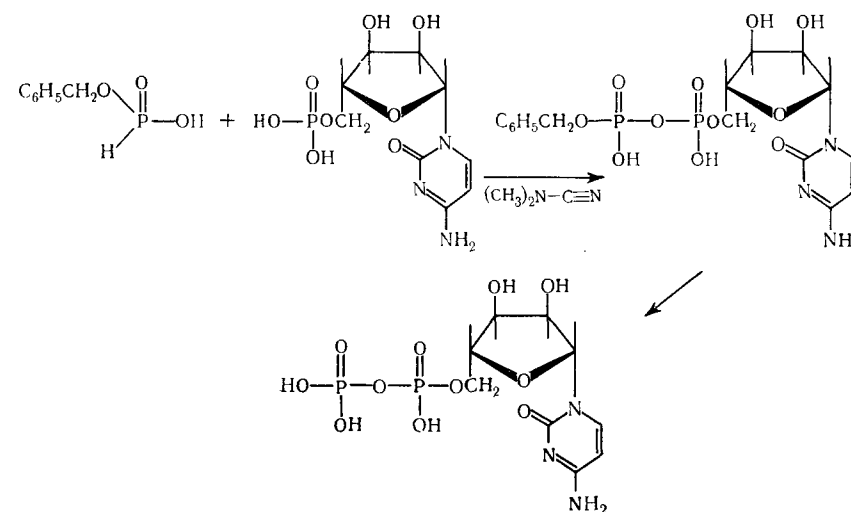
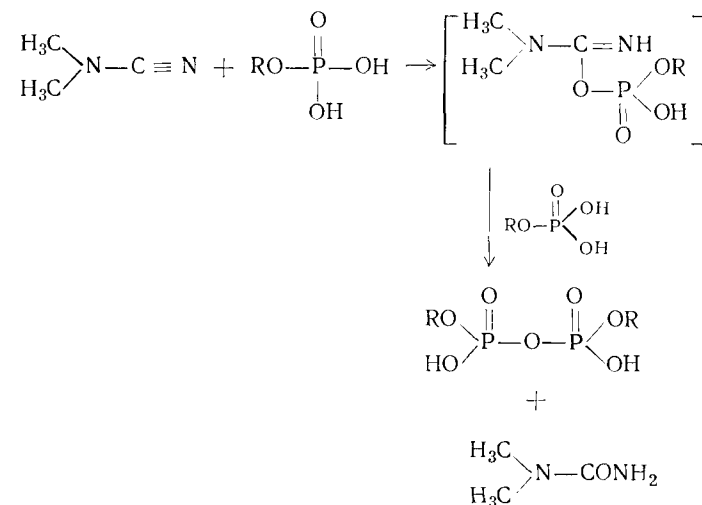


5'-пирофосфат (из которого гидрогенолизом получен АДФ) наряду с двумя симметричными пирофосфатами. Тот же реагент с аденозин-5'-фосфатом и избытком фосфорной кислоты дает аденозин-5'-трифосфат [409].

В качестве реагентов для синтеза пирофосфатов были применены цианамид и диалкилцианамиды [365]. Так, при действии диметилцианамид на смесь двух нуклеотидов был получен Р¹-аденозин-5'-Р²-уридин-5'-пирофосфат; как и в случае карбодиимида, наблюдалось образование всех трех возможных пирофосфатов.

Аналогично при нагревании цитидин-5'-фосфата с бензилфосфатом в водном диметилцианамиде и последующем дебензилировании продукта был получен цитидин-5'-пирофосфат [365].

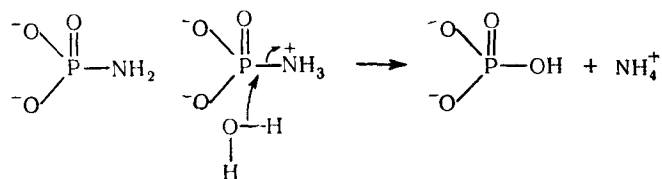
Исследованы также другие реагенты, как, например, трихлор-ацетонитрил [410, 464] и хлорангидрид циануровой кислоты [411].



ФОСФОАМИДЫ

Помимо низкой специфичности в синтезе пиррофосфатов, карбодимидный метод находит ограниченное применение для синтеза таких коферментов, как флавинадениндинуклеотид, уридиндифосфоглюкоза или кофермент А, из-за циклизации и других нежелательных реакций. Более успешный синтез ряда коферментов такого типа (включая вышеупомянутые) был осуществлен с применением нуклеозид-5'-фосфоамидов.

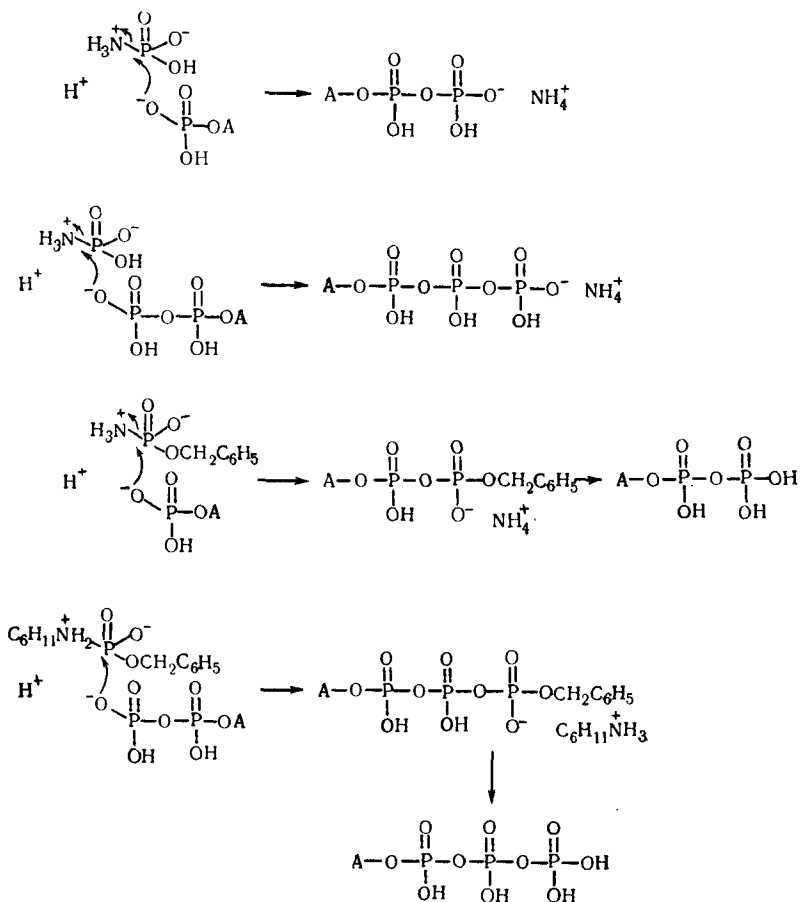
Тогда как дианион фосфоамида [412] вполне устойчив, монопротонированный анион быстро гидролизует до ортофосфорной кислоты, поскольку электрофильный характер атома фосфора значительно усиливается соседним положительно заряженным атомом азота. Реакция фосфат-аниона с цвиттер-ионом фосфоамида приводит к образованию пиррофосфатной связи [413, 414], но реакционная способность таких простых производных довольно низка. Однако N-замещенные фосфоамиды более реакционноспособны, и действительно, N-фосфорильные производные имидазола можно применить для фосфорилирования аминов и спиртовых гидроксильных групп, а также анионов кислот [415, 416]. Поскольку пиррофосфаты образуются в присутствии оснований, фосфоамидный атом азота имеет, по-видимому, достаточно основной характер, чтобы конкурировать за протоны.



При обработке аденозин-5'-фосфата триэтиламмониевой солью фосфоамида получается смесь аденозин-5'-пиррофосфата, аденозин-5'-трифосфата, высших аденозин-5'-полифосфатов и исходного нуклеотида [414]. В контролируемых условиях реакция бензилфосфоамида с уридин-5'-фосфатом приводит к P¹-бензил-P²-уридин-5'-пиррофосфату; при взаимодействии того же реагента с пиридиниевой солью аденозин-5'-фосфата после удаления из продукта реакции бензильной группы получается аденозин-5'-пиррофосфат [413]. Реакция аденозин-5'-пиррофосфата с бензил-N-циклогексилфосфоамидом приводит к образованию монобензилового эфира нуклеозидтрифосфата, из которого с высоким выходом был получен аденозин-5'-трифосфат. В этом случае также образуется небольшое количество высших аденозинполифосфатов [413]. Тот же метод (с использованием бензилфосфоамида) был применен для синтеза

гуанозин-5'-пиррофосфата [419], а также 5'-пиррофосфатов и 5'-трифосфатов 5-оксиметил-2'-дезокситидина и его 5-глюкозидного производного из соответствующих нуклеозид-5'-фосфатов [420].

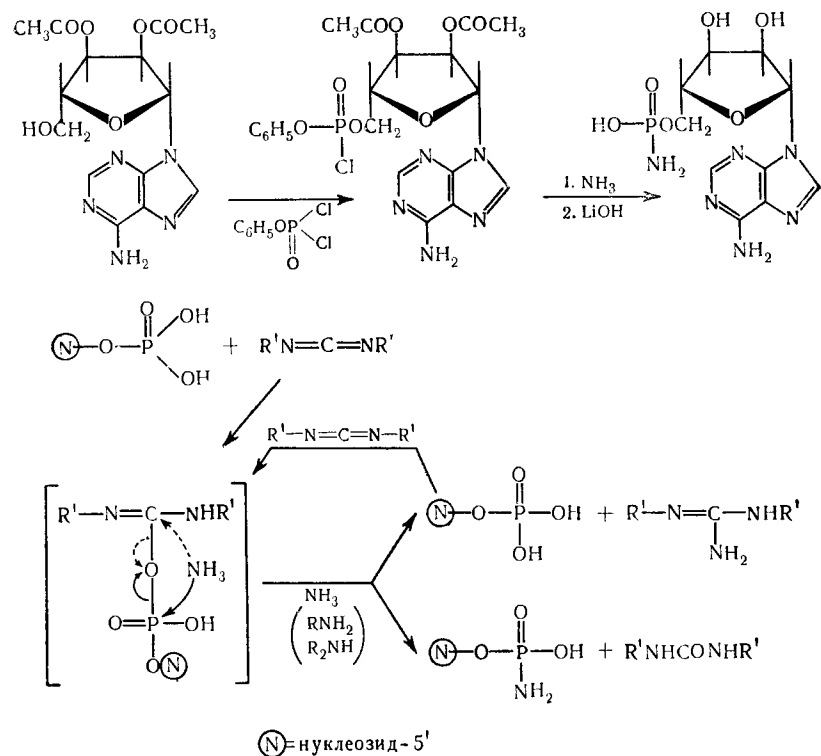
Нуклеозид-5'-фосфоамиды находят значительно более широкое применение, чем описанные выше алкильные производные амидов фосфорной кислоты. Первый синтез аденозин-5'-фосфоамида был осуществлен, исходя из 2',3'-ди-O-ацетиладенозина и фенилдихлорфосфата; после обработки образовавшегося нуклеозид-5'-фенилхлорфосфата аммиаком получался фосфоамид, из которого защитные группы были удалены щелочным гидролизом [414].



A = аденозин-5'

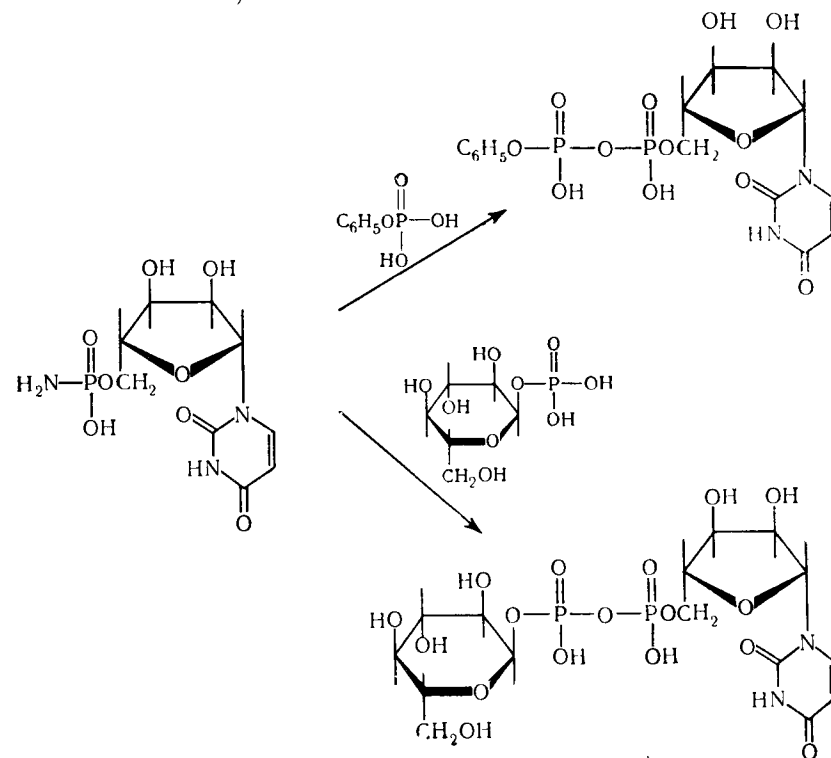
Нуклеозид-5'-фосфоамиды в виде дициклогексилгуанидиниевых (или аммониевых) солей удобнее получать прямо из нуклеотида и аммиака при действии дициклогексилкарбодиимида. Таким путем были синтезированы 5'-фосфоамиды аденозина, цитидина, гуанозина и уридина. Для синтеза N-замещенных фосфоамидов (таких, как нуклеозид-5'-фосфоморфолиды и нуклеозид-5'-фосфоимидазолы), обычно более реакционноспособных, используют соответствующие основания [421].

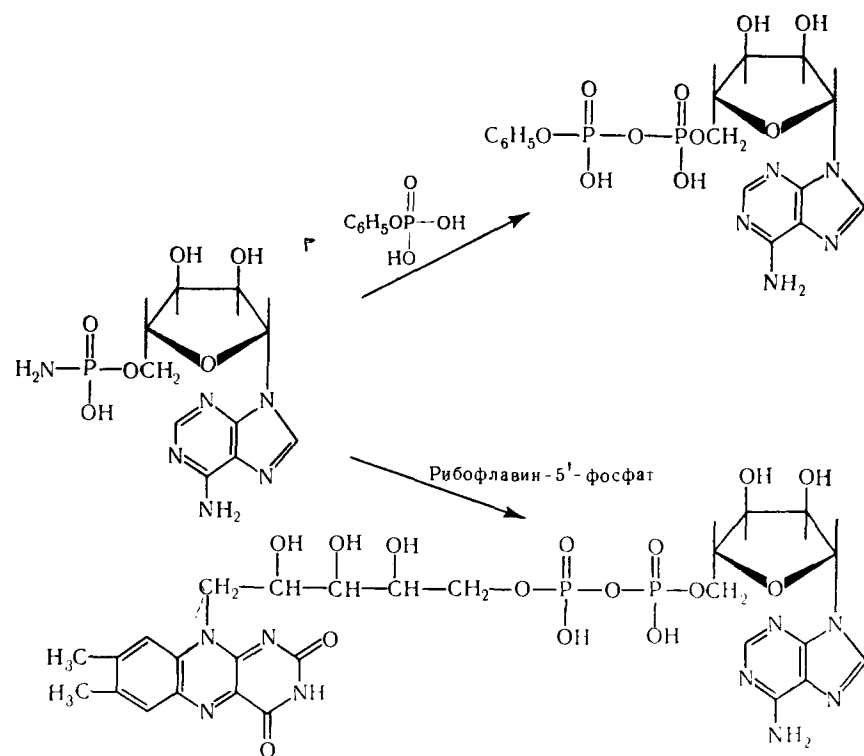
Фосфоамидный метод был применен для синтеза нуклеозид-5'-пирофосфатов (путем обработки нуклеозид-5'-фосфоамида фенолфосфорной, фосфорной [414, 422] или диоксандифосфорной кислотой [423, 424]) и для синтеза диэфиров пирофосфатов, таких, как уридиндифосфо- α -D-глюкоза [425] (и β -D-аналог [426]), N¹-метилуридиндифосфоглюкоза [427], уридиндифосфоглюкуроновая кислота [428], а также (с низким выходом) гуанозиндифосфоманноза [429] и гуанозиндифосфоглюкоза [430], исходя из соответствующего нуклеозидфосфоамида (или N-замещенного фосфоамида) и фос-



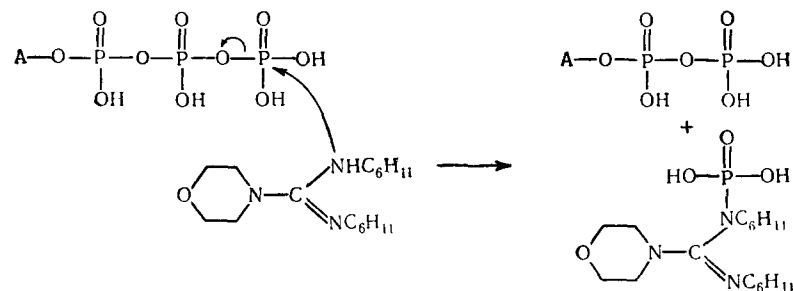
фосахара. Аналогично реакция дициклогексилгуанидиниевой соли аденозин-5'-фосфоамида с рибофлавин-5'-фосфатом дает флавинадениндинуклеотид [425]. Незамещенные нуклеозид-5'-фосфоамиды были применены также для синтеза нуклеозид-5'-трифосфатов путем реакции с неорганическим пирофосфатом [431, 432].

Выходы нуклеозид-5'-пирофосфатов были улучшены путем применения нуклеозид-5'-фосфоморфолидов [433]. Однако использование последних для синтеза аденозин-5'-трифосфата (обработкой аденозин-5'-фосфоморфолида неорганическим пирофосфатом) оказалось менее успешным из-за образования значительного количества аденозин-5'-пирофосфата [433]. Поскольку фосфоморфолид вводился в реакцию в виде его соли с 4-морфолин-*N,N'*-дициклогексилкарбоксамидином, можно предположить, что нуклеозидпирофосфат образуется в результате нуклеофильной атаки этим сильным основанием γ -атома фосфора в получающемся аденозин-5'-трифосфате. Затем можно ожидать дальнейшей реакции образовавшегося фосфогуанидина с неорганическим пирофосфатом (который был взят в большом избытке).

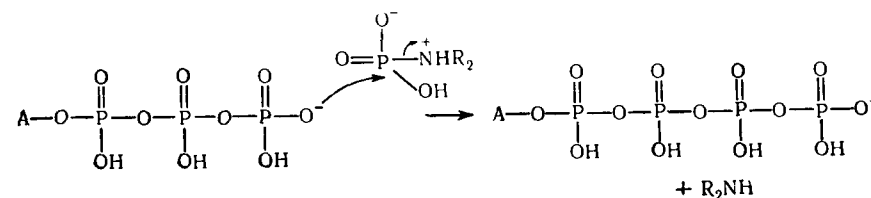




В соответствии с этим обработка аденозин-5'-трифосфата морфолином и гуанидином в пиридине (в отсутствие неорганического пирофосфата) приводит к образованию аденозин-5'-пирофосфата



и аденозин-5'-тетрафосфата. Последний может получаться в результате реакции между фосфоморфолидом (или фосфогуанидином) и непрореагировавшим аденозин-5'-трифосфатом.

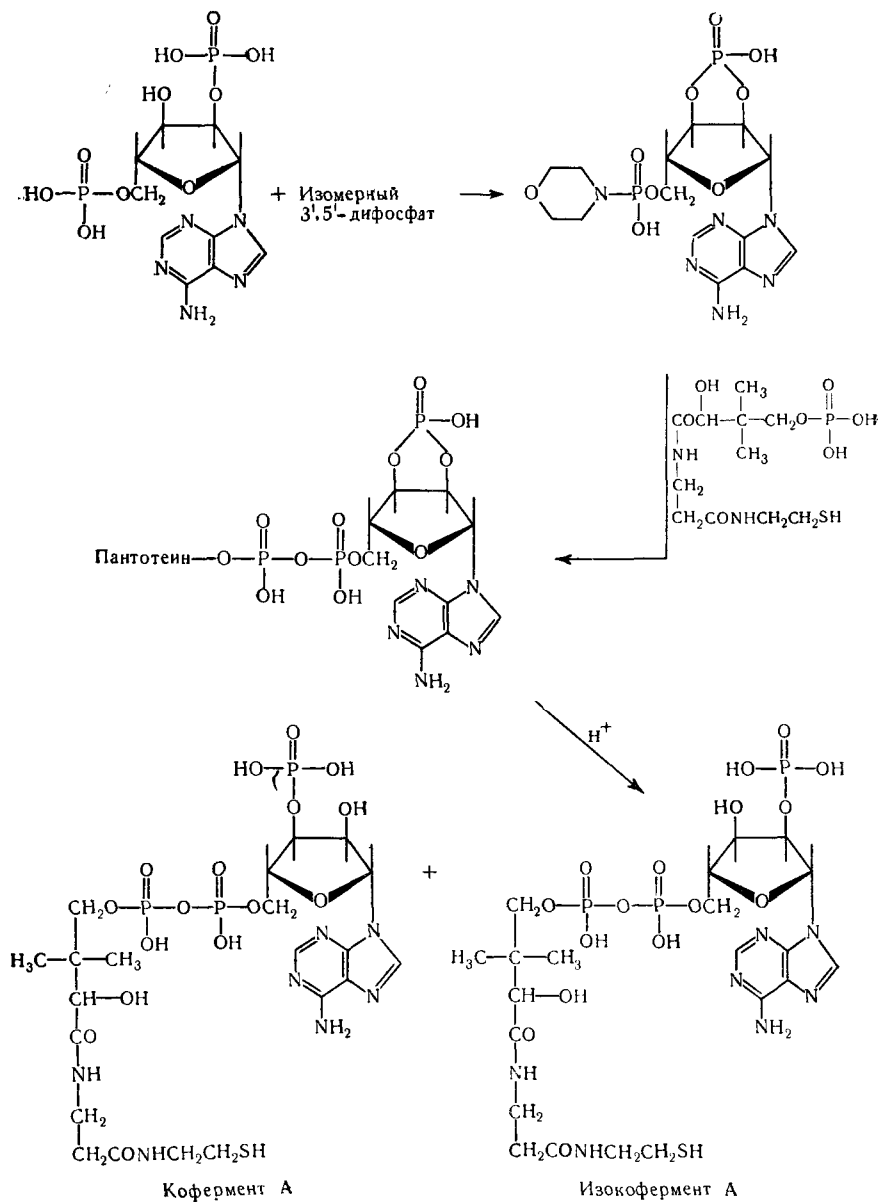
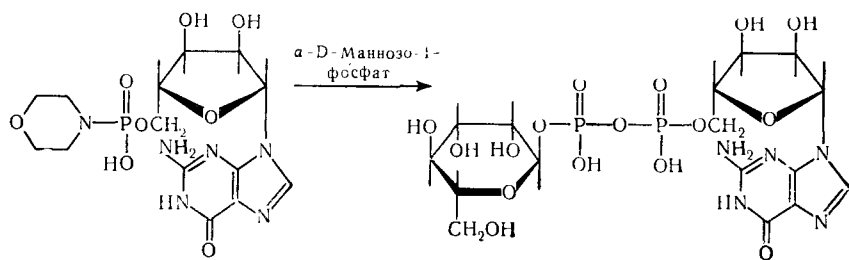


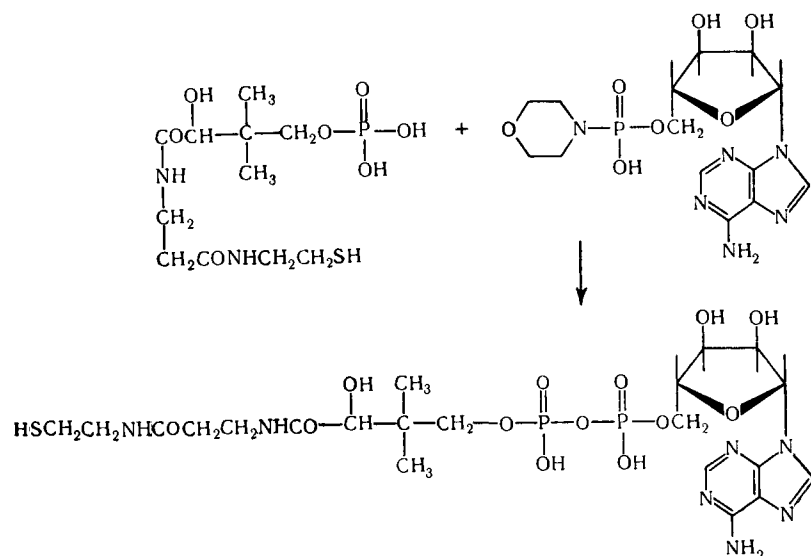
С другой стороны, при таких условиях реакции может происходить внутримолекулярное трансфосфорилирование молекулой АТФ. В случае высших аденозин-5'-полифосфатов такие вторичные реакции, по-видимому, легко протекают в пиридине даже в отсутствие сильных оснований, таких, как морфолин или гуанидиниевые производные [358].

Соответствующие нуклеозид-5'-фосфоморфолиды были также применены для синтеза уридиндифосфоглюкозы, уридиндифосфогалактозы, уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамина, уридиндифосфоглюкуроновой кислоты, цитидиндифосфоглицерина и гуанозиндифосфоманнозы с достаточно высокими выходами [434], а также для получения цитидиндифосфодиглицерида, правда с довольно низким выходом [435].

Большие возможности этого метода продемонстрированы синтезом 3'-дефосфокофермента А и кофермента А. Реакция между DL-пантотеин-4'-фосфатом и аденозин-5'-фосфоморфолидом приводит к образованию дефосфокофермента А (представляющего собой рацемическую смесь). Аналогично при обработке D-пантотеин-4'-фосфата аденозин-(2',3'-циклофосфат)-5'-фосфоморфолидом, полученным при действии морфолина и дициклогексилкарбодиимида на аденозин-2'(3'),5'-дифосфат, образуется продукт, который при обработке разбавленной кислотой для раскрытия кольца циклофосфата дает смесь кофермента А и изокофермента А (имеющего 2'-фосфатную группу в аденозиновой части молекулы вместо 3'-фосфатной). Несколько трудоемкое разделение этих двух изомеров на целлюлозной ионообменной колонке позволило получить кофермент А с выходом около 15% [436].

Из других применений фосфоамидного метода следует упомянуть синтез Р¹-аденозин-5'-Р²-дегидроэпиандростеронпирофосфата, Р¹-аденозин-5'-Р²-5-прегненолонпирофосфата и Р¹-аденозин-5'-Р²-17α-окси-5-прегненолонпирофосфата исходя из дициклогексилгуанидиниевой соли аденозин-5'-фосфоамида и 10-кратного избытка фосфостероида [397, 398]. Описан также синтез Р¹-аденозин-5'-Р²-DL-кобинамидпирофосфата и соответствующего гуанозинового производного [476].

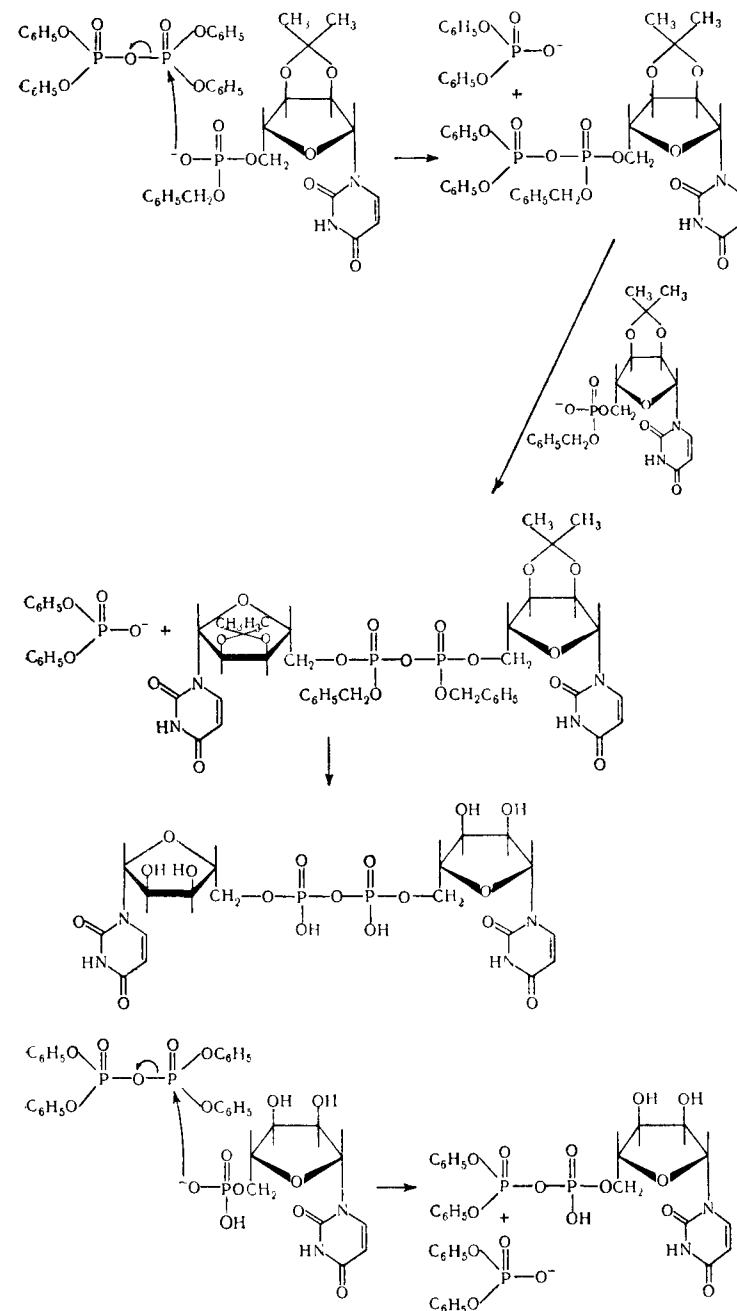




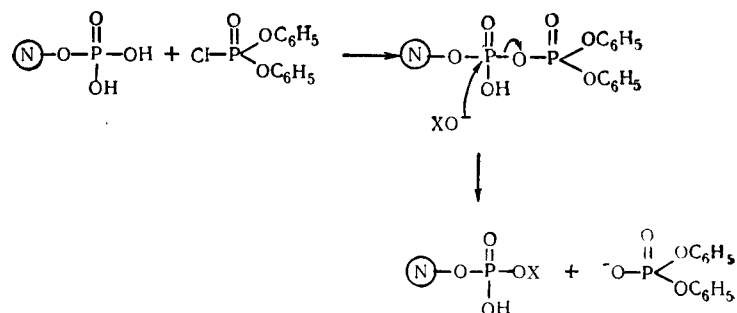
АНИОНООБМЕННЫЕ РЕАКЦИИ

Анионообменные реакции, протекающие через стадию промежуточного образования полностью этерифицированных ангидридов, в общем не нашли успешного применения в синтезе пирофосфатных коферментов вследствие высокой реакционной способности всех таких промежуточных продуктов. Это приводит к дальнейшим обменным реакциям этих промежуточных соединений с образованием наиболее устойчивого ангидрида, обычно симметричного пирофосфата, а в присутствии расположенной соответствующим образом незащищенной гидроксильной группы — к образованию циклического фосфата. Так, например, при обработке 2',3'-О-изопропилиденуридин-5'-бензилфосфата тетрафенилпирофосфатом с последующим удалением защитных групп получается P^1, P^2 -ди(уридин-5')-пирофосфат, так как первоначально образующийся P^1 -дифенил- P^2 -бензил- P^2 -уридин-5'-пирофосфат подвергается дальнейшему превращению [366]. Однако, если в ангидриде присутствует незащищенная способная к ионизации фосфатная группа, легкость нуклеофильной атаки значительно уменьшается и в подходящих условиях при обработке нуклеозид-5'-фосфатов тетрафенилпирофосфатом можно достичь количественных выходов P^1 -дифенил- P^2 -нуклеозид-5'-пирофосфатов [355].

Хотя такие триэтерифицированные пирофосфаты сравнительно устойчивы в диоксане (в присутствии таких третичных оснований,

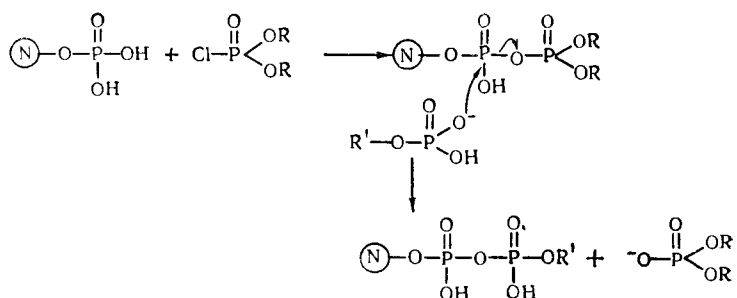


как три-*n*-бутиламин), но в пиридине они быстро атакуются анионами разнообразных кислот, более слабых, чем дифенилфосфорная кислота. Поскольку дифенилфосфорная кислота значительно более сильная кислота, чем нуклеотиды, отщепление более устойчивого



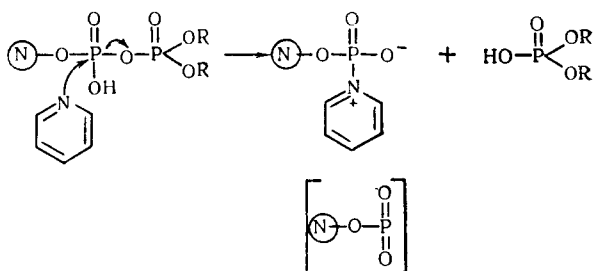
(N) = нуклеозид-5'

-OX = фосфаты, неорганический сульфат или карбокси-анион



R = алкил или арил

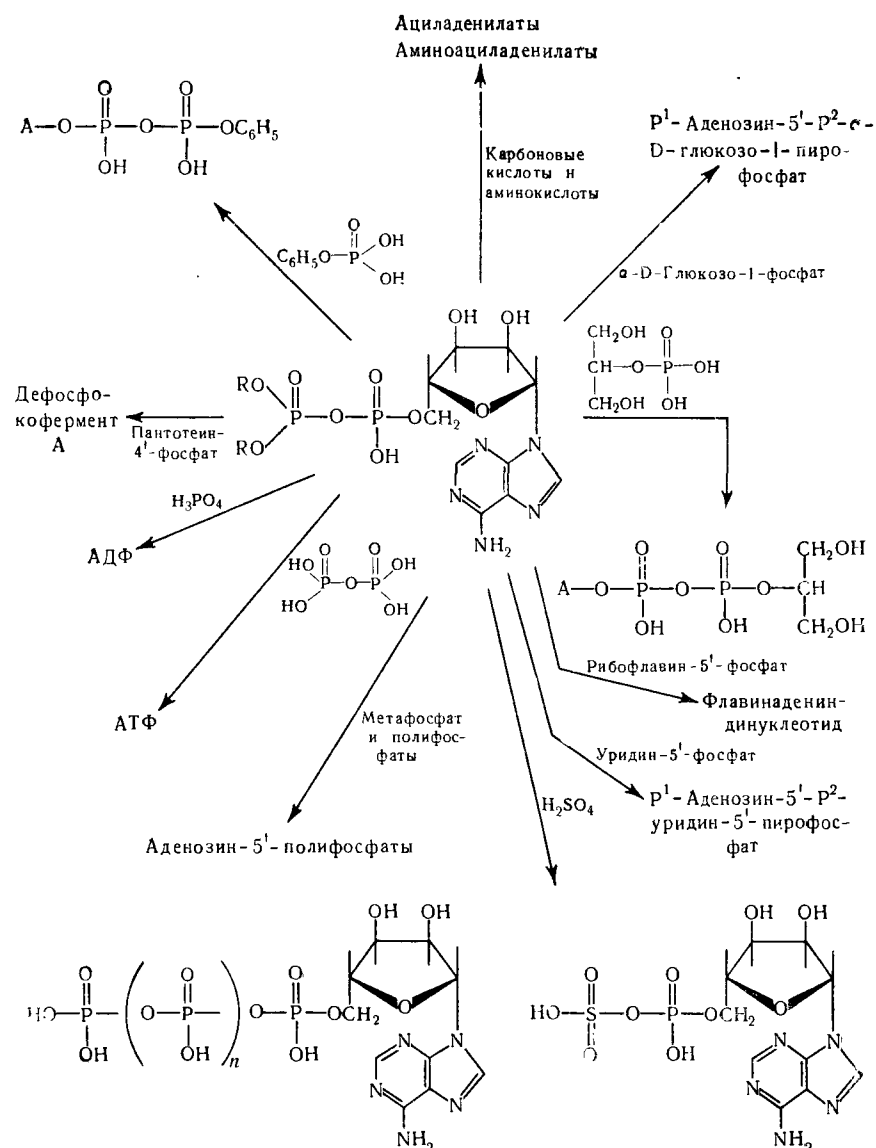
R' = алкил, арил, фосфат или полифосфат



аниона таким нуклеофилом, как фосфорная кислота или глюкозо-1-фосфат, приводит к образованию нового нуклеотидангидрида. Последний, особенно если в его молекуле присутствуют две или более способных к диссоциации групп, устойчив к дальнейшему нуклеофильному замещению. В отличие от упомянутого выше метода синтеза пирофосфатных коферментов действием на смесь двух фосфатов ангидрида трифторуксусной кислоты (стр. 244) этот метод обладает значительной направленностью и избирательностью и поэтому позволяет получать высокие выходы желаемого продукта. По существу метод заключается в превращении одной нуклеотидной компоненты в нуклеозиддифенилпирофосфат в результате обработки ее дифенилхлорфосфатом и три-*n*-бутиламином в диоксане. Добавление затем раствора второй компоненты в пиридине приводит к образованию требуемого ангидрида, причем реакция проходит быстро и при комнатной температуре [437] (см. схему на стр. 267).

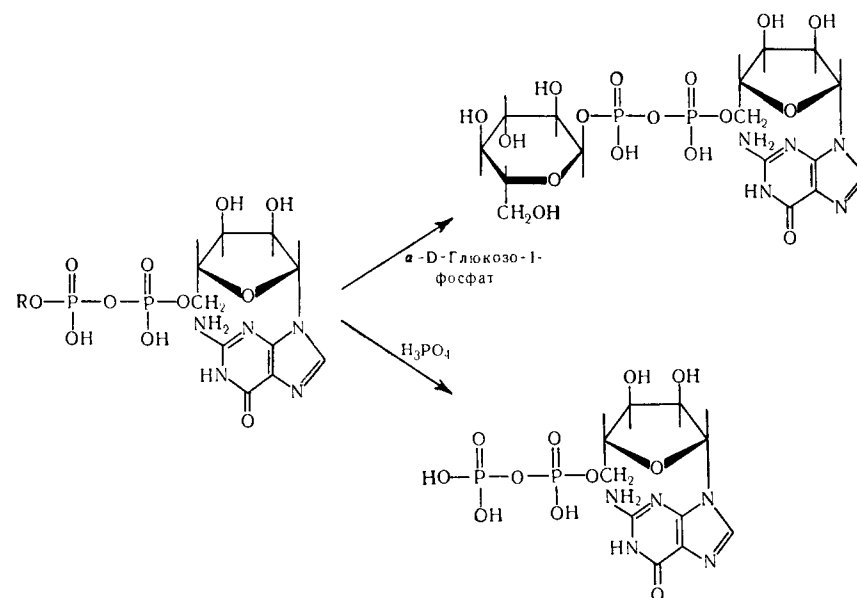
Этот метод является общим, простым в исполнении, дает исключительно высокие выходы (упрощая таким образом процессы очистки) и позволяет избежать применения защитных групп или выделения сложных промежуточных продуктов, таких, как нуклеозид-5'-фосфоморфолиды. Хотя механизм реакции представляется в виде отщепления аниона дифенилфосфата (в направлении, противоположном атаке) в результате атаки нуклеофилом нуклеотидного атома фосфора, существует и другая возможность — образование мономерного нуклеозид-5'-метафосфата (или, более вероятно, пиридиниевого комплекса). Оба механизма должны привести к одному и тому же результату. В отличие от других методов никаких затруднений с растворимостью не встречается. Обычно применяют три-*n*-октиламмониевые соли моонуклеотидов, за исключением цитозинового производных, в случае которых предпочтительнее использование метилтри-*n*-октиламмониевых солей из-за их лучшей растворимости в диоксане и диметилформамиде.

Сфера применения этой реакции демонстрируется большим разнообразием полученных с ее помощью нуклеотидангидридов. При обработке соответствующего P^1 -дифенил- P^2 -нуклеозид-5'-пирофосфата α -D-глюкозо-1-фосфатом были получены уридиндифосфоглюкоза, аденозиндифосфоглюкоза, гуанозиндифосфоглюкоза, цитидиндифосфоглюкоза, дезоксицитидиндифосфоглюкоза [438] и тимидиндифосфоглюкоза [255]. Аналогично взаимодействием соответствующего аниона с P^1 -дифенил- P^2 -аденозин-5'-пирофосфатом были синтезированы флавинаденидинуклеотид, P^1 -аденозин-5'- P^2 -глицерин-2-пирофосфат, 3'-дефосфокофермент А, аденилил-2,3-дифосфоглицериновая кислота (с пирофосфатной связью), диаденозин-5'-пирофосфат, P^1 -аденозин-5'- P^2 -уридин-5'-пирофосфат, аденозиндифосфофенол и 2,4-динитрофениловый эфир аденозин-5'-фосфата [438]. С помощью этого метода легко и с хорошим выходом

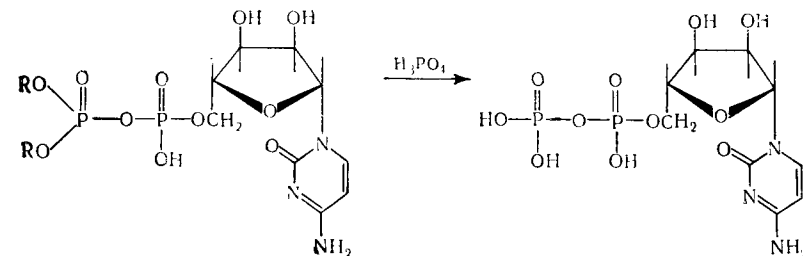
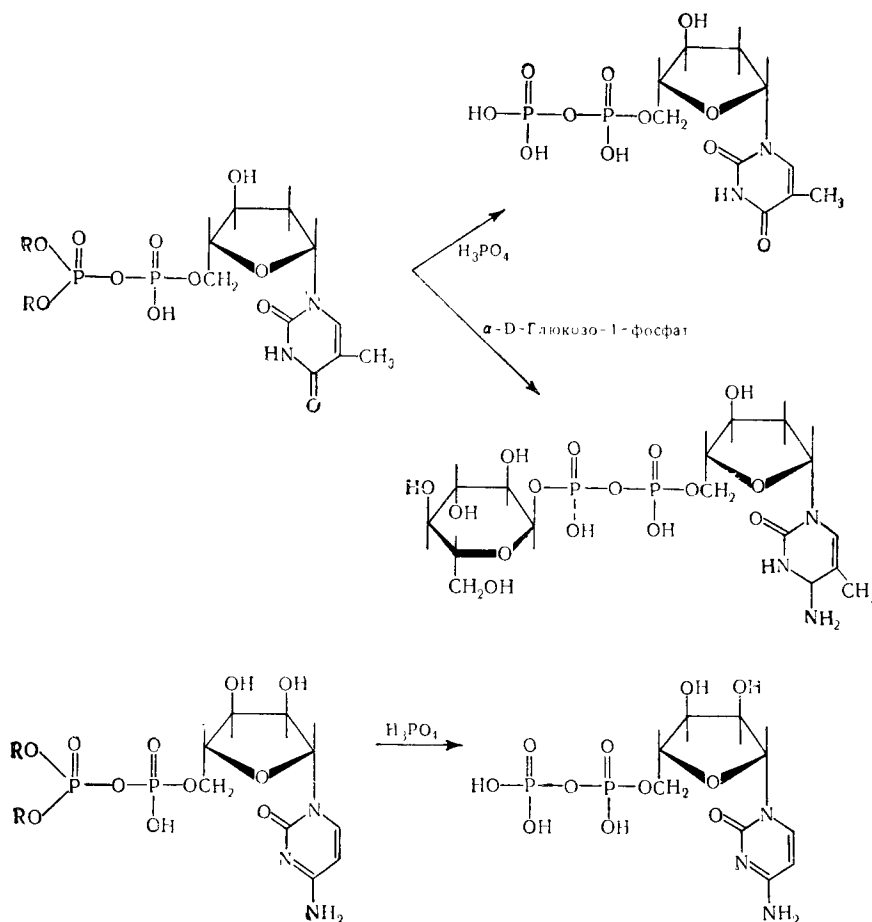
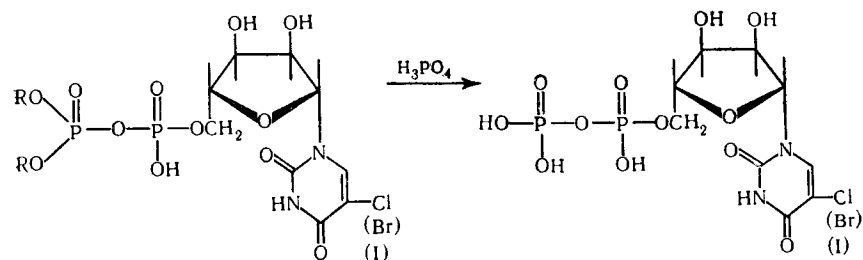
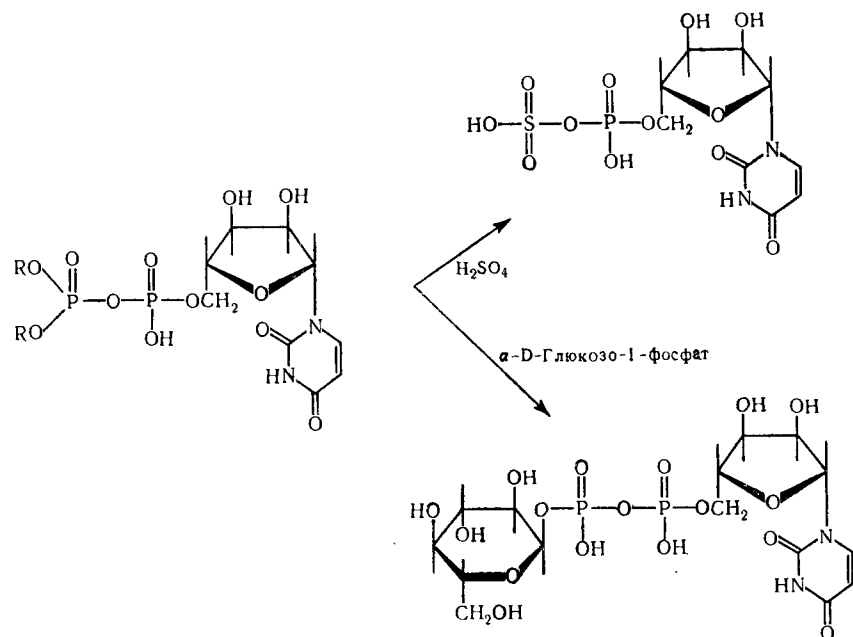


получены различные производные цитидиндифосфата, представляющие интерес для изучения обмена липидов: цитидиндифосфоинозит, ЦДФ-серин, ЦДФ-этаноламин, ЦДФ-метиламиноэтанол, ЦДФ-диметиламиноэтанол и ЦДФ-холин [439a]. В результате замещения дифенилфосфата в соответствующем нуклеозиддифенилпирофосфате фосфорной кислотой выделены с отличным выходом 5'-пирофосфаты цитидина, аденозина, гуанозина, тимидина, 5-хлор-, 5-бром- и 5-иодуридов [440]. Аналогичные анионообменные реакции R¹-дифенил-R²-аденозин-5'-пирофосфата с неорганическими кислотами — пирофосфорной, трифосфорной, триметафосфорной, тетраметафосфорной, полифосфорной [439], фосфористой или гипофосфористой — приводят к соответствующим аденозинполифосфатам (некоторые из которых неустойчивы) [358]. Замещение дифенилфосфата неорганическим сульфатом также оказалось возможным, несмотря на низкое значение *pK* вторичного гидроксила серной кислоты; таким путем легко были получены аденилилсульфат и уридилсульфат.

При обработке Р¹-дифенил-Р²-уридин-5'-пирофосфата 1-фосфо- α -D-глюкуроновой кислотой образуется уридиндифосфоглюкуроновая кислота с отличным выходом (86 % в расчете на выделенный чистый продукт) [441]. Следует отметить, что в этом случае, как и в случае ангидрида 2,3-дифосфоглицериновой кислоты, в атакующей молекуле (1-фосфоглюкуроновой кислоте) присутствуют два вида анионов — фосфат и карбоксил. Но поскольку карбоксиль-



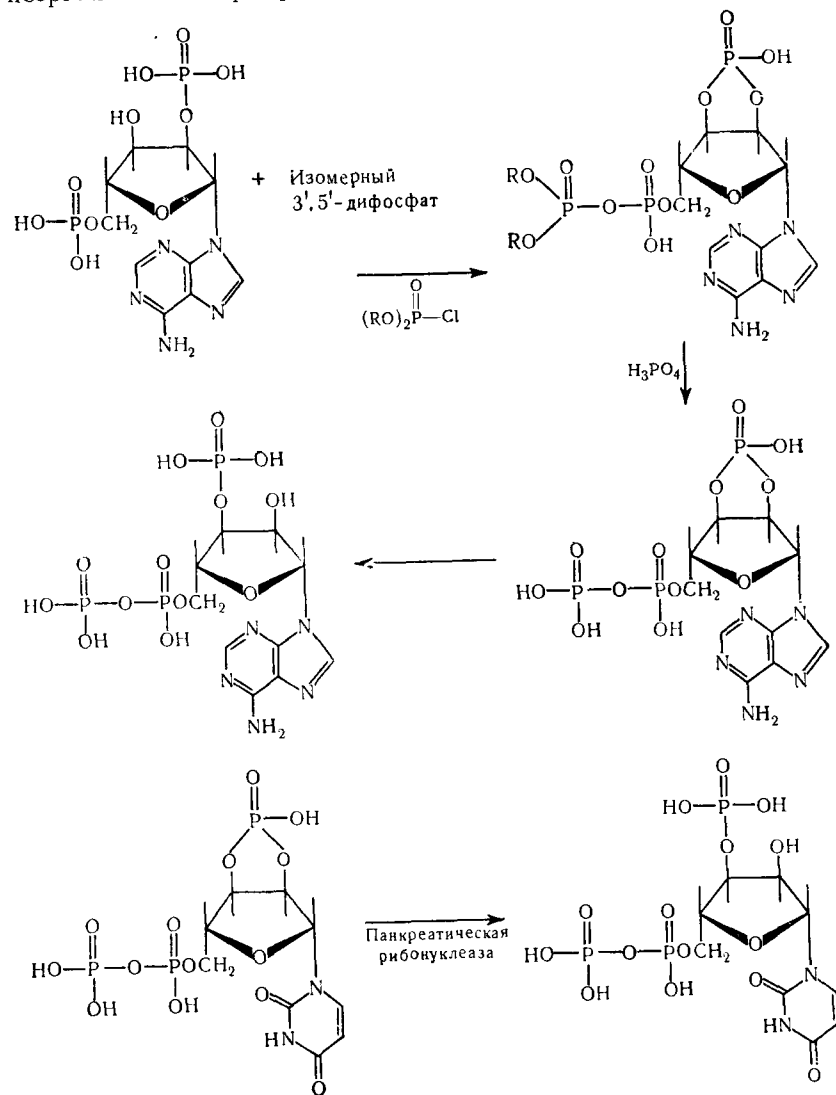
ная группа имеет pK около 4, а pK фосфорильного гидроксила ~ 6 , то ясно, что любой образовавшийся карбоновый ангидрид будет сам предметом атаки фосфатной группой (с отщеплением более устойчивого аниона), так что в итоге должен получиться только наиболее устойчивый продукт — (P¹-уридин-5'-P²- α -D-глюкуроновая кислота)-пирофосфат. Тем не менее тот же метод можно применить для синтеза ацил- или аминоклиангидридов нуклеотидов путем обмена анионами между промежуточно образовавшимся триэтерифицированным пирофосфатом и карбоновыми кислотами или карбобензоксиаминокислотами и пептидами. Поскольку такие соединения не очень



устойчивы в пиридине, выходы сравнительно низки (приблизительно 40—50%). Однако нуклеотидкарбоновые ангидриды сравнительно устойчивы в растворе диоксана в виде солей третичного амина (три-*n*-бутиламина) и таким путем при применении смешанного ангидрида с этилугольной кислотой достигнуты практически количественные выходы продукта [4396].

Применимость этого общего метода наглядно продемонстрирована на примере синтеза кофермента А и родственных производных, который был осуществлен с очень высокими выходами [442]. При обработке аденозин-2'(3'),5'-дифосфата дифенилхлорфосфатом полу-

чается с количественным выходом Р¹-аденозин-(2',3'-циклофосфат)-5'-Р²-дифенилпирофосфат. Последующая реакция этого ангидрида с неорганическим ортофосфатом в пиридине приводит к образова-



нию аденозин-(2',3'-циклофосфат)-5'-пирофосфата с выходом 90%. Поскольку химический гидролиз 2',3'-циклофосфатной части в таких соединениях приводит к смеси 2'- и 3'-фосфатов, было приме-

нено специфическое расщепление циклофосфата рибонуклеазой Т2 из такадиастазы, что позволило получить исключительно аденозин-(3'-фосфат)-5'-пирофосфат, свободный от изомерного 2'-фосфатного производного. Подобным же образом при замене рибонуклеазы Т2 панкреатической рибонуклеазой был получен уридин-(3'-фосфат)-5'-пирофосфат из смеси уридин-2',5'- и уридин-3',5'-дифосфатов.

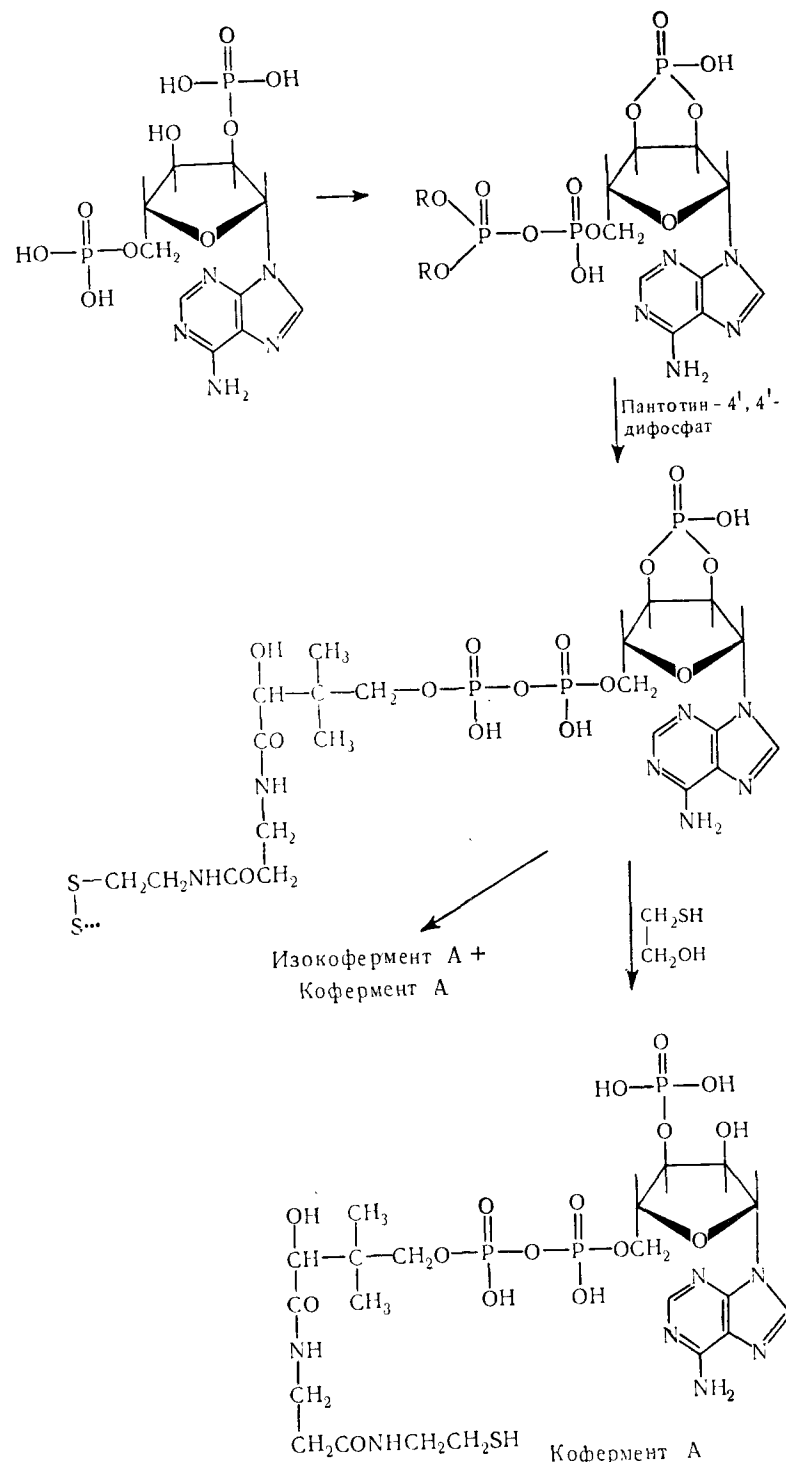
При обработке Р¹-аденозин-(2',3'-циклофосфат)-5'-Р²-дифенилпирофосфата пантотин-4',4'-дифосфатом образуется 2',3'-циклофосфатная форма окисленного кофермента А. После инкубации этого соединения с рибонуклеазой Т2 (для получения исключительно 3'-фосфата), превращения его в тиоловую форму и очистки с помощью хроматографии был получен кофермент А с общим выходом 63%. Биохимическая оценка показала, что полученный продукт биологически активен. Щелочной гидролиз или гидролиз ядом гремучей змеи приводит к образованию единственного нуклеотидного производного—аденозин-3',5'-дифосфата, без примеси аденозин-2',5'-дифосфата [442] (см. схему на стр. 276).

При кислотном гидролизе промежуточной циклофосфатной формы кофермента А образуется смесь кофермента А и изокофермента А. Однако было осуществлено специфическое расщепление циклического фосфата до 2'-фосфата (изо-КоА) при помощи очищенного фермента из мозга телянка [358]. Вполне вероятно, что полученное соединение будет гидролизываться диэстеразой из селезенки с образованием исключительно 2'-фосфата.

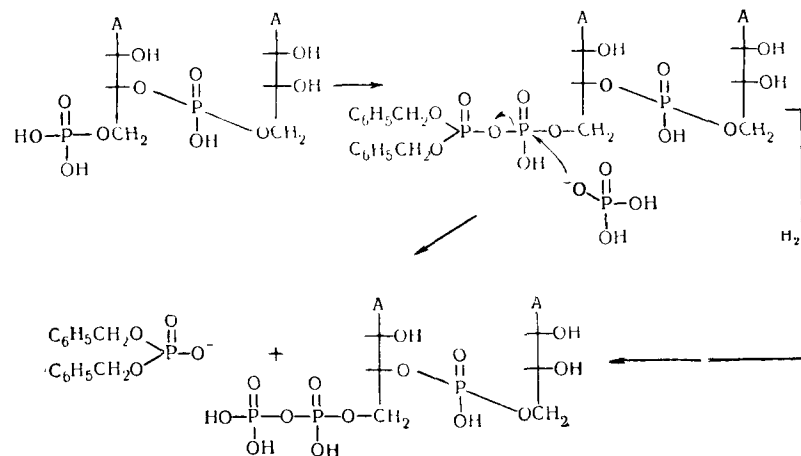
Подобные приемы были применены для синтеза «активного сульфата» (аденилил-5'-сульфат-3'-фосфата) [358].

Мягкость метода позволяет легко получать олигонуклеотиды, содержащие на конце цепи 5'-пирофосфатную группу; это осуществляется действием дибензилхлорфосфата на олигонуклеотид (несущий концевую 5'-фосфатную группу) с последующим нуклеофильным замещением дибензилфосфата в продукте реакции неорганическим фосфатом. Однако в этом случае лучшие выходы были получены в результате гидрогенолиза промежуточного триэфира олигонуклеотидпирофосфата [358]. Подобный метод, несомненно, окажется эффективным в несколько более простом случае—при работе с олигодезоксинуклеотидами (см. схему на стр. 277).

Хотя для анионообменной реакции не обязательна строго безводная среда, все же при применении влажного пиридина (5% воды) выход значительно уменьшается вследствие, по-видимому, катализируемого пиридином гидролиза промежуточного ангидрида нуклеотида и дифенилфосфата до свободного нуклеотида. Для получения промежуточного ангидрида широко применялся дифенилхлорфосфат, но при некоторых ограничениях ангидрид может содержать любой этерифицированный фосфат, представляющий собой более

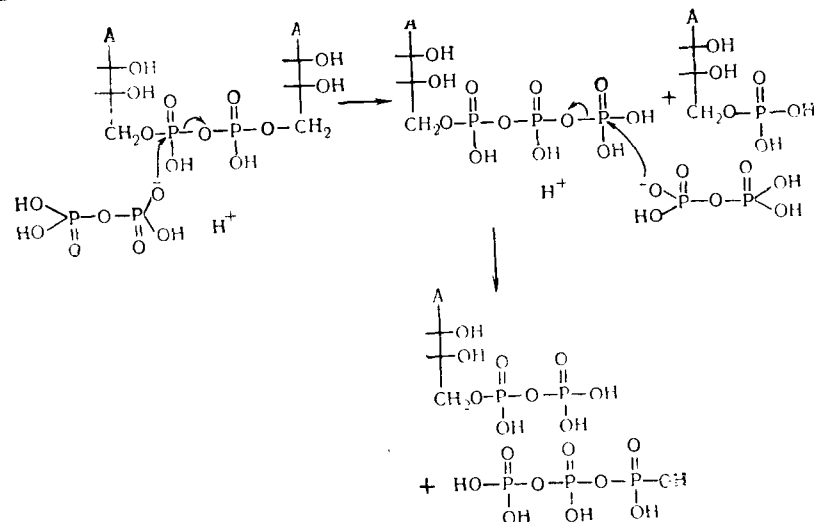


сильную кислоту, чем нуклеотид и атакующий анион, причем эффективность обмена анионами сильно зависит от этого различия в силе кислот. Так, при обработке нуклеотида в диоксане диэтилхлорфосфатом аналогичным образом образуется соответствующий ангидрид, который, хотя и менее реакционноспособен, чем дифенильное производное, но легко подвергается направленному анионному нуклеофильному замещению в пиридине, причем нуклеотидкоферменты и родственные им соединения получаются с очень хорошими выходами. Однако метансульфонилпроизводные для этой цели не подходят вследствие количественного превращения нуклеотида в P^1, P^2 -динуклеозид-5'-пирофосфат даже в диоксане и в отсутствие катализатора основания [438].

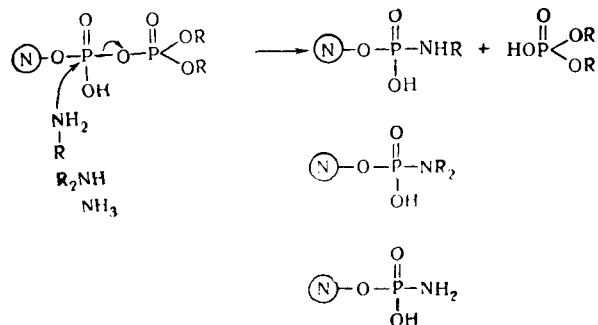


Об относительной устойчивости пирофосфатов, содержащих две или более диссоциированных группы, упоминалось выше. Тем не менее при соответствующих жестких условиях нуклеофильная атака неорганическим пирофосфатом P^1, P^2 -ди(аденозин-5')-пирофосфата в растворе пиридина приводит к образованию смеси аденозин-5'-фосфата, аденозин-5'-пирофосфата и аденозин-5'-трифосфата (и, возможно, аденозин-5'-тетрафосфата) [445]. Подобный анионо-обменный механизм можно предположить для идущего в твердой фазе медленного превращения кислых солей рибо- и дезоксирибонуклеозид-5'-пирофосфатов в смеси нуклеозид-5'-трифосфатов и нуклеозид-5'-фосфатов [443].

Как можно было ожидать, ангидриды дифенилфосфата и нуклеозид-5'-фосфатов легко и количественно образуют фосфоамидные



производные * при обработке смесью пиридина и первичного или вторичного амина, такого, как аммиак, циклогексиламин, гидразин, морфолин, пиперидин и *n*-, *втор*-, *изо*- и *трет*-бутиламины. При этом происходит общая для всех анионообменных реакций предпочтительная нуклеофильная атака на нуклеотидный атом фосфора с отщеплением более сильного (более устойчивого) аниона и образованием нуклеозид-5'-фосфоамидов [437, 438].



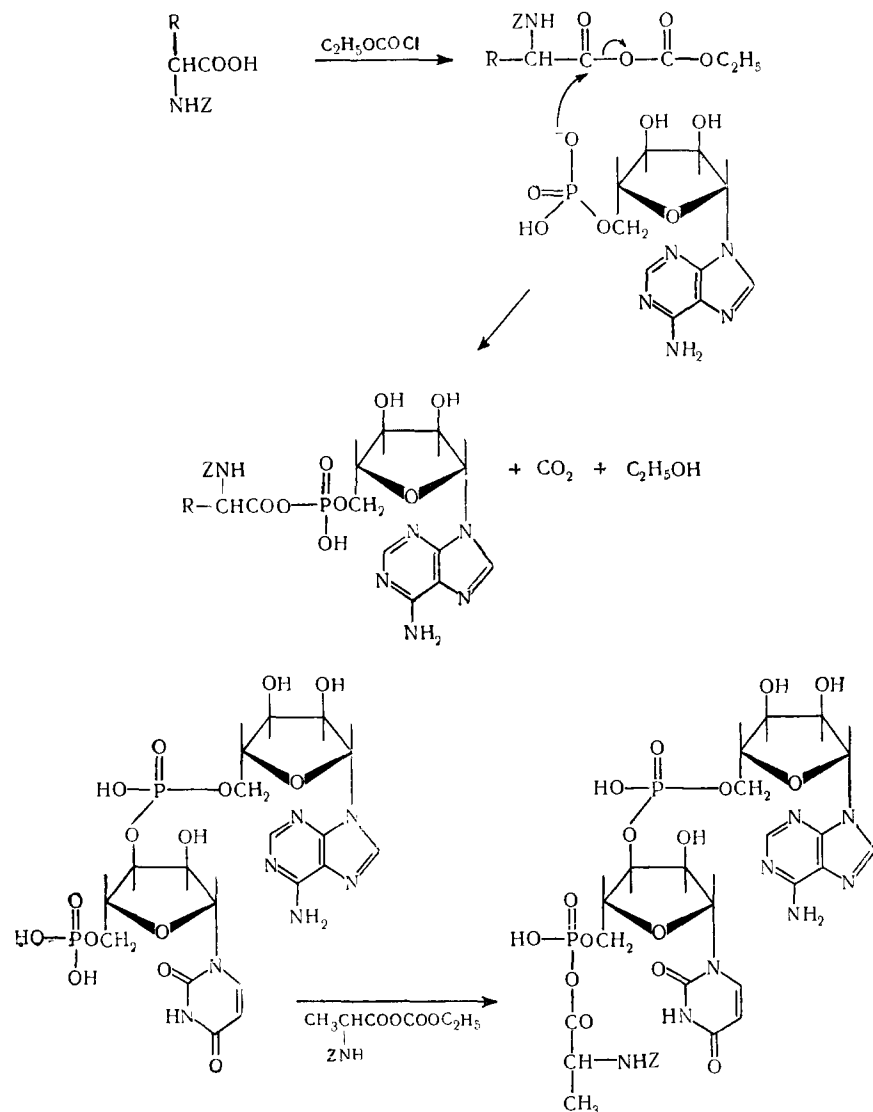
(N) = нуклеозид-5'

* О применении нуклеозиддифенилпирофосфатов для синтеза аминокислотных производных различных рибо- и дезоксирибонуклеотидов (как нуклеозид-5'-, так и нуклеозид-3'-фосфатов), содержащих фосфоамидную связь между компонентами, см. ЖОХ, 34, 359 (1964); ДАН СССР, 158, 143 (1964); Вест. МГУ, Химия, № 3, 89 (1965); ДАН СССР, 166, 101 (1966). — Прим. ред.

В общем, образование нуклеозиддифенилпирофосфата является более удобным, чем получение ангидрида дифенилфосфата и ненуклеотидной компоненты кофермента, предполагающее нуклеофильное отщепление дифенилфосфата от ангидрида ненуклеотидной природы. Однако в некоторых случаях (при отсутствии близко расположенной гидроксильной группы) с успехом можно применить и такой прием. Например, Р¹-эстрон-Р²-аденозин-5'-пирофосфат был получен с высоким выходом (90% выделенного чистого вещества) путем обработки стероидфосфата дифенилхлорфосфатом с последующим замещением дифенилфосфата в образовавшемся ангидриде аденозин-5'-фосфатом [444]. Тем же путем был осуществлен синтез многих других Р¹-стероид-Р²-аденозин-5'-пирофосфатов и стероидполифосфатов. Сравнение с другими общими методами пирофосфатного синтеза (включая фосфоморфолидный метод) показало, что анионообменный метод несравнимо более избирателен [444]. Во многих случаях продукт можно было выделить в чистом виде непосредственно из реакционной смеси, минуя трудоемкий процесс очистки. В самом деле, при обработке Р¹-эстрон-Р²-дифенилпирофосфата морфолином эстронфосфоморфолид был получен сразу в кристаллическом виде. Для синтеза фосфоамидов и замещенных фосфоамидов этот метод, по-видимому, лучше дициклогексилкарбодиимидного.

Другая вариация метода заключается в применении для синтеза аминокислотных производных (с очень высоким выходом) ангидридов этилкарбоната и карбобензоксикарбоаминокислоты; последние получают при действии этилхлорформиата на карбобензоксикарбоаминокислоту и затем вводятся в реакцию с нуклеозид-5'-фосфатом. Более сильные аддитивные свойства аминокислотной группы обеспечивают специфическое образование аминокислотного нуклеотида, а не сравнительно устойчивого ангидрида этилкарбоната с нуклеотидом [437, 439]. Этот метод был также применен для синтеза (с хорошим выходом) аминокислотных и пептидных ангидридов олигонуклеотидов с концевой 5'-фосфатной группой [445].

Анионообменный метод синтеза нуклеотидангидридов имеет ряд преимуществ по сравнению с ранними методами. Метод не только находит более широкое применение, но и значительно лучше других методов для синтеза кофермента А, нуклеозид-5'-трифосфатов (выход 70—80% по сравнению с 20—40% при применении фосфоамидного метода), нуклеозид-5'-фосфопиперидидов (выход количественный по сравнению с 40%-ным в случае дициклогексилкарбодиимидного метода) и 2,4-динитрофениловых эфиров нуклеозид-5'-фосфатов (выход 80—90% по сравнению с 25—30%, полученными фосфоморфолидным методом). Редко требуется слишком большой избыток того или иного компонента (выходы 90% достигнуты, как сообщалось, при применении 0,2 молярного избытка ата-



кующего аниона) [444]; это имеет некоторое значение при работе со сравнительно редкими веществами. Для синтеза ангидридов, содержащих меченый фосфосахар, удобно использовать небольшой избыток P^1 -нуклеозид-5'- P^2 -дифенилпирофосфата.

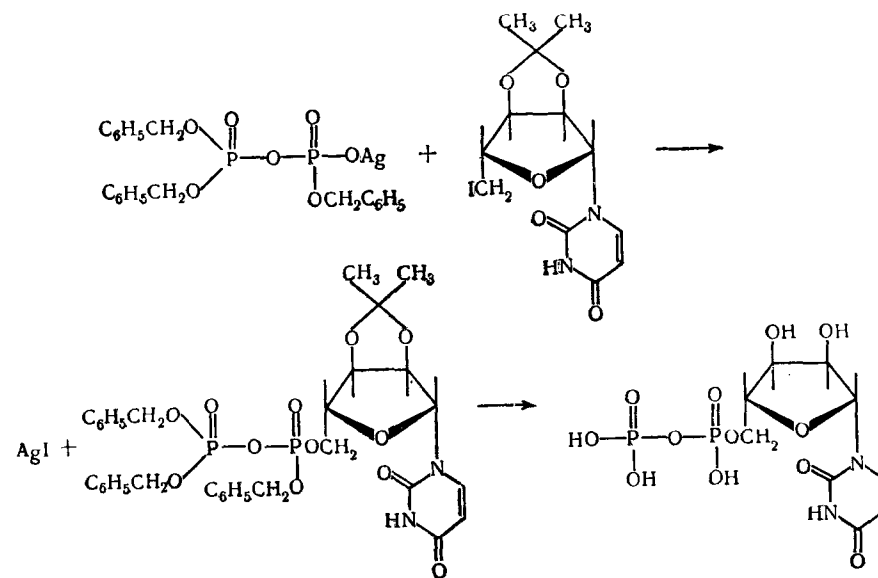
Триэфиры пирофосфорной кислоты были также применены для синтеза модельных соединений [446].

ПРОЧИЕ МЕТОДЫ

Уридин-5'-пирофосфат впервые был получен реакцией 2',3'-О-изопропилиден-5'-иодо-5'-дезоксидеоксиуридина с серебряной солью трибензилпирофосфата с последующим удалением защитных групп из продукта реакции [447]. Однако применимость реакции такого типа ограничена вследствие образования циклонуклеозида, а неустойчивость полностью этерифицированных промежуточных продуктов приводит к низким выходам.

Описан синтез аденозин-5'-полифосфатов из аденозин-5'-фосфата и фосфорной кислоты с применением в качестве катализатора бензолсульфоислоты [448]. Общий выход составил 60%: около 10% АДФ, 30% АТФ, 25% аденозин-5'-тетрафосфата, 15% аденозин-5'-пентафосфата и 20% высших полифосфатов.

В модельной системе окислительного фосфорилирования аденозин-5'-пирофосфат удалось получить окислением хинолфосфатов [449]. Окисление бромом смеси тетра-*n*-бутиламмониевой соли

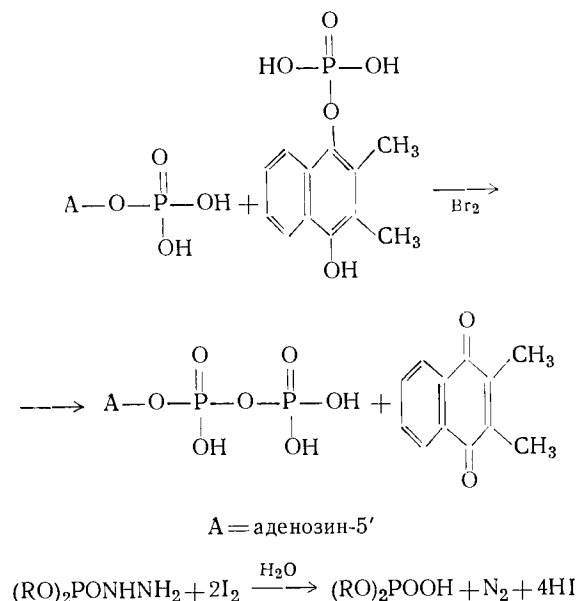
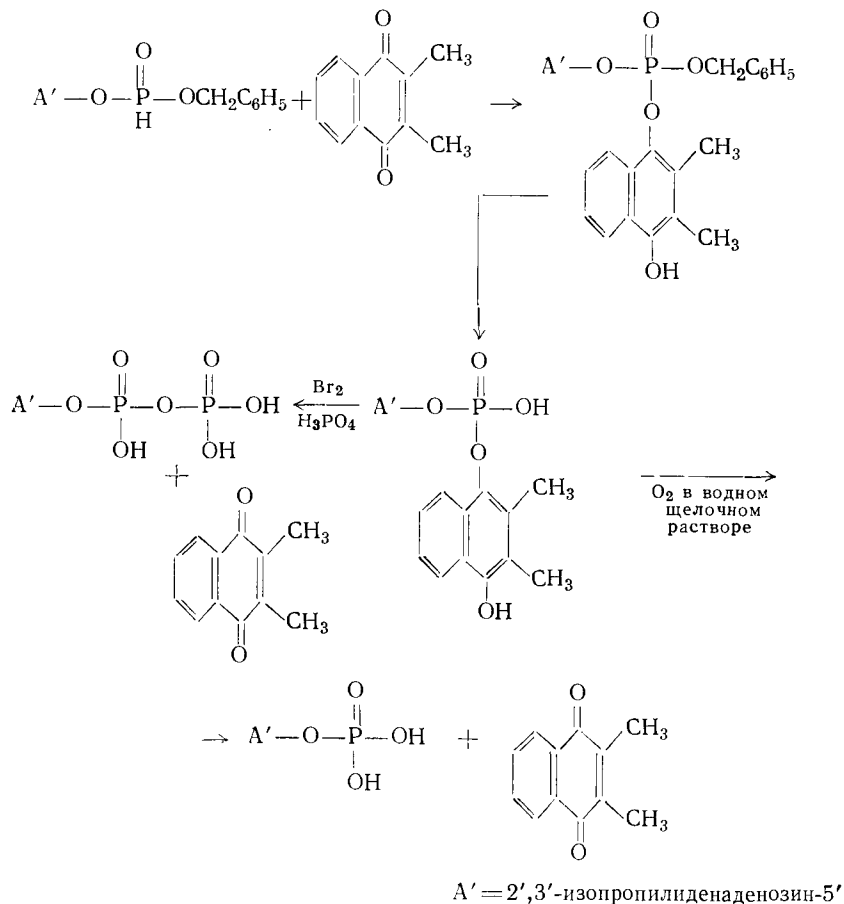


аденозин-5'-фосфата и 2,3-диметилнафто-1,4-хинолмонофосфата в жестких безводных условиях привело к образованию АДФ с довольно низким выходом. Этот ангидрид был аналогичным образом получен при окислении 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-фосфорного эфира нафто-1,4-хинола в присутствии неорганического фосфата [449]. В процессе выделения образовавшегося продукта была удалена защитная изопротилиденная группа. Механизм

такого рода окислительного фосфорилирования полностью не расшифрован; возможно участие мономерных метафосфатов (или родственных им производных). Сложный эфир хинола и нуклеотида [449, 450] получен из 2,3-диметил-1,4-нафтохинона и 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-бензилфосфита (в присутствии *tert*-бутилата калия) с последующим удалением бензильной группы из продукта путем анионного отщепления тиоцианатом натрия [449].

Для синтеза пиродифосфатов (как симметричных, так и несимметричных) и для фосфорилирования гидроксильных групп спиртов было применено окисление фосогидразидов иодом [451].

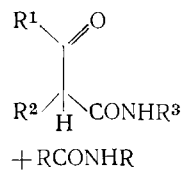
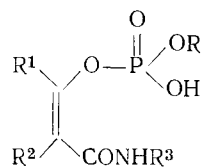
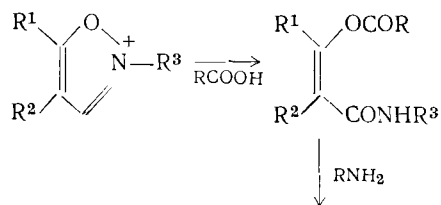
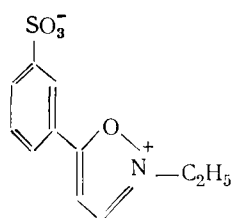
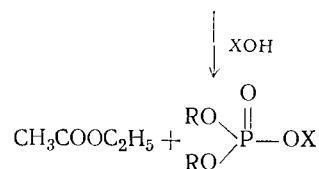
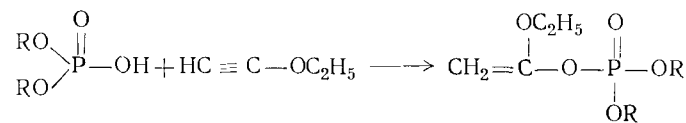
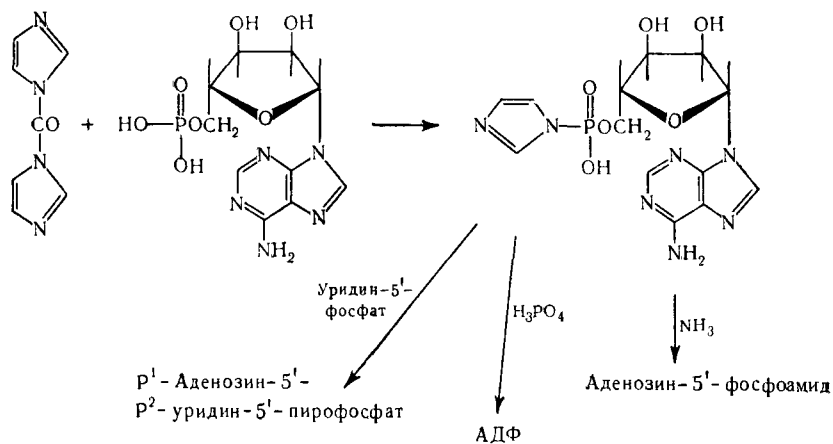
Карбамоилфосфаты (полученные из фосфата и изоцианатов) реагируют с основаниями в водном растворе с переносом карбамоильной группы, но в смеси пиридина с ацетонитрилом они медленно



реагируют с фосфатанионами, давая производные пиродифосфатов [452]. Этот метод синтеза, аналогичный трифторацетангидридом и анионообменному методам, не применялся в области нуклеотидов, но, по-видимому, должен приводить к образованию смеси всех возможных пиродифосфатов, так как перенос остатка карбаминовой кислоты от одного фосфата к другому, надо ожидать, происходит гораздо быстрее, чем образование пиродифосфата. Ангидриды этилгольевой кислоты и нуклеозид-5'-фосфатов, легко получающиеся при обработке нуклеотида этилхлоркарбонатом в водном растворе, оказались не эффективными в реакции такого типа [358].

Из аденозин-5'-фосфата и 1,1'-карбонилдимидазола [456, 457] модифицированным фосфоамидным методом [453, 454] был получен аденозин-5'-имидазол-1-илфосфонат [454, 455]. Обработка нуклеозид-5'-фосфоимидазола фосфорной кислотой приводит к образованию аденозин-5'-пиродифосфата с низким выходом. Нуклеофильная атака аденозин-5'-фосфатом или уридин-5'-фосфатом дает соответствующие динуклеозид-5'-пиродифосфаты; под действием аммиака было осуществлено превращение в аденозин-5'-фосфоамид [454]. Подробно исследовано фосфорилирование ортофосфата и фосфоэфиров моно- и диэфирными имидазолилфосфорной кислоты [415, 416, 453, 458] и моноэфирами димидазолилфосфиновой кислоты и описан синтез различных ди- и моноэтерифицированных пиродифосфатов [453, 458]. При обработке тимидин-5'-фосфата димида-

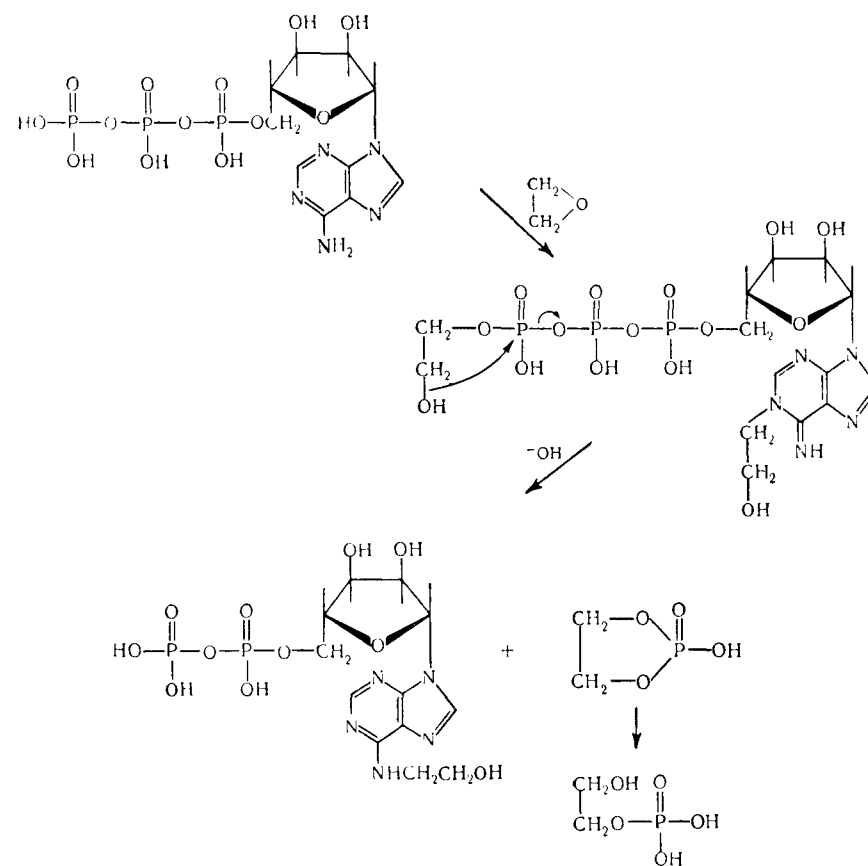
золилфосфиновой кислотой получается P^1, P^3 -димитидин-5'-трифосфат [458].



При действии этоксиацетилена на фосфатные производные (реакция катализируется ионами двухвалентной ртути) образуются 1-алкоксивиниловые эфиры, которые являются фосфорилирующими агентами по отношению к аминам, а также к спиртовым и кислотным гидроксильным группам. Этот подход может оказаться полезным в разработке метода синтеза нуклеотидов и нуклеотидангидридов [459].

N-Этил-5-фенилизоксазолий-3'-сульфонат, применяемый для синтеза пептидов [460], может также оказаться полезным для пирофосфатного синтеза. Первичным промежуточным продуктом в этом случае было бы производное енолфосфата.

Интересный метод синтеза цитидиндифосфоэтаноламина заключается в действии этиленимина на цитидин-5'-пирофосфорную кислоту [461]. Карбодиимидный метод дает в этом случае более низкий



выход и большое число побочных продуктов, которые трудно удалить. Метилирование ЦДФ-этанолamina нидистым метилом приводит к образованию цитидиндифосфохолина.

Уридиндифосфоглюкуроновая кислота была получена прямым каталитическим (над платиной) окислением уридиндифосфоглюкозы [428, 462].

При обработке АТФ окисью этилена образуется Р¹-2-оксиэтил-Р³-(N¹-оксиэтил)аденозин-5'-трифосфат [463]. Последний при щелочном гидролизе в мягких условиях превращается в 6-(2-оксиэтил-амино)-9-β-D-рибофуранозилпурин-5'-пирофосфат [358].

Литература

- Lohmann K., Naturwiss., 17, 624 (1929).
- Fiske C. H., Subbarow Y., Science, 70, 381 (1929).
- Lohmann K., Biochem. Z., 233, 460 (1931).
- Lohmann K., Biochem. Z., 254, 381 (1932).
- Barrenscheen H. K., Jachimowicz T., Biochem. Z., 292, 350 (1937).
- Lythgoe B., Todd A. R., Nature, 155, 695 (1945).
- Makino K., Biochem. Z., 278, 161 (1935).
- Lohmann K., Biochem. Z., 282, 104, 120 (1935).
- Marrian D. H., Biochim. et Biophys. Acta, 13, 278 (1954).
- Liebecq C., Bull. Soc. Chim. Biol., 43, 331 (1961).
- Lieberman I., J. Am. Chem. Soc., 77, 3373 (1955).
- Sacks J., Biochim. et Biophys. Acta, 16, 436 (1955).
- Schmitz H., Hurlbert R. B., Potter V. R., J. Biol. Chem., 209, 41 (1954).
- Schmitz H., Potter V. R., Hurlbert R. B., White D. M., Cancer Research, 14, 66 (1954).
- Bergkvist R., Deutsch A., Acta Chem. Scand., 8, 1889 (1954).
- Smith E. E. B., Mills G. T., Biochim. et Biophys. Acta, 13, 386 (1954).
- Lieberman I., J. Biol. Chem., 223, 327 (1956).
- Sanadi D. R., Gibson D. M., Ayengar P., Jacob M., J. Biol. Chem., 218, 505 (1956).
- Keller E. B., Zamecnik P. C., J. Biol. Chem., 221, 45 (1956).
- Brown G. M., J. Am. Chem. Soc., 80, 3161 (1958).
- Kurahashi K., Pennington R. T., Utter M. F., J. Biol. Chem., 226, 1059 (1957).
- Potter R. L., Schlesinger S., J. Am. Chem. Soc., 77, 6714 (1955).
- Potter R. L., Schlesinger S., Buettner-Janusch V., Thompson L., J. Biol. Chem., 226, 381 (1957).
- Daoust R., Cantero A., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 1, 10 (1954).
- Le Page G. A., J. Biol. Chem., 226, 135 (1957).
- Levedahl B. H., James T. W., Biochim. et Biophys. Acta, 21, 298 (1956).
- McCormick W. G., Levedahl B. H., Biochim. et Biophys. Acta, 34, 303 (1959).
- Hotta K., Brahm J., Morales M., J. Am. Chem. Soc., 83, 997 (1961).

- Hammes G. G., Maciel G. E., Waugh J. S., J. Am. Chem. Soc., 83, 2394 (1961).
- Cohn M., Hughes T. R., J. Biol. Chem., 237, 176 (1962).
- Walaas E., Acta Chem. Scand., 12, 528 (1958).
- Nanninga L. B., Biochim. et Biophys. Acta, 54, 330 (1961).
- Weitzel G., Spehr T., Z. physiol. Chem., 313, 212 (1958).
- Melchior N. C., J. Biol. Chem., 208, 615 (1954).
- Hers H. G., Biochim. et Biophys. Acta, 8, 424 (1952).
- Hock A., Huber G., Biochem. Z., 328, 44 (1956).
- Bielschowsky M., Biochem. J., 47, 105 (1950).
- Lowenstein J. M., Biochem. J., 70, 222 (1958); 75, 269 (1960).
- Lowenstein J. M., Biochim. et Biophys. Acta, 28, 206 (1958).
- Lowenstein J. M., Schatz M. N., J. Biol. Chem., 236, 305 (1961).
- Cook W. H., Lipkin D., Markham R., J. Am. Chem. Soc., 79, 3607 (1957).
- Lipkin D., Markham R., Cook W. H., J. Am. Chem. Soc., 81, 6075 (1959).
- Brintzinger H., Helv. Chim. Acta, 44, 1199 (1961).
- Cook W. H., Lipkin D., неопубликованные данные.
- Cohn M., Hughes T. R., J. Biol. Chem., 235, 3250 (1960).
- Harden A., Young W. J., Proc. Chem. Soc., 21, 189 (1905).
- Dixon M., Nature, 188, 464 (1960).
- von Euler H., Schlenk F., Svensk. Kem. Tidskr., 48, 135 (1936).
- Warburg O., Christian W., Griese A., Biochem. Z., 282, 157 (1935).
- von Euler H., Myrbäck K., Z. physiol. Chem., 233, 95 (1935); 198, 236 (1931).
- von Euler H., Albers H., Schlenk F., Z. physiol. Chem., 240, 113 (1936); 237, 1 (1935).
- Schlenk F., J. Biol. Chem., 146, 619 (1942).
- Schlenk F., Hellstrom H., von Euler H., Chem. Ber., 71, 1471 (1938).
- Atkinson M. R., Morton R. K., Nature, 188, 58 (1960).
- Vestin R., Schlenk F., von Euler H., Chem. Ber., 70, 1369 (1937).
- Warburg O., Christian W., Biochem. Z., 285, 297 (1936).
- Karrer P., Schwarzenbach G., Benz F., Solmssen U., Helv. Chim. Acta, 19, 811 (1936).
- von Euler H., Schlenk F., Z. physiol. Chem., 246, 64 (1937).
- Ohlmeyer P., Biochem. Z., 297, 66 (1938).
- Schlenk F., Arch. Biochem., 3, 93 (1943).
- Karrer P., Ringier B. H., Buchi J., Fritzsche H., Solmssen U., Helv. Chim. Acta, 20, 55 (1937).
- Pullman M. E., San Pietro A., Colowick S. P., J. Biol. Chem., 206, 129 (1954).
- Heiwinkel H., Svensk Vet. Akad. Arkiv. Kemi, 13A, 19 (1939).
- Kornberg A., Pricer W. E., J. Biol. Chem., 182, 763 (1950).
- Kornberg A., J. Biol. Chem., 182, 779 (1950).
- Schlenk F., Naturwiss., 25, 668 (1937).
- von Euler H., Bauer E., Chem. Ber., 71, 411 (1938).
- von Euler H., Adler E., Z. physiol. Chem., 252, 41 (1938).
- Kornberg A., J. Biol. Chem., 182, 805 (1950).
- Kornberg A., Pricer W. E., J. Biol. Chem., 186, 557 (1950).
- Singer T. P., Kearney E. B., Biochim. et Biophys. Acta, 11, 290 (1953); Advances in Enzymol., 15, 79 (1954).

72. Siegel J. M., Montgomery G. A., Bock R. M., Arch. Biochem. Biophys., **82**, 288 (1959).
73. Weber G., J. chim. phys., **55**, 878 (1958).
74. Warburg O., Christian W., Biochem. Z., **298**, 150 (1938).
75. Forrest H. S., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1950**, 3295.
76. Abraham E. P., Biochem. J., **33**, 543 (1939).
77. Kearney E. B., England S., Arch. Biochem. Biophys., **32**, 222 (1951).
78. Schrecker A. W., Kornberg A., J. Biol. Chem., **182**, 795 (1950).
79. Weber G., Biochem. J., **47**, 114 (1950).
80. Hashimoto T., Yoshikawa H., Biochem. Biophys. Research. Commun., **5**, 71 (1961).
81. Mosley W. H., Caputto R., J. Am. Chem. Soc., **80**, 4746 (1958).
82. de Caputto D. P., Mosley W. H., Poyer J. L., Caputto R., J. Biol. Chem., **236**, 2727 (1961).
83. Lipmann F., J. Biol. Chem., **160**, 173 (1945).
84. Lipmann F., Kaplan N. O., J. Biol. Chem., **162**, 743 (1946).
85. de Vries W. H., Govier W. M., Evans J. S., Gregory J. D., Novelli G. D., Soodak M., Lipmann F., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4838 (1950).
86. Baddiley J., Thain E. M., J. Chem. Soc., **1951**, 2253.
87. Gregory J. D., Novelli G. D., Lipmann F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 854 (1952).
88. Brown G. M., Snell E. E., J. Am. Chem. Soc., **75**, 1691 (1953).
89. Brown G. M., Snell E. E., J. Biol. Chem., **198**, 375 (1952).
90. McRorie R. A., Williams W. L., J. Bacteriol., **61**, 737 (1951).
91. Baddiley J., Thain E. M., J. Chem. Soc., **1951**, 2253, 3421; **1952**, 3783.
92. Baddiley J., Thain E. M., J. Chem. Soc., **246**, 3421 (1951).
93. King T. E., Strong F. M., J. Biol. Chem., **189**, 315 (1951).
94. Novelli G. D., Kaplan N. O., Lipmann F., Federation Proc., **9**, 209 (1950).
95. Baddiley J., Thain E. M., J. Chem. Soc., **1952**, 3783; **1953**, 903.
96. Wang T. P., Shuster L., Kaplan N. O., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3204 (1952).
97. Wang T. P., Kaplan N. O., J. Biol. Chem., **206**, 311 (1954).
98. Baddiley J., Thain E. M., J. Chem. Soc., **1951**, 3421.
99. Baddiley J., Thain E. M., J. Chem. Soc., **1953**, 1610.
100. Hoagland M. B., Novelli G. D., J. Biol. Chem., **207**, 767 (1954).
101. Levintow L., Novelli G. D., J. Biol. Chem., **207**, 761 (1954).
102. Brown G. M., J. Biol. Chem., **234**, 370 (1959).
103. Lynen F., Reichert E., Rueff L., Ann., **574**, 1 (1951).
104. Wang T. P., Shuster L., Kaplan N. O., J. Am. Chem. Soc., **74**, 3204 (1952).
105. Berg P., J. Biol. Chem., **222**, 991, 1015, 1025 (1956).
106. Baddiley J., Thain E. M., J. Chem. Soc., **1951**, 3425.
107. Kuhn R., Quadbeck G., Chem. Ber., **84**, 844 (1951).
108. Wieland T., Bokelmann E., Ann., **576**, 20 (1952).
109. Baddiley J., Thain E. M., Science, **117**, 439 (1953).
110. King T. E., Stewart C. J., Cheldelin V. H., Science, **117**, 439 (1953).
111. Schwyzer R., Helv. Chim. Acta, **35**, 1903 (1952).
112. Lynen F., Federation Proc., **12**, 683 (1953).
113. Sanadi D. R., Gibson D. M., Ayengar P., Biochim. et Biophys. Acta, **14**, 434 (1954).
114. Kaufman S., Alivisatos S. G. A., J. Biol. Chem., **216**, 141 (1955).

115. Feuer G., Wollmann M., Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., **10**, 1 (1956).
116. Caputto R., Leloir L. F., Cardini C. E., Paladini A. C., J. Biol. Chem., **184**, 333 (1950).
117. Paladini A. C., Leloir L. F., Biochem. J., **51**, 426 (1952).
118. Trucco R. E., Arch. Biochem. Biophys., **34**, 482 (1951).
119. Munch-Petersen A., Kalckar H. M., Cutolo E., Smith E. E. B., Nature, **172**, 1036 (1953).
120. Leloir L. F., Arch. Biochem. Biophys., **33**, 186 (1951).
121. Anderson L., Landel A. M., Diedrich D. F., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 573 (1956).
122. Kowalsky A., Koshland D. E., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 575 (1956).
123. Kalckar H. M., Maxwell E. S., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 588 (1956).
124. Maxwell E. S., J. Am. Chem. Soc., **78**, 1074 (1956); J. Biol. Chem., **229**, 139 (1957).
125. Maxwell E. S., Robichon-Szulmajster H., J. Biol. Chem., **235**, 308 (1960).
126. Kalckar H. M., Braganca B., Munch-Petersen A., Nature, **172**, 1038 (1953).
127. Neufeld E. F., Ginsburg V., Putman E. W., Fanshler D., Hassid W. Z., Arch. Biochem. Biophys., **69**, 602 (1957).
128. Isselbacher K. J., J. Biol. Chem., **232**, 429 (1958).
129. Kalckar H. M., Anderson E. P., Isselbacher K. J., Biochim. et Biophys. Acta, **20**, 262 (1956).
130. Mills G. T., Smith E. E. B., Lochhead A. C., Biochim. et Biophys. Acta, **25**, 521 (1957).
131. Leloir L. F., Cabib E. J., J. Am. Chem. Soc., **75**, 5445 (1953).
132. Cabib E., Leloir L. F., J. Biol. Chem., **231**, 259 (1958).
133. Leloir L. F., Cardini C. E., J. Am. Chem. Soc., **75**, 6084 (1953).
134. Cardini C. E., Leloir L. F., J. Biol. Chem., **214**, 157 (1955).
135. Gander J. E., Petersen W. E., Boyer P. D., Arch. Biochem. Biophys., **69**, 85 (1957).
136. Watkins W. M., Hassid W. Z., Biochem. Biophys. Research Commun., **5**, 260 (1961).
137. Glaser L., Biochim. et Biophys. Acta, **25**, 436 (1957).
138. de Fekete M. A. R., Leloir L. F., Cardini C. E., Nature, **187**, 918 (1960).
139. Leloir L. F., de Fekete M. A. R., Cardini C. E., J. Biol. Chem., **236**, 636 (1961).
140. Leloir L. F., Olavarria J. M., Goldemberg S. H., Carminatti H., Arch. Biochem. Biophys., **81**, 508 (1959).
141. Leloir L. F., Cardini C. E., J. Am. Chem. Soc., **79**, 6340 (1957).
142. Leloir L. F., Goldemberg S. H., J. Biol. Chem., **235**, 919 (1960).
143. Algranati I. D., Cabib E., Biochim. et Biophys. Acta, **43**, 141 (1960).
144. Recondo E., Leloir L. F., Biochem. Biophys. Research Commun., **6**, 85 (1961).
145. Kornberg A., Zimmerman S. B., Kornberg S. R., Josse J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 772 (1959).
146. Cleland W. W., Kennedy E. P., J. Biol. Chem., **235**, 45 (1960).
147. Ginsburgh V., Stumpf P. K., Hassid W. Z., J. Biol. Chem., **223**, 977 (1956).
148. Smith E. E. B., Galloway B., Mills G. T., Biochim. et Biophys. Acta, **33**, 276 (1959); см. также [473].

149. Smith E. E. B., Galloway B., Mills G. T., Biochem. Biophys. Research Commun., 5, 148 (1961).
150. Dutton G. J., Biochem. J., 64, 693 (1956).
151. Axelrod J., Inscoc J. K., Tomkins G. M., J. Biol. Chem., 232, 835 (1958).
152. Dutton G. J., Storey I. D., Biochem. J., 57, 275 (1954).
153. Smith E. E. B., Mills G. T., Biochim. et Biophys. Acta, 13, 386 (1954).
154. Solms J., Hassid W. Z., J. Biol. Chem., 228, 357 (1957).
155. Smith E. E. B., Mills G. T., Harper E. M., J. Gen. Microbiol., 16, 426 (1957).
156. Strominger J. L., Maxwell E. S., Axelrod J., Kalkar H. M., J. Biol. Chem., 224, 79 (1957).
157. Feingold D. S., Neufeld E. F., Hassid W. Z., Arch. Biochem. Biophys., 78, 401 (1958).
158. Feingold D. S., Neufeld E. F., Hassid W. Z., J. Biol. Chem., 235, 910 (1960).
159. Smith E. E. B., Mills G. T., Harper E. M., Biochim. et Biophys. Acta, 23, 662 (1957).
160. Smith E. E. B., Mills G. T., Bernheimer H. P., Austrian R., J. Biol. Chem., 235, 1876 (1960).
161. Smith E. E. B., Mills G. T., Bernheimer H. P., J. Biol. Chem., 236, 2179 (1961).
162. Smith E. E. B., Galloway B., Mills G. T., Biochem. Biophys. Research Commun., 4, 420 (1961).
163. Cabib E., Leloir L. F., Cardini C. E., J. Biol. Chem., 203, 1055 (1953).
164. Kurtz E., Binkley S. B., Biochim. et Biophys. Acta, 46, 595 (1961).
165. Maley F., Maley G. F., Lardy H. A., J. Am. Chem. Soc., 78, 5303 (1956).
166. Pontis H. G., J. Biol. Chem., 216, 195 (1955).
167. Glaser L., Biochim. et Biophys. Acta, 31, 575 (1959); J. Biol. Chem., 234, 2801 (1959).
168. Glaser L., Brown D. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 41, 253 (1955).
169. Markovitz A., Cifonelli J. A., Dorfman A., J. Biol. Chem., 234, 2343 (1959).
170. Glaser L., Brown D. H., J. Biol. Chem., 228, 729 (1957).
171. Strominger J. L., Biochim. et Biophys. Acta, 17, 283 (1955); J. Biol. Chem., 237, 1388 (1962).
172. Suzuki S., Biochim. et Biophys. Acta, 50, 395 (1961); J. Biol. Chem., 237, 1393 (1962).
173. Gabriel O., Ashwell G., Biochem. Biophys. Research Commun., 6, 89 (1961); J. Biol. Chem., 237, 1400 (1962).
174. Cifonelli J. A., Dorfman A., J. Biol. Chem., 228, 547 (1957).
175. Kent P. W., Lunt M. R., Biochim. et Biophys. Acta, 28, 657 (1958).
176. Maley F., Maley G. F., Lardy H. A., J. Am. Chem. Soc., 78, 5303 (1956).
177. Maley F., Maley G. F., Biochim. et Biophys. Acta, 31, 577 (1959).
178. Park J. T., Johnson M. J., J. Biol. Chem., 179, 585 (1949).
179. Park J. T., J. Biol. Chem., 194, 877, 885, 897 (1952).
180. Park J. T., Strominger J. L., Science, 125, 99 (1957).
181. Strange R. E., Powell J. F., Biochem. J., 58, 80 (1954).
182. Cummins C. S., Harris H., J. Gen. Microbiol., 14, 583 (1956).
183. Strange R. E., Biochem. J., 64, 23P (1956).

184. Kent L. H., Biochem. J., 67, 5P (1957).
185. Strominger J. L., Compt. rend. Lab. Carlsberg, 31, 181 (1959).
186. Strominger J. L., Threnn R. H., Biochim. et Biophys. Acta, 33, 280 (1959).
187. Strominger J. L., Biochim. et Biophys. Acta, 30, 645 (1958).
188. Strominger J. L., J. Biol. Chem., 234, 1520 (1959).
189. Strominger J. L., Threnn R. H., Biochim. et Biophys. Acta, 36, 83 (1959).
190. Strominger J. L., Threnn R. H., Scott S. S., J. Am. Chem. Soc., 81, 3803 (1959).
191. Strominger J. L., Park J. T., Thompson R. E., J. Biol. Chem., 234, 3263 (1959).
192. Ito E., Strominger J. L., J. Biol. Chem., 235, PC5, 7 (1960); 237, 2689, 2696 (1962).
193. Strominger J. L., Ito E., Threnn R. H., J. Am. Chem. Soc., 82, 998 (1960).
194. Strominger J. L., Scott S. S., Threnn R. H., Federation Proc., 18, 334 (1959).
195. Comb D. G., Chin W., Roseman S., Biochim. et Biophys. Acta, 46, 394 (1961).
196. Ito E., Ishimoto N., Saito M., Arch. Biochem. Biophys., 80, 431 (1959).
197. O'Brien P. J., Zilliken F., Biochim. et Biophys. Acta, 31, 543 (1959).
198. Barry G. T., Goebel W. F., Nature, 179, 206 (1957).
199. Comb D. G., Shimizu F., Roseman S., J. Am. Chem. Soc., 81, 5513 (1959).
200. Jourdan G. W., Shimizu F., Roseman S., Federation Proc., 20, 161 (1961).
201. Cooksey K. E., Anwar R. A., Roy C., Watson R. W., Arch. Biochem. Biophys., 94, 541 (1961).
202. Kennedy E. P., Weiss S. B., J. Biol. Chem., 222, 193 (1956).
203. Borkenhagen L. F., Kennedy E. P., J. Biol. Chem., 227, 951 (1957).
204. Weiss S. B., Smith S. W., Kennedy E. P., J. Biol. Chem., 231, 53 (1958).
205. Sribney M., Kennedy E. P., J. Am. Chem. Soc., 79, 5325 (1957).
206. Herbert E., Potter V. R., J. Biol. Chem., 222, 453 (1956).
207. Lieberman I., Berger L., Gimenez W. T., Science, 124, 81 (1956).
208. Williams-Ashman H. G., Banks J., J. Biol. Chem., 223, 509 (1956).
209. Kaufer J. N., Kennedy E. P., J. Biol. Chem., 237, PC270 (1962).
210. Paulus H., Kennedy E. P., J. Am. Chem. Soc., 81, 4436 (1959); J. Biol. Chem., 235, 1303 (1960).
211. Redman C. M., Hokin L. E., Federation Proc., 19, 309 (1960).
212. Baddiley J., Mathias A. P., J. Chem. Soc., 1954, 2723.
213. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., Mathias A. P., Sanderson A. R., Biochem. J., 64, 599 (1956).
214. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., Mathias A. P., Biochem. et Biophys. Acta, 21, 191 (1956).
215. Clarke P. H., Glover P., Mathias A. P., J. Gen. Microbiol., 20, 156 (1959).
216. Baddiley J., Buchanan J. G., Mathias A. P., Sanderson A. R., J. Chem. Soc., 1956, 4186.

217. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., J. Chem. Soc., **1957**, 1869.
218. Shaw D. R. D., Biochem. J., **66**, 56P (1957); **82**, 297 (1962).
219. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., Mathias A. P., J. Chem. Soc., **1956**, 4583.
220. Baddiley J., Buchanan J. G., Carss B., J. Chem. Soc., **1957**, 4058.
221. Baddiley J., Proc. Chem. Soc., **1959**, 177.
222. Armstrong J. J., Baddiley J., Buchanan J. G., Davison A. L., Kelemen M. V., Neuhaus F. C., Nature, **184**, 247 (1959).
223. Saukkonen J. J., Nature, **192**, 816 (1961).
224. Nikaïdo H., Kokura K., Biochem. Biophys. Research Commun., **6**, 304 (1961).
225. Cabib E., Leloir L. F., J. Biol. Chem., **206**, 779 (1954).
226. Ginsburg V., Kirkman H. N., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3481 (1958).
227. Denamur R., Fanconneau G., Guntz G., Compt. rend., **246**, 2820 (1958).
228. Pontis H. G., James A. L., Baddiley J., Biochim. et Biophys. Acta, **33**, 588 (1959); Biochem. J., **75**, 428 (1960).
229. Heath E. C., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 377 (1960).
230. Ginsburg V., O'Brien P. J., Hall C. W., J. Biol. Chem., **237**, 497 (1962).
231. Su J. C., Hassid W. Z., J. Biol. Chem., **235**, PC36 (1960); Biochemistry, **1**, 474 (1962).
232. Munch-Petersen A., Arch. Biochem. Biophys., **55**, 592 (1955).
233. Ginsburg V., J. Am. Chem. Soc., **80**, 4426 (1958).
234. Ginsburg V., J. Biol. Chem., **235**, 2196 (1960).
235. Ginsburg V., J. Biol. Chem., **236**, 2389 (1961).
236. Markovitz A., Biochem. Biophys. Research Commun., **6**, 250 (1961).
237. Sugino Y., J. Am. Chem. Soc., **79**, 5074 (1957); Biochim. et Biophys. Acta, **40**, 425 (1960).
238. Potter R. L., Buettner-Janusch V., J. Biol. Chem., **233**, 462 (1958).
239. Kennedy E. P., Borkenhagen L. F., Smith S. W., J. Biol. Chem., **234**, 1998 (1959).
240. Strominger J. L., Scott S. S., Biochim. et Biophys. Acta, **35**, 552 (1959).
241. Okazaki R., Biochem. Biophys. Research Commun., **1**, 34 (1959); Biochim. et Biophys. Acta, **44**, 478 (1960).
242. Okazaki R., Okazaki T., Kuriki Y., Biochim. et Biophys. Acta, **38**, 384 (1960).
243. Baddiley J., Blumsom N. L., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 376 (1960).
244. Blumsom N. L., Baddiley J., Biochem. J., **81**, 114 (1961).
245. Baddiley J., Blumsom N. L., Girolamo A., Girolamo M., Biochim. et Biophys. Acta, **50**, 391 (1961).
246. Barber G. A., Neufeld E. F., Biochem. Biophys. Research Commun., **6**, 44 (1961); Barber G. A., Biochemistry, **1**, 463 (1962).
247. Burger M., Glaser L., Burton R. M., Biochim. et Biophys. Acta, **56**, 172 (1962).
248. Kornfeld S., Glaser L., J. Biol. Chem., **236**, 1791 (1961); Biochim. et Biophys. Acta, **42**, 548 (1960).
249. Pazur J. H., Shuey E. W., J. Biol. Chem., **236**, 1780 (1961).
250. Pazur J. H., Shuey E. W., J. Am. Chem. Soc., **82**, 5009 (1960).

251. Okazaki R., Okazaki T., Strominger J. L., Federation Proc., **20**, 85 (1961).
252. Kornfeld S., Glaser L., Federation Proc., **20**, 84 (1961).
253. Glaser L., Kornfeld S., J. Biol. Chem., **236**, 1795 (1961).
254. Glaser L., Biochim. et Biophys. Acta, **51**, 169 (1961).
255. Okazaki R., Okazaki T., Strominger J. L., Michelson A. M., J. Biol. Chem., **237**, 3014 (1962).
256. Kornfeld S., Glaser L., Biochim. et Biophys. Acta, **56**, 184 (1962).
257. Bernstein S., McGilvery R. W., J. Biol. Chem., **199**, 745 (1952).
258. de Meio R. H., Wizerkaniuk M., Schreibman I., J. Biol. Chem., **213**, 439 (1955).
259. d'Abramo F., Lipmann F., Biochim. et Biophys. Acta, **25**, 211 (1957).
260. Suzuki S., Strominger J. L., J. Biol. Chem., **235**, 257, 267, 274 (1960).
261. Robbins P. W., Lipmann F., J. Biol. Chem., **229**, 837 (1957).
262. Bandurski R. S., Wilson L. G., Squires C. L., J. Am. Chem. Soc., **78**, 6408 (1956).
263. Robbins P. W., Lipmann F., J. Am. Chem. Soc., **78**, 6409 (1956).
264. Robbins P. W., Lipmann F., J. Biol. Chem., **233**, 681 (1958).
265. Wilson L. G., Bandurski R. S., J. Am. Chem. Soc., **80**, 5576 (1958).
266. Bandurski R. S., Wilson L. G., Asahi T., J. Am. Chem. Soc., **82**, 3218 (1960).
267. Wilson L. G., Asahi T., Bandurski R. S., J. Biol. Chem., **236**, 1822 (1961).
268. Hilz H., Kittler M., Knape G., Biochem. Z., **332**, 151 (1959).
269. Peck H. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 701 (1959); Biochim. et Biophys. Acta, **49**, 621 (1961); J. Biol. Chem., **237**, 198 (1962).
270. Peck H. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **46**, 1053 (1960).
271. Peck H. D., Fisher E., J. Biol. Chem., **237**, 190 (1962).
272. Wilson L. G., Bandurski R. S., Arch. Biochem. Biophys., **62**, 503 (1956).
273. Tsuyuki H., Idler D. R., J. Am. Chem. Soc., **79**, 1771 (1957).
274. Berg P., J. Am. Chem. Soc., **77**, 3163 (1955).
275. Berg P., J. Biol. Chem., **222**, 991 (1956).
276. Boyer P. D., Koeppe O. J., Luchsinger W. W., Falcone A. B., Federation Proc., **14**, 185 (1955).
277. Talbert P. T., Huennkens F. M., J. Am. Chem. Soc., **78**, 4671 (1956).
278. Stern J. R., Friedman D. L., Menon G. K. K., Biochim. et Biophys. Acta, **36**, 299 (1959).
279. Chantrenne H., J. Biol. Chem., **189**, 227 (1951).
280. Schachter D., Taggart J. V., J. Biol. Chem., **203**, 925 (1953); **208**, 263 (1954).
281. Moldave K., Meister A., Biochim. et Biophys. Acta, **25**, 434 (1957).
282. Maas W. K., Novelli G. D., Arch. Biochem. Biophys., **43**, 236 (1953).
283. Jencks W. P., Lipmann F., J. Biol. Chem., **225**, 207 (1957).
284. Whitehouse M., Moeksi H., Gurin S., J. Biol. Chem., **226**, 813 (1957).
285. Elliott W. H., Biochem. J., **62**, 427, 433 (1956).

286. Ratner S., Petrack B., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 582 (1956).
287. Reed L. J., Leach F. R., Koike M., Levitch M. E., Federation Proc., **16**, 236 (1957).
288. Hoagland M. B., Stephenson M. L., Scott J. F., Hecht L. I., Zamecnik P. C., J. Biol. Chem., **231**, 241 (1958).
289. Hoagland M. B., Keller E. B., Zamecnik P. C., J. Biol. Chem., **218**, 345 (1956).
290. de Moss J. A., Novelli G. D., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 49 (1956).
291. Berg P., J. Biol. Chem., **222**, 1025 (1956); **233**, 601 (1958).
292. Karasek M., Castelfranco P., Krishnaswamy P. R., Meister A., J. Am. Chem. Soc., **80**, 2335 (1958).
293. Webster L. T., Davie E. W., Biochim. et Biophys. Acta, **35**, 559 (1959).
294. Bergman F. H., Berg P., Preiss J., Ofengand E. J., Dieckmann M., Federation Proc., **18**, 751 (1959).
295. Acs G., Hartmann G., Boman H. G., Lipmann F., Federation Proc., **18**, 700 (1959).
296. Zillig W., Schachtschabel D., Krone W., Z. physiol. Chem., **318**, 100 (1960).
297. Sharon N., Lipmann F., Arch. Biochem. Biophys., **69**, 219 (1957).
298. Kalyankar G. D., Meister A., J. Am. Chem. Soc., **81**, 1515 (1959); J. Biol. Chem., **234**, 3210 (1959).
299. Berg P., J. Biol. Chem., **222**, 1015 (1956).
300. Moldave K., Castelfranco P., Meister A., J. Biol. Chem., **234**, 841 (1959).
301. Jencks W. P., Biochim. et Biophys. Acta, **24**, 227 (1957).
302. Weiss S. B., Zachau H. G., Lipmann F., Arch. Biochem. Biophys., **83**, 101 (1959).
303. Chantrenne H., Biochim. et Biophys. Acta, **4**, 484 (1950); Nature, **160**, 603 (1947); **164**, 576 (1949).
304. Katchalsky A., Paecht M., J. Am. Chem. Soc., **76**, 6042 (1954).
305. Castelfranco P., Moldave K., Meister A., J. Am. Chem. Soc., **80**, 2335 (1958).
306. Reith W. S., Nature, **178**, 1393 (1956).
307. Gilbert D. A., Yemm E. W., Nature, **182**, 1745 (1958).
308. Hansen R. G., Hageman E., Arch. Biochem. Biophys., **62**, 511 (1956).
309. Schuur A. H. W. M., de Kloet S. R., Koningsberger V. V., Biochem. Biophys. Research Commun., **3**, 300 (1960).
310. Pontis H. S., Biochim. et Biophys. Acta, **25**, 417 (1957).
311. Ginsburg V., O'Brien P. J., Hall C. W., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 220 (1962).
312. Niemierko W., Dydniska M., Drabikowski W., Karkol I., Zaluska H., Acta Biol. Exptl., **17**, 373 (1957).
313. Ishihara H., J. Biochem. (Tokyo), **47**, 196 (1960).
314. Habermann V., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 297 (1959).
315. Медведев Ж. А., Заболотский Н. Н., РЖ химия, биохимия, № 15523 (1959).
316. Hoagland M. B., Rec. Trav. Chim., **77**, 623 (1958).
317. Koningsberger V. V., van der Grinten C. O., Overbeek J. T., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 483 (1957).
318. Harris G., Davies J. W., Parsons R., Nature, **182**, 1565 (1958).
319. Davies J. W., Harris G., Neal G. E., Biochim. et Biophys. Acta, **51**, 95 (1961).

320. Gilbert D. A., Yemm E. W., Nature, **182**, 1745 (1958).
321. Schuur A. H. W. M., Koningsberger V. V., Biochim. et Biophys. Acta, **44**, 167 (1960).
322. Harris G., Davies J. W., Nature, **184**, 788 (1959).
323. Davies J. W., Harris G., Proc. Roy. Soc., **151B**, 537 (1960).
324. Davies J. W., Harris G., Biochim. et Biophys. Acta, **45**, 28 (1960).
325. Harris G., Neal G. E., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 122 (1961).
326. Dirheimer G., Weil J. H., Ebel J. P., Compt. rend., **246**, 3384 (1958).
327. Cerna J., Grunberger D., Sorm F., Collection Czechslov. Chem. Commun., **26**, 1212 (1961).
328. Wilken D. R., Hansen R. G., Federation Proc., **19**, 309 (1960).
329. Weinstein C., Seifter S., Berkman J. I., Federation Proc., **19**, 234 (1960).
330. Ondarza R. N., Aubanel M., Biochim. et Biophys. Acta, **44**, 381 (1960).
331. Szafranski P., Sulkowski E., Golaszewski T., Nature, **184**, 1940 (1959).
332. Szafranski P., Sulkowski E., Golaszewski T., Heller J., Acta Biochim. Polon., **7**, 151 (1960).
333. Szafranski P., Bagdasarian M., Nature, **190**, 719 (1961).
334. Hase E., Mihara S., Otsuka H., Tamiya H., Arch. Biochem. Biophys., **83**, 170 (1959); Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 298 (1959).
335. Hase E., Mihara S., J. Gen. Appl. Microbiol., **5**, 221 (1960).
336. Hase E., Mihara S., Tamiya H., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 381 (1960).
337. Brown A. D., Biochem. J., **71**, 5P (1959).
338. Bergkvist R., Acta Chem. Scand., **12**, 364 (1958).
339. Potter J. L., Dounce A. L., J. Am. Chem. Soc., **78**, 3078 (1956).
340. Прокофьев М. А., Антонович Е. Г., Богданов А. А., Биохимия, **25**, 931 (1960).
341. Ellfolk N., Katunuma N., Arch. Biochem. Biophys., **81**, 521 (1959).
342. Wilken D. R., Hansen R. G., J. Biol. Chem., **236**, 1051 (1961).
343. Penn N. W., Federation Proc., **19**, 350 (1960).
344. Walter H., Nature, **188**, 643 (1960).
345. Miettinen J. K., Savioja T., Biochem. J., **76**, 66P (1960).
346. Davies J. W., Harris G., Biochim. et Biophys. Acta, **45**, 39 (1960).
347. Baddiley J., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1947**, 648.
348. Baddiley J., Clark V. M., Michalski J. J., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 815.
349. Baddiley J., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 582.
350. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1949**, 2487.
351. Corby N. S., Kenner G. W., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 3669.
352. Kenner G. W., Todd A. R., Weymouth F. J., J. Chem. Soc., **1952**, 3675.
353. Kenner G. W., Todd A. R., Webb R. F., Weymouth F. J., J. Chem. Soc., **1954**, 2288.
354. Corby N. S., Kenner G. W., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 1234.
355. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1958**, 1957.
356. Beránek J., Smrt J., Collection Czechslov. Chem. Commun., **25**, 2029 (1960).
357. Szer W., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **8**, 235 (1961).

358. Michelson A. M., неопубликованные данные (см., например, [439a]).
359. Griffin B. E., Todd A., J. Chem. Soc., **1958**, 1389.
360. Forrest H. S., Mason H. S., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 2530.
361. Christie S. M. H., Kenner G. W., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1954**, 46.
362. Michelson A. M., Todd A., J. Chem. Soc., **1956**, 3459.
363. Шабарова З. А., Сатарова Л. Г., Прокофьев М. А., ДАН СССР, **123**, 864 (1958).
364. Швачкин Ю. П., Сырцова Л. А., Прокофьев М. А., ЖОХ, **30**, 2462 (1960).
365. Kenner G. W., Reese C. B., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1958**, 546.
366. Christie S. M. H., Elmore D. T., Kenner G. W., Todd A. R., Weymouth F. J., J. Chem. Soc., **1953**, 2947.
367. Shuster L., Kaplan N. O., Stolzenbach F. E., J. Biol. Chem., **215**, 195 (1955).
368. Le Luca C., Kaplan N. O., J. Biol. Chem., **223**, 569 (1956).
369. Baddiley J., Buchanan J. G., Letters R., J. Chem. Soc., **1957**, 1067.
370. Baddiley J., Buchanan J. G., Letters R., Sanderson A. R., J. Chem. Soc., **1959**, 1731.
371. Ikehara M., Ohtsuka E., Kitagawa S., Yagi K., Tonomura Y., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2679 (1961).
372. Bachhawat B. K., Woessner J. F., Coon M. J., Federation Proc., **15**, 214 (1956).
373. Avison A. W. D., J. Chem. Soc., **1955**, 732.
374. Berg P., J. Biol. Chem., **222**, 1015 (1956).
375. Kellerman G. M., J. Biol. Chem., **231**, 427 (1958).
376. Moyed H. S., Lipmann F., J. Bacteriol., **73**, 117 (1957).
377. Peng C. H. L., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 42 (1956).
378. Whitehouse M., Moeksi H., Gurin S., J. Biol. Chem., **226**, 813 (1957).
379. Vignais P. V., Zabin I., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 263 (1958).
380. Reed L. J., Leach F. R., Loike M., J. Biol. Chem., **232**, 123 (1958).
381. Khorana H. G., Vizsolyi J. P., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4660 (1959).
382. Zetsche F., Lüscher E., Meyer H. E., Chem. Ber., **71**, 1088 (1938).
383. Khorana H. G., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1953**, 2257.
384. Lowenstein J. M., Biochem. Preparations, **7**, 5 (1960).
385. Huennekens F. M., Kilgour G. L., J. Am. Chem. Soc., **77**, 6716 (1955).
386. Kenner G. W., Todd A. R., Webb R. F., J. Chem. Soc., **1954**, 2843.
387. Smith M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1141 (1958).
388. Way J. L., Dahl J. L., Parks R. E., J. Biol. Chem., **234**, 1241 (1959).
389. Hughes N. A., Kenner G. W., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1957**, 3733.
390. Kennedy E. P., J. Biol. Chem., **222**, 185 (1956).
391. Smith M., Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6204 (1958).
392. Paulus H., Kennedy E. P., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4436 (1959); J. Biol. Chem., **235**, 1303 (1960).

393. Baddiley J., Buchanan J. G., Sanderson A. R., J. Chem. Soc., **1958**, 3107.
394. Baddiley J., Buchanan J. G., Fawcett C. P., J. Chem. Soc., **1959**, 2192.
395. Reichard P., Ringertz N. R., J. Am. Chem. Soc., **81**, 878 (1959).
396. Rhodes W. C., McElroy W. D., J. Biol. Chem., **233**, 1528 (1958).
397. Oertel G. W., Arch. Biochem. Biophys., **85**, 564 (1959).
398. Oertel G. W., Agashe B. D., Biochim. et Biophys. Acta, **45**, 1 (1960).
399. Berg P., J. Biol. Chem., **233**, 608 (1958).
400. Lambert R., Zilliken F., Gurin S., Angew. Chem., **70**, 571 (1958).
401. Moldave K., Castelfranco P., Meister A., J. Biol. Chem., **234**, 841 (1959).
402. McCorquodale D. J., Mueller G. C., Arch. Biochem. Biophys., **77**, 13 (1958).
403. Baddiley J., Hughes N. A., Advances in Enzymology, **22**, 157 (1960).
404. Harris G., Davies J. W., Nature, **184**, 788 (1959).
405. Tuboi S., Huzino A., Arch. Biochem. Biophys., **86**, 309 (1960).
406. Harris G., MacWilliam I. C., J. Chem. Soc., **1961**, 2053.
407. Talbert P. T., Huennekens F. M., J. Am. Chem. Soc., **78**, 4671 (1956).
408. Atherton F. R., Morrison A. L., Cremlyn R. J. W., Kenner G. W., Todd A. R., Webb R. F., Chem. and Ind., **1955**, 1183.
409. Chase B. H., Kenner G. W., Todd A. R., Webb R. F., J. Chem. Soc., **1956**, 1371.
410. Cramer F., Baldauf H. J., Angew. Chem., **72**, 627 (1960); Cramer F., Scheit K. H., Baldauf H. J., Chem. Ber., **95**, 1657 (1962).
411. Wittman R., Cramer F., Angew. Chem., **73**, 220 (1961).
412. Stokes H. N., Am. Chem. J., **15**, 198 (1893).
413. Clark V. M., Kirby G. W., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1957**, 1497.
414. Chambers R. W., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3749 (1958).
415. Baddiley J., Buchanan J. G., Letters R., J. Chem. Soc., **1956**, 2812.
416. Rathlev T., Rosenberg T., Arch. Biochem. and Biophys., **65**, 319 (1956).
417. Jencks W. P., Lipmann F., J. Biol. Chem., **225**, 207 (1957).
418. Borgström B., Acta Chem. Scand., **12**, 1533 (1958).
419. Ueda T., Ohtsuka E., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **7**, 740 (1959).
420. Koerner J. F., Varadarajan S., J. Biol. Chem., **235**, 2688 (1960).
421. Chambers R. W., Moffatt J. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3752 (1958).
422. Chambers R. W., J. Am. Chem. Soc., **81**, 3032 (1959).
423. Chambers R. W., Shapiro P., Kurkov V., J. Am. Chem. Soc., **82**, 970 (1960).
424. Lengyel P., Chambers R. W., J. Am. Chem. Soc., **82**, 752 (1960).
425. Moffatt J. G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3756 (1958).
426. Ueda T., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **8**, 464 (1960).

427. Кочетков Н. К., Будовский Е. И., Шибяев В. Н., *Biochim. et Biophys. Acta*, **53**, 415 (1961).
428. Honjo M., Furukawa Y., Imai K., Moriyama H., Tanaka K., *Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo)*, **8**, 750 (1960); **10**, 225 (1962).
429. Ueda T., Ohtsuka E., *Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo)*, **7**, 389 (1959).
430. Baddiley J., Hughes N. A., James A. L., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 2574; см. также [472].
431. Kessler D., Moss B., Chambers R. W., *Biochim. et Biophys. Acta*, **38**, 549 (1960).
432. Tanaka K., Honjo M., Sanno Y., Moriyama H., *Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo)*, **8**, 749 (1960); **10**, 220 (1962).
433. Moffatt J. G., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 649 (1961).
434. Roseman S., Distler J. J., Moffatt J. G., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 659 (1961).
435. Agranoff B. W., Bradley R. M., *Federation Proc.*, **20**, 281 (1961).
436. Moffatt J. G., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 663 (1961).
437. Michelson A. M., *Chem. and Ind.*, **1960**, 1267.
438. Michelson A. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **91**, 1 (1964).
439. (a) Letters R., Michelson A. M., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **45**, 1353 (1963); (6) Michelson A. M., *Letters, Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 242 (1964).
440. Michelson A. M., Dondon J., Grunberg-Manago M., *Biochim. et Biophys. Acta*, **55**, 529 (1962).
441. Michelson A. M., Wold F., *Biochemistry*, **1**, 1171 (1962).
442. Michelson A. M., *Biochim. et Biophys. Acta*, **50**, 605 (1961). *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 71 (1964).
443. Michelson A. M., *Ann. Revs. Biochem.*, **30**, 133 (1961).
444. Riess J., Ourisson G., *Bull. soc. chim.*, **1961**, 1243.
445. Michelson A. M., Strasbourg Meeting on RNA and Polyphosphates, July, 1961.
446. Cramer F., Wittmann R., *Chem. Ber.*, **94**, 322, 328 (1961).
447. Anand N., Clark V. M., Hall R. H., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, **1952**, 3665.
448. Hasselbach W., *Acta Biol. et Med. Ger.*, **2**, 13 (1959) [*C. A.* **54**, 9944 (1960)].
449. Clark V. M., Hutchinson D. W., Todd A. R., *Nature*, **187**, 59 (1960); *J. Chem. Soc.*, **1961**, 722.
450. Andrews K. J. M., *J. Chem. Soc.*, **1961**, 1808.
451. Brown D. M., Hamer N. K., *Proc. Chem. Soc.*, **1960**, 212.
452. Cramer F., Winter M., *Chem. Ber.*, **92**, 2761 (1959).
453. Cramer F., Schaller H., *Chem. Ber.*, **94**, 1634 (1961).
454. Goldman L., Marsico J. W., Anderson G. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2969 (1960); см. также [475].
455. Cramer F., Schaller H., Staab H. A., *Chem. Ber.*, **94**, 1612 (1961).
456. Staab H. A., Schaller H., Cramer F., *Angew. Chem.*, **71**, 736 (1959).
457. Staab H. A., *Ann.*, **609**, 75 (1957).
458. Schaller H., Staab H. A., Cramer F., *Chem. Ber.*, **94**, 1621 (1961).
459. Wasserman H. H., Cohen D., *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4435 (1960).

460. Woodward R. B., Olofson R. A., Mayer H., *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1010 (1961).
461. Sanno Y., Tanaka K., *Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo)*, **8**, 753 (1960).
462. Jacobson B., Davidson E. A., *Nature*, **189**, 663 (1961).
463. Windmueller H. G., Kaplan N. O., *J. Biol. Chem.*, **236**, 2716 (1961).
464. Cramer F. D., Weimann G., *Chem. and Ind.*, **1960**, 46.
465. Harris G., Wiseman A., *Biochim. et Biophys. Acta*, **55**, 374, 775, 929 (1962).
466. Harris G., Wiseman A., *Biochim. et Biophys. Acta*, **55**, 396 (1962).
467. Pazur J. H., Kleppe K., Cepure A., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **7**, 157 (1962).
468. Strominger J. L., неопубликованные данные.
469. Okazaki T., Okataki R., Strominger J. L., Suzuki S., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **7**, 300 (1962).
470. Roseman S., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **48**, 437 (1962).
471. Kobata A., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **7**, 346 (1962).
472. Carlson D. M., Hansen R. G., *J. Biol. Chem.*, **237**, 1260 (1962).
473. Barber G. A., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **8**, 204 (1962).
474. Mandelstam P., Loercher R., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.*, **237**, 2683 (1962).
475. Cramer F., Neunhoeffer H., *Chem. Ber.*, **95**, 1664 (1962).
476. Bernhauer K., Wagner F., *Biochem. Z.*, **335**, 453 (1962).

Глава 5

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ,
НУКЛЕОТИДАГИДРИДОВ
И ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

Биохимические пути синтеза нуклеотидов и их производных в настоящее время тщательно изучены [1] и будут рассмотрены здесь очень коротко. Большая часть первоначальных сведений была получена в результате опытов с мечеными атомами *in vivo*; в других методах использовались биохимические мутанты (особенно *Neurospora*) и непосредственное изучение очищенных ферментных систем *in vitro*. Различные существующие в настоящее время схемы до некоторой степени идеализированы, так как они построены на основании результатов, полученных на большом, но не исчерпывающем числе микроорганизмов и органов.

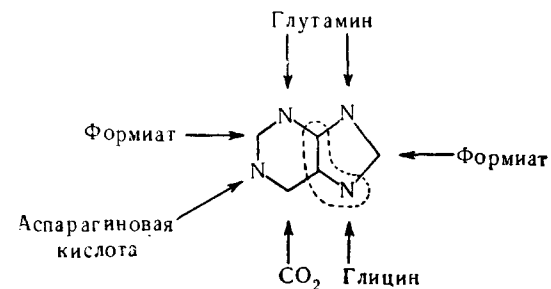
Следует отметить, что все промежуточные продукты биосинтеза, участвующие в синтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов *de novo*, содержат функциональные группы (карбоксильные или фосфатные), которые практически полностью ионизированы при физиологических значениях pH; незаряженные метаболиты являются, как правило, продуктами выделения и катаболизма. Причина «важности ионизированного состояния» заключается, возможно, в более эффективном удерживании ионизированных веществ внутри клетки или ее органелл [2].

В основе многих биохимических реакций нуклеозид-5'-полифосфатов, возможно, лежит другой принцип — «важность отсутствия состояния ионизации».

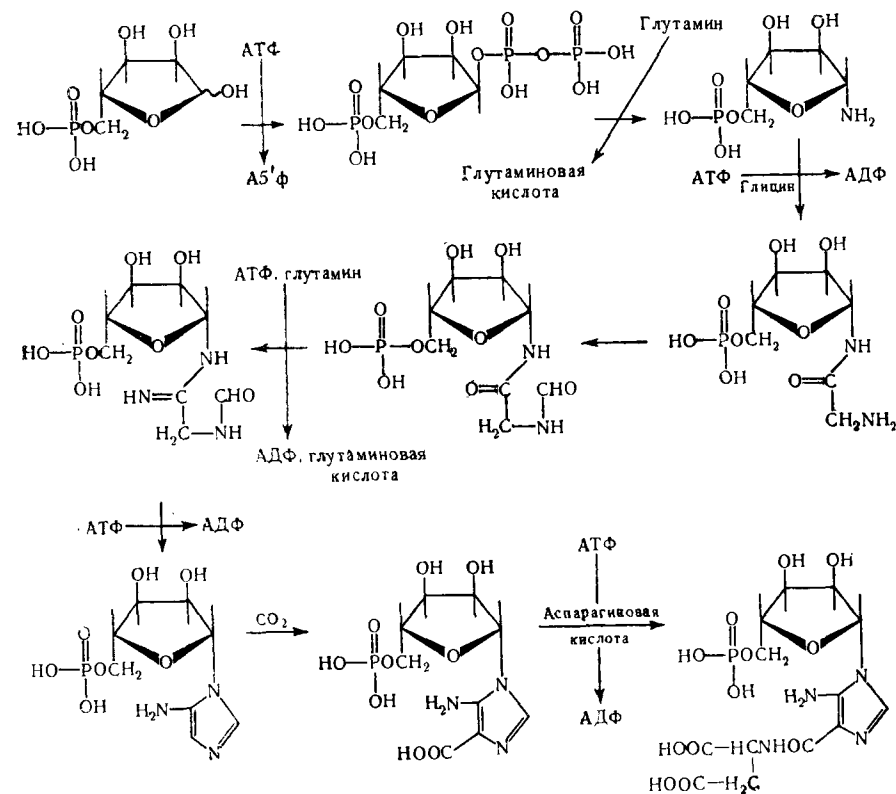
ПУРИНОВЫЕ НУКЛЕОТИДЫ

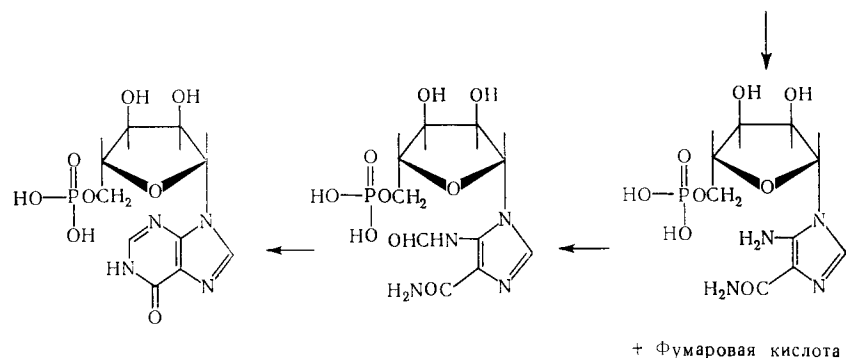
Важную роль в изучении синтеза пуринов *de novo* сыграли опыты, проведенные на голубях и продуктах их выделения. Изучение обмена мочевой кислоты привело к установлению происхождения группировок атомов пуринового кольца, как показано на схеме на стр. 301.

Дальнейшее исследование показало, что гипоксантин образовывался из тех же метаболитов и что прямым предшественником свободных пуринов является инозин-5'-фосфат. При помощи частично очищенных ферментных систем из печени голубя были последовательно выделены и идентифицированы различные промежуточные продукты (все, за исключением рибозиламин-5-фосфата).



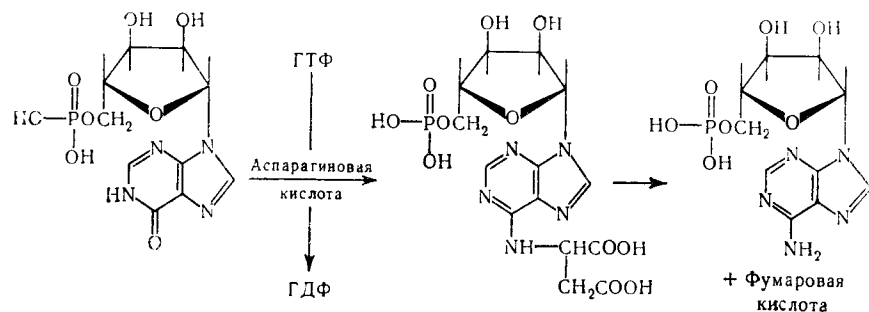
Гирофосфорилирование рибозо-5-фосфата АТФ дает 5-фосфорибозо-1-пирофосфат, который реагирует с глутамином, образуя неорганический пирофосфат, глутаминовую кислоту и рибофуранозиламин-5-фосфат. Дальнейшая реакция этого амина с глицином и АТФ приводит к производному глицина, которое затем формилируется





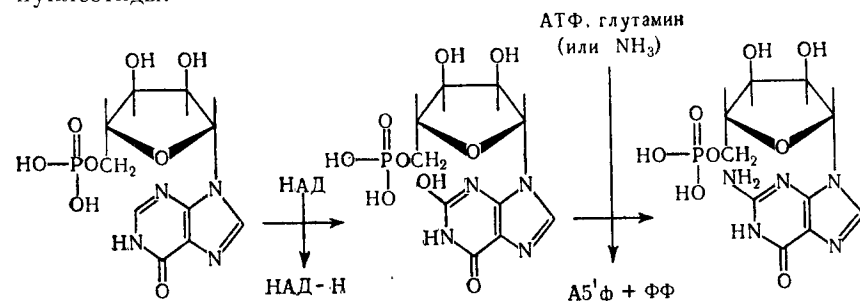
смешанным ангидридом муравьиной и тетрагидрофолиевой кислоты (возникающим в результате реакции формиата с АТФ и тетрагидрофолиевой кислотой). Глицинамидиновое соединение образуется в результате последовательного воздействия глутамин и АТФ. Циклизация этого формилглицинамидинового производного рибозо-5-фосфата (снова необходим АТФ) приводит к получению 5-амино-1-β-D-рибофуранозилимидазол-5'-фосфата. Карбоксилирование дает 5-аминоимидазол-4-карбоновую кислоту, которая с аспарагиновой кислотой и АТФ образует сукцинилпроизводное; последнее расщепляется до фумаровой кислоты и 5-амино-1-β-D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид-5'-фосфата. Формилирование аминогруппы (N¹⁰-формилтетрагидрофолиевой кислотой) приводит к получению формамидопроизводного, которое при циклизации превращается в инозин-5'-фосфат.

Адениновые и гуаниновые нуклеотиды образуются затем в результате ряда взаимных переходов. При действии аспарагиновой кислоты и гуанозин-5'-фосфата происходит аминирование инозин-5'-фосфата с образованием промежуточной аденилилантарной кислоты с последующим отщеплением фумаровой кислоты и аденозин-5'-фосфата.

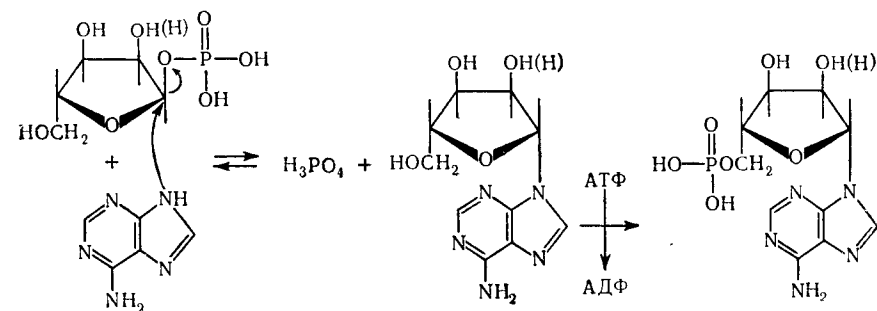


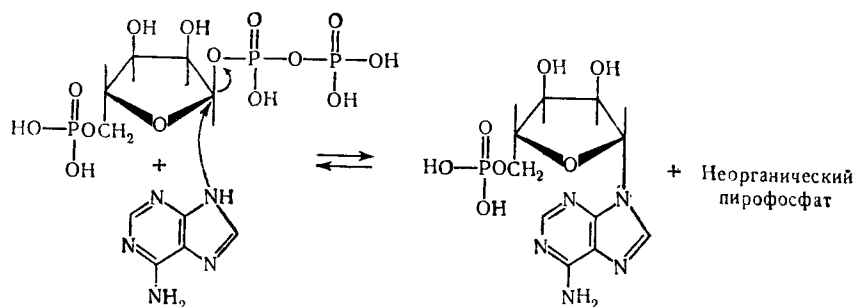
Превращение инозиновой кислоты в гуаниловую кислоту зависит от промежуточного образования ксантозин-5'-фосфата в результате окислительных процессов, протекающих при участии НАД и дегидрогеназы. При переносе амидного азота глутамин на C₂ ксантиловой кислоты образуется гуанозин-5'-фосфат, вероятно, при одновременном взаимодействии ксантиловой кислоты с АТФ и глутамином. В бактериальных системах источником аминогруппы служит не глутамин, а аммиак (ср. аминирование уридин-5'-фосфата).

Другие пути синтеза пуриновых нуклеотидов de novo пока еще не обнаружены, и, вероятно, описанный выше путь является довольно общим. Однако существуют ферментные системы, которые используют свободные пурины, например гликозилирующие рибозо-1-фосфат (или 2-деоксирибозо-1-фосфат) путем реакции фосфорилиза с образованием нуклеозидов, которые затем фосфорилируются АТФ. Напротив, катализируемый ферментами пирофосфоролит рибозо-1-пирофосфат-5-фосфатом дает непосредственно нуклеотиды.



В то время как действие ингибиторов может осуществляться несколькими путями, многие аналоги пуринов, которые ингибируют клеточный обмен, биологически активны лишь тогда, когда они превращаются в нуклеотиды в результате таких ферментатив-





ных реакций; и действительно, устойчивость некоторых мутантов *Streptococcus faecalis* к 6-меркаптопурина и 8-азагуанину объясняется тем, что клетки потеряли способность превращать аналог в нуклеотид посредством пирофосфоролиза рибозо-1-пирофосфат-5-фосфатом.

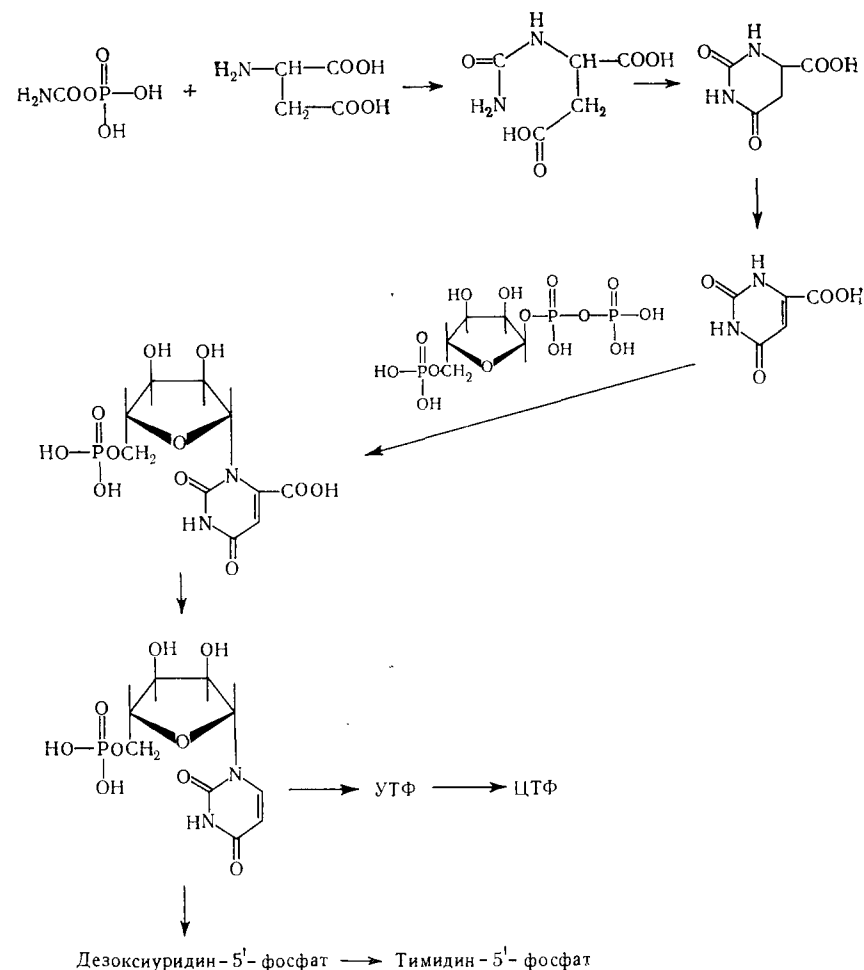
ПИРИМИДИНОВЫЕ НУКЛЕОТИДЫ

Основной путь синтеза пиримидинов *de novo* включает образование оротовой кислоты из простых предшественников. Аспарагиновая кислота карбамилуется карбамилфосфатом (образующимся из аммиака, двуокиси углерода и АТФ) с образованием карбамил-L-аспарагиновой кислоты (уреидоантарной кислоты), которая при циклизации превращается в дигидрооротовую кислоту. Ферментативное окисление дает оротовую кислоту, которая с рибозо-1-пирофосфат-5-фосфатом образует уридин-5'-фосфат. Последний при действии декарбоксилазы превращается в уридин-5'-фосфат (см. схему на стр. 305).

В случае печени птицы может иметь значение другой путь, который включает превращение карбамил-β-аланинриботида в дигидроуридин-5'-фосфат с последующим окислением до нуклеотида.

Показано, что для урацила и других оснований протекают иные ферментативные синтезы, аналогичные гликозилированию оротовой кислоты рибозо-1-пирофосфат-5-фосфатом. Последовательное действие пиридиннуклеозидфосфорилазы (которая также осуществляет трансгликозилирование вследствие обратимого характера реакции) и пиридиннуклеозидкиназы обеспечивает процесс, который протекает в определенных условиях при синтезе нуклеотидов.

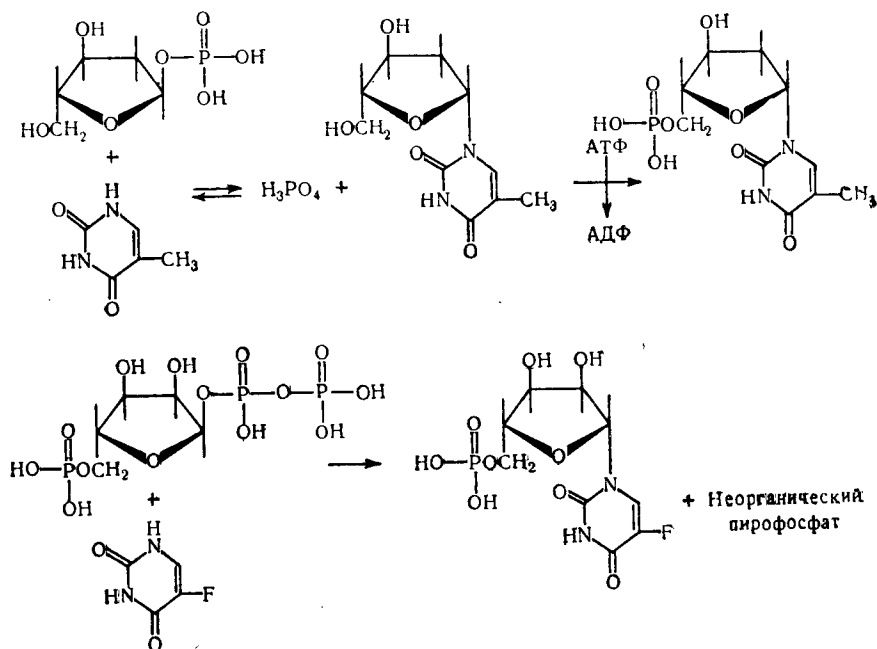
Эти последние реакции имеют особое значение при ингибировании метаболизма пиримидинов такими аналогами, как 4-азаурацил (или его нуклеозид). В опухолевых тканях 4-азаурацил превращается в нуклеозид и нуклеотид-5'-фосфат, и, вероятно, основное



биохимическое нарушение, приводящее к замедлению роста опухоли 4-азауридином, состоит в ингибировании уридин-5'-фосфатдекарбоксилазы 4-азауридин-5'-фосфатом. Однако в общем случае пути, не включающие промежуточного образования оротовой кислоты, имеют большее значение в катаболических процессах.

Ключевое промежуточное соединение — уридин-5'-фосфат — превращается в другие пиридиновые нуклеотиды в результате различных реакций. Фосфорилирование АТФ дает уридин-5'-трифосфат, который при аминировании (действием аммиака и АТФ в бактериях или АТФ и глутамин в животных системах) образует

ингибирование метилирования дезоксиуридилевой кислоты до тимидин-5'-фосфата 5-фторуридином и 5-фтор-2'-дезоксиуридином, несомненно, является результатом предварительного образования аналогов нуклеотидов. Как и в случае бактериальной устойчивости к аналогам пуринов, штаммы *E. coli*, устойчивые по отношению к 5-фторурацилу, теряют способность катализировать пирофосфоролитическое образование нуклеотидов из пиримидиновых оснований (включая урацил) и рибозо-1-пирофосфата-5-фосфата, хотя



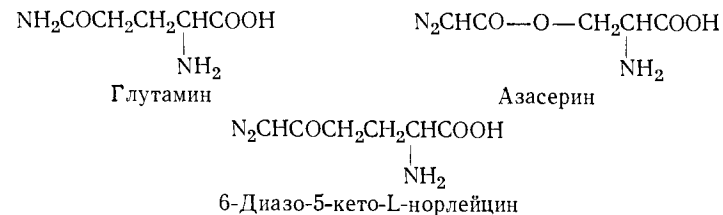
из устойчивых к этому антиметаболиту штаммов могут быть получены активные ферментные препараты. Другой механизм устойчивости, включающий изменение активного центра тимидилатсинтазы таким образом, что 5-фторурациловые нуклеотиды не могут больше ингибировать активности фермента, был выявлен в одном из штаммов асцитной карциномы Эрлиха.

Хотя механизмы биосинтеза, включающие образование дезокси-нуклеотидов, еще не выяснены, ряд исследований, проведенных как *in vivo*, так и *in vitro* с использованием нуклеозидов, меченных и по сахару, и по основанию одновременно, позволяют предположить, что рибозильные производные (как пуриновые, так и пиримидиновые) непосредственно восстанавливаются до 2'-дезоксирибозильных производных без разрыва гликозидной связи. Превращение уридина

и цитидина (или их 5'-фосфатов) в соответствующие дезоксисоединения растворимыми экстрактами из *Salmonella typhimurium* LT-2, по-видимому, происходит при участии дезоксирибозилтрансферазы; однако в других исследованиях с препаратами из эмбриона цыпленка показано, что на уровне нуклеозид-5'-фосфатов происходит прямое восстановление цитидина и гуанозина. Более четкие доказательства были получены для ферментных препаратов из *Escherichia coli*, которые катализируют превращение цитидин-5'-фосфата в дезоксцитидин-5'-фосфат, вероятно, через образование цитидин-5'-пирофосфата и дезоксцитидин-5'-пирофосфата, восстанавливая кофермент II (НАДП-Н₂), действующий как кофактор на стадии восстановления. Уридин-5'-пирофосфат также превращается в 2'-дезоксирибозил-5'-пирофосфат, и вполне вероятно, что механизм восстановления является общим для всех нуклеотидов.

ИНГИБИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ПУРИНОВ И ПИРИМИДИНОВ

Можно ожидать, что механизмы действия аналогов пуринов и пиримидинов (таких, как 8-азагуанин и 5-фторурацил), являющихся канцеростатическими агентами или ингибиторами клеточного метаболизма, различны. Некоторые из них, например свободные основания, ингибируют использование пуринов и пиримидинов, в то время как другие, функционирующие в виде нуклеотидов, тормозят специфическую реакцию синтеза нуклеотидов *de novo*. Еще один путь действия таких соединений состоит в ингибировании процессов полимеризации, ведущих к синтезу нуклеиновых кислот, или процесс включения этих соединений в нуклеиновые кислоты (РНК или ДНК) с последующим нарушением нормальных химических реакций в клетке. Поэтому эффективность действия *in vivo* данного аналога зависит от формы, в которой он находится (свободное основание, нуклеозид или нуклеотид), ферментативных реакций, к которым он чувствителен, и реакций, в которых он выступает как ингибитор.



В качестве ингибиторов синтеза нуклеотидов *de novo* могут функционировать также антиметаболиты других типов. Два таких соединения — азасерин и 6-диазо-5-кето-L-норлейцин — действуют

как антагонисты глутамин и особенно активно инактивируют ферменты, катализирующие превращение формилглицинамидориботида в формилглицинамидинриботид. В этом случае конкурентно ингибируются и другие ферментативные реакции, в которых участвует глутамин, например образование рибозиламин-5'-фосфата и аминирование уридин-5'-фосфата и ксантозин-5'-фосфата.

КОНТРОЛЬ ЗА БИОСИНТЕЗОМ НУКЛЕОТИДОВ

Регулирование сложной цепи химических реакций, называемой клеточным метаболизмом, несомненно, является жизненно важным. В настоящее время известно, что для биосинтеза пуринов существует ряд возможных контрольных механизмов, которые включают подавление синтеза метаболитов самими же метаболитами, родственными с ними веществами или конечными продуктами. Так называемое ингибирование по принципу «обратной связи» может влиять либо на активность, либо на синтез фермента, ответственного за образование метаболита. Так, активность фосфорибозилпирофосфатамидотрансферазы (которая катализирует синтез рибозиламин-5'-фосфата из глутамин и рибозо-1-пирофосфат-5-фосфата) заметно подавляется АМФ, АДФ, АТФ, ГМФ, ГДФ и ИМФ, но не ингибируется большим числом других пуриновых или пиримидиновых производных. В случае некоторых мутантных штаммов бактерий с генетическим блоком, ведущим к накоплению предшественников аминокислот, некоторые пурины могут вызывать аллостерическое торможение, если только генетический блок не препятствует взаимопревращению пуринов. Однако, когда это взаимопревращение затруднено, аденин становится специфическим ингибитором (препятствует накоплению предшественников имидазола) и контроль по принципу «обратной связи» осуществляется на уровне аденина (или аденозина, или АМФ), а не с помощью других пуринов. Превращение гуанозин-5'-фосфата в производные аденина (через восстановительное дезаминирование ГМФ до инозин-5'-фосфата) заметно ингибируется АТФ, что свидетельствует о возможности контроля производными гуанина за синтезом адениновых нуклеотидов. Взаимоотношения между этими «отрицательными» типами контроля за скоростью синтеза и концентрацией нуклеотидов в клетке и положительными моментами взаимосвязи биосинтетических реакций, как, например, потребность АТФ для синтеза ГМФ и ГДФ для синтеза АМФ, представляются исключительно сложными. Как уже упоминалось выше, контроль за синтезом фермента также может быть установлен по принципу «обратной связи»; примером может служить влияние гуанина на образование ИМФ-дегидрогеназы в мутантных штаммах бактерий с подавленным синтезом ксантозин-5'-фосфатамиказы.

Возможно, что дальнейший контроль осуществляется на уровне различных превращений среди нуклеозидов и нуклеотидов. Эти превращения включают дезаминирование цитидина, аденозина и гуанозина и их производных до соответствующих оксисоединений, фосфорилиз нуклеозидов и пирофосфорилиз нуклеотидов, *транс*-N-гликозилирование нуклеозидов (прямой ферментативный перенос дезоксирибозы с одного акцептора на другой), фосфорилирование нуклеозидов и дефосфорилирование нуклеотидов, восстановление рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов. Тот факт, что ферментативное превращение цитидиновых нуклеотидов в дезоксинуклеотиды экстрактами из эмбрионов цыпленка сильно ингибируется дезоксиаденозин-5'-трифосфатом, дезоксигуанозин-5'-трифосфатом и, в меньшей степени, тимидин-5'-трифосфатом, но не дезоксицитидин-5'-трифосфатом, указывает на то, что синтез дезоксирибонуклеиновых кислот, по-видимому, регулируется гомостатическим механизмом. На более высоком метаболическом уровне между нуклеозидполифосфатами и нуклеиновыми кислотами, вероятно, поддерживается равновесие, в то время как участие в большинстве метаболических процессов нуклеотидангидридов (коферментов) повышает уровень организации живых систем еще на один порядок.

ПСЕВДОУРИДИН

О метаболизме и значении 5-рибозилурацила пока еще мало известно. Найдено, что при включении 6-¹⁴C-оротовой кислоты метка распределяется примерно в равной степени между цитидиновой, уридиновой и ψ-уридиновой кислотами, входящими в состав дрожжевой рибонуклеиновой кислоты. Ферментные экстракты из иловых псевдомонад (creek-mud pseudomonad) катализируют превращение ψ-уридина в уридин. Предполагалось, что промежуточным продуктом здесь является 3,5-дирибозилурацил. Это превращение ингибируется тимидином и 5-оксиметилурацилом, но не 4-метил- или 5-бромурацилом. Функция нуклеотида в биологически активных рибонуклеиновых кислотах, возможно, заключается в ацилирующих свойствах N³-ацилурацилов. Важное значение для образования вторичной и третичной структуры нуклеиновой кислоты имеет, по-видимому, способность псевдоуридина к образованию «бифункциональных» водородных связей.

Химические свойства (например, бромирование, фотолиз) урацила указывают на то, что электрофильное замещение при С₅ пиримидинового кольца проходит довольно легко. Чисто спекулятивный механизм * биосинтеза псевдоуридин-5'-фосфата мог бы предполагать участие в нем рибозо-1-пирофосфат-5-фосфата по той же схеме,

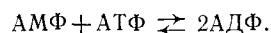
* Этот механизм включает гликозилирование уридина нуклеозидными донорами и последующее расщепление N-гликозидной связи.

которая справедлива для биосинтеза уридин-5'-фосфата, через возможное промежуточное образование 4-окси-4,5-дигидро-5-глицозильного производного (см. химическое образование связей C — C алкилпирофосфатами, стр. 348).

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕОТИДАНГИДРИДОВ [3]

В настоящее время известен ряд путей образования аденозин-5'-трифосфата (в которых синтез преобладает над распадом) окислением углеводов, жиров и аминокислот. Так, при окислении глюкозы АДФ фосфорилируется до АТФ действием таких промежуточных метаболитов, как ангидрид фосфорной и 3-фосфоглицериновой кислоты или 2-фосфоенолипируват (см. схему на стр. 313).

Другие механизмы образования АТФ непосредственно связаны с использованием кислорода цитохромными системами, которые осуществляют перенос электронов или водорода (окислительное фосфорилирование), а также с системами фотосинтеза, в которых необходимая энергия поставляется за счет света (фотофосфорилирование). И в этом случае оказалось, что наиболее существенной стадией синтеза АТФ является фосфорилирование АДФ, а не аденозин-5'-фосфата (АМФ). Однако известна реакция миокиназного типа, в которой эти три нуклеотида связаны между собой таким образом, что АМФ обратимо фосфорилируется АТФ с образованием двух молекул АДФ



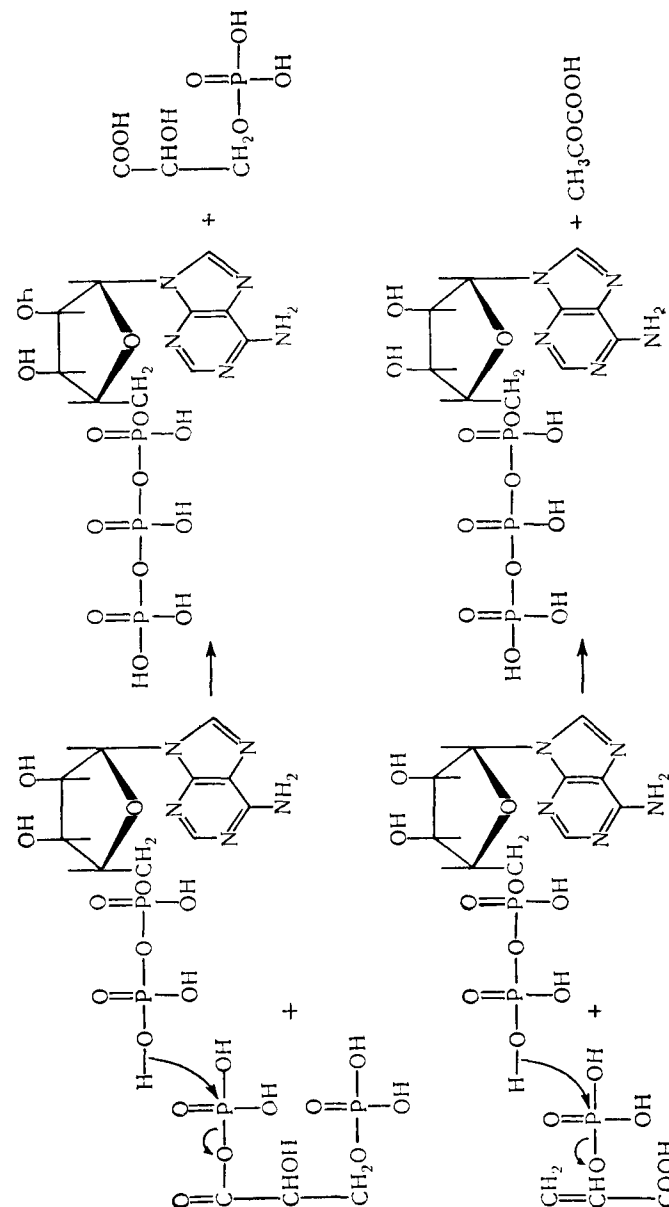
Фосфокреатин и фосфоаргинин (у беспозвоночных) представляют собой вещества другого типа, находящиеся в равновесии с АТФ; их можно отнести к резервным веществам, которые используются в мышцах для быстрого синтеза АТФ фосфорилированием АДФ. Обратимая реакция образования АТФ из полифосфатов и АДФ, катализируемая ферментом из *Escherichia coli*, указывает на то, что полифосфаты в микроорганизмах могут выполнять аналогичную функцию.

Прямо или косвенно АТФ участвует в синтезе большого числа нуклеотидангидридов. По причине, которая будет обсуждена ниже, фосфорилирование нуклеозид-5'-фосфатов (как рибо-, так и дезоксирибо-) до соответствующих пирофосфатов и трифосфатов, по-видимому, протекает ступенчато, т. е. является скорее фосфорилированием, чем пирофосфорилированием.

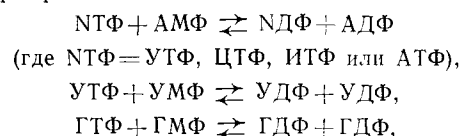


где NMФ = УМФ, ЦМФ, ГМФ, АМФ или дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты.

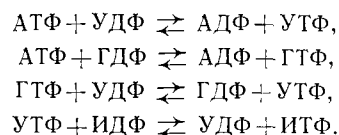
Кроме того, нуклеозидмонофосфаткиназы катализируют трансфосфорилирование между любыми нуклеозид-5'-трифосфатами



и аденозин-5'-фосфатом



в то время как нуклеозид-5'-пирофосфаткиназы катализируют трансфосфорилирование между нуклеозид-5'-трифосфатом и нуклеозид-5'-пирофосфатом.

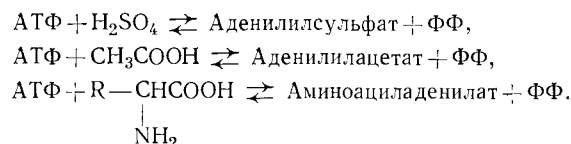


Различные нуклеозид-5'-трифосфаты используются затем в синтезах таких диэтерифицированных пирофосфатных производных, как уридиндифосфатглюкоза, флавинадениндинуклеотид, гуанозиндифосфатманноза, цитидиндифосфатхолин и никотинадениндинуклеотид, путем пирофосфорилиза соответствующих моноэтерифицированных фосфатов



где N = нуклеозид, Z = глюкоза, рибофуранозилникотиновая кислота и т. д.

И, наконец, смешанные ангидриды нуклеотидов (главным образом адениловой кислоты) с кислотами, иными, чем фосфорная, образуются при действии нуклеозид-5'-трифосфатов на соответствующую кислоту.

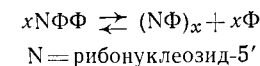


НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ *

При биосинтезе полинуклеотидов, как и при биосинтезе мононуклеотидов, необходимо различать механизмы ферментативных реакций *in vitro*, одни из которых по функциям являются в основном катаболическими, а другие действительно отражают пути биосинтеза *de novo* нуклеиновых кислот *in vivo*. Некоторые ферменты,

которые расщепляют межнуклеотидные связи, могут при определенных условиях действовать как трансфосфорилазы, образуя новые межнуклеотидные связи. Субстраты (например, цитидин-2',3'-циклофосфат, аденозин-3'-бензилфосфат) представляют собой диэтерифицированные фосфаты, и реакции, которые являются скорее переэтерификацией, а не синтезом, практически не имеют отношения к биосинтезу диэфиров фосфатов, присутствующих в нуклеиновых кислотах. В то время как главные функции таких гидролитических ферментов, как рибонуклеаза и фосфодиэстераза селезенки, могут быть чисто деградационными, остается не ясным смысл высокой специфичности действия этих ферментов и роль конечных продуктов (олигонуклеотидов, нуклеозид-3'-фосфатов), особенно с той точки зрения, что метаболически активными, в основном, являются нуклеозид-5'-фосфаты.

В последние годы интенсивно изучаются ферментные системы, которые катализируют синтез полирибонуклеотидов и полидезоксирибонуклеотидов из нуклеозид-5'-полифосфатов. Полирибонуклеотидфосфорилаза, впервые открытая Грюнберг-Манаго и Очоа [4] в *Azotobacter vinelandii*, катализирует обратимый синтез полирибонуклеотидов высокого молекулярного веса (от $\sim 10^5$ до $2 \cdot 10^6$) из рибонуклеозид-5'-пирофосфатов с освобождением ортофосфата



Аналогичные ферменты были получены из различных источников, и оказалось, что эта система широко распространена, особенно в бактериях. При использовании фермента из *Azotobacter* были получены гомополимеры основных рибонуклеотидов и 3-β-D-рибофуранозилтимин-5'-фосфата из соответствующих нуклеозид-5'-пирофосфатов. Кроме того, были получены сополимеры из смеси двух или более рибонуклеозид-5'-пирофосфатов, включая сополимер адениловой, цитидиловой, гуаниловой и уридиловой кислот, сходные во многих отношениях с природными нуклеиновыми кислотами. Приблизительно равномерно меченные нуклеозид-3' (или 2' и 3')-фосфаты, образующиеся при действии диэстеразы селезенки (или щелочи) на сополимеры, содержащие Р³², введенный в составе аденозин-5'-фосфата или уридин-5'-фосфата, говорят о беспорядочном распределении нуклеотидов. В противоположность ранним сообщениям, полимеры из 5-бромуридин-5'-пирофосфата (и из 5-хлор- и 5-иод-аналогов) легко образуются при действии полинуклеотидфосфорилазы из *Azotobacter*. Получены также гомополимеры 2-тиоуридиловой, N¹-метилуридиловой, N¹,5-диметилуридиловой, ксантиловой и N⁶-оксиэтиладениловой кислот. Однако 4,5-дигидроуридин-5'-пирофосфат не активен как субстрат. Выяснение

* См. также статьи Боллума Ф., Смелли Р., Хервица Дж., Огеста Дж. и Грюнберг-Манаго М. в сб. «Нуклеиновые кислоты», Изд. «Мир», 1965. — Прим. ред.

структуры этих линейных полимеров показало, что в этих соединениях, как в природных полирибонуклеотидах, присутствует исключительно 3'—5'-межнуклеотидная связь.

В случае высокоочищенных ферментных препаратов полимеризация происходит лишь после индукционного периода, которого, однако, можно избежать при добавлении небольшого количества полинуклеотидной или олигонуклеотидной затравки (природной, а также синтезированной ферментативным или химическим путем), включая даже динуклеотиды. Полимерные цепи образуются в результате последовательного присоединения моонуклеотидов к незатерифицированной 3'-гидроксильной группе концевой нуклеозидной группы; затравки, содержащие свободную 3'-гидроксильную группу, такие, как ф5'А3'ф5'А или А3'ф5'У, при этом включаются в полинуклеотид. Полимеризация гуанозин-5'-пирофосфата требует обязательного наличия такой затравки. В случае других нуклеотидов эффективной оказалась затравка второго типа, т. е. олигонуклеотиды, содержащие концевой 3'-фосфат, такие, как А3'ф5'А3'ф или А3'ф5'У3'ф. При этом индукционного периода не наблюдается, хотя эти олигонуклеотиды не включаются в конечный полимерный продукт. При действии ферментов в противоположном направлении полинуклеотиды легко фосфорилируются с образованием нуклеозид-5'-пирофосфатов. Динуклеотиды и динуклеозидфосфаты при этом не атакуются, а скорость фосфорилиза зависит как от молекулярной структуры полимеров (т. е. от природы оснований и положения концевых фосфатных групп), так и от их макромолекулярной конформации. Так, ферментативно синтезированные гомополимеры быстро фосфорилируются так же, как и небольшие олигонуклеотиды, содержащие концевой 5'-фосфат, в то время как фосфорилиз олигонуклеотидов (вплоть до пентануклеотидов) с концевой 3'-фосфатной группой не идет. Как и в случае синтеза, реакция фосфорилиза идет ступенчато (начиная от конца, несущего незатерифицированную 3'-гидроксильную группу), причем конечным продуктом являются нуклеозид-5'-пирофосфаты и концевой динуклеотид. Фосфорилиз многотяжных цепей (таких, как смесь полиадениловой и полиуридилловой кислот) и сополимеров в значительной степени затруднен. Относительное увеличение скорости фосфорилиза препаратов рибонуклеиновых кислот при повышении температуры связано с температурным гиперхромным эффектом полинуклеотидов. Поскольку этот тип гиперхромного эффекта может рассматриваться как результат (косвенный) расщепления водородных связей, фосфорилиз, таким образом, зависит в значительной степени от конформации полинуклеотида и, в особенности, от количества водородных связей. Оказалось также, что полинуклеотидфосфорилаза катализирует перенос нуклеозидмонофосфатных единиц от полинуклеотида-донора к другому акцепторному полинуклеотиду. Далее,

катализ обмена фосфатными остатками в нуклеозид-5'-пирофосфате может происходить и в отсутствие истинного образования полимера.

Полинуклеотидфосфорилазы, катализирующие синтез полинуклеотидов из нуклеозид-5'-пирофосфатов, были получены и из других бактерий. Они сходны, в основном, с ферментом из *Azotobacter*, хотя и отличаются от него условием и характером действия.

До сих пор остается не ясным, связаны ли ферментные системы с основным путем синтеза РНК *in vivo*. Если случайное распределение нуклеотидов, найденное у сополимеров, полученных с помощью полинуклеотидфосфорилазы, и не дает повода возразить против такой функции, то вследствие низкого сродства к субстрату необходимы достаточно высокие локальные концентрации нуклеозид-5'-пирофосфатов.

Возможно, что рибонуклеозид-5'-трифосфаты являются истинными промежуточными предшественниками РНК. Особый тип включения нуклеотидов в специфические рибонуклеиновые кислоты состоит в присоединении цитидиловой и адениловой концевых групп в последовательности РНК-Ц3'ф5'Ц3'ф5'А при действии цитидин-5'-трифосфата и аденозин-5'-трифосфата (с освобождением неорганического пирофосфата). Такие общие «ЦЦА»-концевые группировки найдены в низкомолекулярных «растворимых» РНК, которые служат переносчиками аминокислот при биосинтезе белков. Кратковременная обработка диэстеразой змеиного яда освобождает эти концевые группы и нарушает биологическую активность. Последняя может быть восстановлена при инкубации продукта с очищенной ферментной системой и рибонуклеозид-5'-трифосфатами. Фракционированием транспортного РНК-белкового комплекса была получена частично очищенная ферментная система, которая катализирует пирофосфорилиз только трех концевых нуклеотидов в присутствии неорганического пирофосфата. При повторном включении меченых нуклеотидов с последующим щелочным гидролизом (с переносом P^{32} из 5'-положения на 2'- или 3'-гидроксильную группу соседнего нуклеотида) дает веские доказательства того, что четвертым нуклеозидным остатком является аденозин, т. е. для большинства РНК общей концевой группой является последовательность, АфЦфЦфА. Аналогичным исследованием, в котором меченый полимер гидролизовали панкреатической рибонуклеазой (вновь с переносом P^{32}), было показано, что около 65% препарата содержит пиримидин-АЦЦА-концевые группы, а 17% содержат на акцепторном конце последовательность пиримидин-ГЦЦА. При изучении гидролизата были найдены и другие концевые последовательности, например ф3'ГАЦЦА (3,1%), ф3'АГЦЦА (3,6%), ф3'ААЦЦА (1,1%), ф3'УАЦЦА (7,2%) и ф3'АУЦЦА (1,4%), причем всем им должны предшествовать пиримидиновые нуклеотиды. Таким

образом, гетерогенность начинается уже с четвертого нуклеотида от акцепторного конца [5].

Описано несколько других систем, которые катализируют включение концевых рибонуклеотидов в РНК. Они, возможно, и не имеют отношения к специфическому синтезу РНК *de novo*, так как рибонуклеиновые кислоты, вероятно, образуются путем постепенного присоединения нуклеотидов и концевые фрагменты, по-видимому, должны быть более чувствительны к обратимому пирофосфору, чем внутренние нуклеотиды. Однако важным фактором при включении в концевые группы может быть отсутствие подходящего рибонуклеозид-5'-трифосфата. В различных рибонуклеиновых кислотах было идентифицировано около тринадцати различных нуклеозидов; при попытке вызвать ферментативную полимеризацию четырех основных нуклеотидов встретились затруднения, препятствующие образованию полинуклеотида с достаточно высокой длиной цепи. Тем не менее существуют прямые доказательства синтеза полирибонуклеотидов из рибонуклеозид-5'-трифосфатов в животных системах. Например, экстракты из ядер зубной железы теленка после фракционирования дают ферментные препараты, которые катализируют образование полиадениловой кислоты (длиной 25—100 нуклеотидов) из аденозин-5'-трифосфатов. В присутствии затравочной РНК цитидин-5'-трифосфат превращается в полицитидиловую кислоту частично очищенным ферментом (в отличие от фермента, специфичного для АТФ) из того же самого источника. В случае других систем животных (ядра печени крысы) мононуклеотидный остаток цитидин-5'-трифосфата (α - P^{32}) включается во внутренние участки, а не в конец цепи. Включение заметно стимулируется АТФ, ГТФ и УТФ, в то время как рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза заметно понижают включение.

Недавно было описано чувствительное к дезоксирибонуклеазе включение рибонуклеотидов в РНК бесклеточными бактериальными экстрактами (*Escherichia coli*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Lactobacillus arabinosus* и *Azotobacter vinelandii*). Присутствие всех четырех классических рибонуклеозид-5'-трифосфатов (или монофосфатов и трифосфат-регенерирующей системы), так же как дезоксирибонуклеиновой кислоты, обязательно. Добавленная в систему ДНК из различных источников (*E. coli*, Т2-бактериофага или зубной железы теленка) эффективно стимулирует включение. Продукт обладает обычными свойствами рибонуклеиновых кислот. Он гидролизует рибонуклеазой, а щелочной гидролиз после включения меченного P^{32} уридин-5'-фосфата дает смесь нуклеозид-2'(3')-фосфатов, причем все они содержат метку. Дальнейшие доказательства того, что включение может идти не только в концевые группы, получены из опытов по действию диэстеразы змеиного яда на меченый полирибонуклеотид, когда освобождение метки и поглощающих ультрафио-

летовый свет веществ происходит с параллельными скоростями. Наоборот, при использовании неочищенного змеиного яда наблюдалась корреляция между освобождением P^{32} и неорганического фосфата.

Определение соотношения оснований в полученной РНК путем анализа «ближайшего соседа» (меченные P^{32} субстраты) при использовании ДНК-затравки с резко отличающимся нуклеотидным составом показало, что образующаяся РНК комплементарна затравочной ДНК. При использовании олиготимидиловой кислоты в качестве затравки из смеси рибонуклеозид-5'-трифосфатов в реакции участвует лишь аденозин-5'-трифосфат с образованием полиадениловой кислоты. Аналогичным образом при использовании ферментативно синтезированного сополимера тимидиловой и дезоксиадениловой кислот (с прямо противоположной последовательностью оснований) в качестве затравки для РНК-полимеразы из *E. coli* был получен продукт, содержащий лишь адениловую и уридиловую кислоты (даже в присутствии других нуклеотидов). Щелочной гидролиз (сопровождающийся переносом P^{32}) показал, что адениловые и урациловые остатки противостоят друг другу, а отсюда затравка определяет как состав, так и последовательность оснований в продукте. (Для частично очищенной бактериальной РНК-полимеразы затравкой могут служить полирибонуклеотиды; возможно, при этом функционирует не ДНК-зависимая полимеразы, а какой-то другой фермент.)

Еще одним доказательством комплементарной природы РНК, полученной на данной ДНК-затравке, служит образование специфического комплекса при нагревании с последующим охлаждением смеси ДНК-затравки и РНК-продукта. При эквимолекулярных соотношениях два полинуклеотида образуют гибридные комплексы, причем ренатурация ДНК исключается благодаря большей стабильности гибрида. Образование гибрида специфично для ДНК-затравки и не происходит с другими дезоксинуклеиновыми кислотами, даже если они обладают сходным нуклеотидным составом. Следовательно, средний нуклеотидный состав, анализ «ближайшего соседа» и полная комплементарность последовательности — все говорит о доминирующей роли последовательности нуклеотидов в затравочной ДНК в определении природы ферментативно синтезированной РНК. При использовании определенной бактериальной системы (*Micrococcus lysodeikticus*) не было обнаружено, чтобы матрица и продукт образовывали промежуточные соединения, гибриды (в отличие от ДНК-полимеразы). Далее, после ферментативного синтеза РНК не происходит изменений в плотности матрицы и денатурации (разделении нитей) ДНК. Следовательно, либо двухспиральная ДНК действует как матрица, не раскручиваясь, либо механизм заключается в том, что функционируют небольшие одноцепочечные олигонуклеотидные участки, непосредственно прилега-

ющие к месту присоединения рибонуклеотидов, а процесс напоминает «сползание гусеницы» по двойной спирали. Изучение РНК-продукта физическими методами было бы чрезвычайно интересно, так как можно ожидать, что она имеет комплементарную двухцепочечную структуру; современные же данные показывают, что только что образовавшийся продукт состоит из одной цепи, но быстро превращается в двойную спираль.

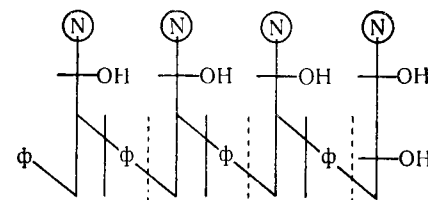
При использовании других бактериальных РНК-полимеразных систем оказалось, что продукт состоит частично из ДНК — РНК-комплексов, которые диссоциируют при нагревании до 100°. В растительных экстрактах (изолированный хроматин из зародышей гороха) РНК остается связанной в ДНК — РНК-белковые комплексы и освобождается в форме, доступной действию рибонуклеазы, только после предварительной обработки дезоксирибонуклеазой или после нагревания до 60° в течение короткого времени; оказалось, что в этом комплексе отношение РНК к ДНК равно 1 : 2. Так как температура диссоциации комплекса ниже температуры денатурации ДНК, пришли к заключению, что освобождение РНК (и ДНК) из комплекса происходит вследствие денатурации белка. Однако вероятно также, что трехцепочечный полинуклеотидный комплекс должен быть менее устойчивым, чем двухцепочечный комплекс.

В течение ряда лет нуклеиновые кислоты подразделяли на две группы — рибонуклеиновые и дезоксирибонуклеиновые кислоты. Открытие ферментной системы (из *Escherichia coli*), которая катализирует включение мононуклеотидных остатков цитидин-5'-трифосфата и других рибонуклеозид-5'-трифосфатов (в присутствии всех четырех основных дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов) в ДНК-подобный полимер, указывает на то, что эту классификацию, по-видимому, следует пересмотреть. Продукт, по крайней мере частично, чувствителен к действию щелочи, рибонуклеазы или дезоксирибонуклеазы. Ферментативный гидролиз дает динуклеотиды, содержащие рибонуклеотид и дезоксирибонуклеотид. Обычными методами с использованием R^{32} и специфического ферментативного гидролиза было показано, что превращения рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды при этом не происходит и что связь образуется между 5'-положением рибонуклеотида и 3'-гидроксильной группой дезоксирибонуклеотида. Другой фермент из ядер зубной железы телят (но отличающийся от РНК- и ДНК-полимеразы) катализирует включение рибонуклеотидов в концевое положение ДНК*.

В этой работе очень широко применялись методы с использованием меченых атомов. Они связаны с переносом R^{32} от 5'-нуклеоти-

* Однако эти опыты проводились с изолированными ферментными системами. Природные полимеры, содержащие как дезокси-, так и рибонуклеотиды в одной цепи, до сих пор не обнаружены.—Прим. перев.

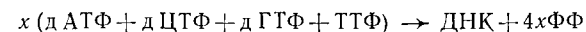
дов к 3'-гидроксильной группе акцепторных нуклеотидов, что показано действием щелочи (или диэстеразы селезенки) на межнуклеотидную связь; наоборот, расщепление до нуклеозид-5'-фосфатов с помощью диэстеразы змеинного яда является надежным контролем, так как в этом случае вся активность должна оставаться в исходном нуклеотиде. При включении в концевые группы используются нуклеозидтрифосфаты, меченные (например, C^{14}) в нуклеозидном остатке; специфический гидролиз полимерного продукта дает концевые нуклеозиды, сравнение активности которых с активностью нуклеозид-2'(3')-фосфатов позволяет измерить включение в концевые положения.



----- расщепление щелочью или диэстеразой селезенки

— расщепление диэстеразой змеинного яда

Ферментативный синтез полидезоксинуклеотидов из дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (сопровождающийся выделением неорганического пирофосфата) был впервые осуществлен Корнбергом и его сотрудниками [6] с помощью фермента из *Escherichia coli*. Эта система, которая, вероятно, очень похожа на биосинтетические системы *in vivo*, требует присутствия всех четырех основных нуклеозид-5'-трифосфатов и дезоксирибонуклеиновой кислоты в качестве затравки, а также ионов магния. По ряду химических (включая соотношение оснований), биохимических и физических свойств продукт (молекулярный вес $\sim 5 \cdot 10^6$) неотличим от затравочной ДНК, даже если состав смеси субстратов сильно отличается от состава затравки. До сих пор удавалось получить ДНК-продукта примерно в 20 раз больше, чем было взято ДНК-затравки (из различных источников). Сродство к субстрату чрезвычайно велико.



Отсутствие одного из нуклеозид-5'-трифосфатов (или какого-нибудь другого компонента) сильно снижает синтез полимера; в присутствии лишь одного дезоксинуклеозид-5'-трифосфата (меченого R^{32}) идет слабое включение, в основном за счет реакции меченого нуклеотида с концевой нуклеозидной группой ДНК-затравки. Как показано последовательным освобождением дезоксирибону-

клеотидов из продукта при действии диэстеразы змеиного яда, в этом случае происходит лишь незначительное образование новых радиоактивных концевых групп. Некоторые аналоги природных дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов могут также служить субстратами и включаться в полимерный продукт. Так, в различной степени дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты урацила и 5-бром урацила специфически замещают тимин, в то время как цитозин может быть замещен 5-метилцитозином или 5-бромцитозином, а гуанин — гипоксантином (но не ксантином). Специфичность замещения находится в соответствии с правилом образования пар оснований в двойной спирали дезоксирибонуклеиновых кислот, предложенной Уотсоном и Криком. Существенно, что киназы, осуществляющие фосфорилирование дезоксиуридин-5'-фосфата до трифосфата, как оказалось, отсутствуют в *Escherichia coli*, хотя 5-бром урацил превращается в дезоксинуклеозид-5'-трифосфат через нуклеозид-5'-монофосфат. В обычном смысле реакция полимеризации практически необратима, что находится в соответствии с метаболической стабильностью ДНК. Однако в присутствии большого избытка неорганического пирофосфата можно заметить слабый пирофосфоролиз, особенно вновь присоединившихся концевых нуклеотидов.

В настоящее время из ряда животных тканей и опухолей также получены ферментные препараты, катализирующие синтез ДНК из дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов.

Репликация последовательности при ферментативных (*E. coli*) синтезах ДНК была изучена с использованием меченных P^{32} субстратов и ДНК-затравки, изолированной из вирусных, бактериальных и животных источников. Гидролиз полученных полидезоксинуклеотидов диэстеразой до дезоксинуклеозид-3'-фосфатов с последующим определением распределения радиоактивности показал, что в каждом случае присутствуют все 16 возможных динуклеотидных (ближайший сосед) последовательностей, что это распределение является уникальным, не случайным, репродуцируемым и не определяется нуклеотидным составом затравочной ДНК и что эта ферментативная репликация включает образование пар аденин — тимин и гуанин — цитозин в двух цепях с противоположной последовательностью оснований (т. е. с противоположной «полярностью»), как в модели Уотсона и Крика.

При изучении условий действия полимеразы из зобной железы теленка было показано, что, прежде чем ДНК начинает действовать как затравка, водородные связи между полинуклеотидными цепями разрываются и что в действительности роль затравки могут выполнять только однотяжные цепи или (что, по-видимому, более точно) однотяжные участки. Так, неактивная ДНК-затравка легко превращается в активную затравку при тепловой денатурации. Аналогичным образом одноцепочечная ДНК из бактериофага ϕ X-174

активна, так же как и олигонуклеотиды из гидролизата ДНК, полученного при действии панкреатической дезоксирибонуклеазы.

В отсутствие заметного количества затравки, но после 2—5-часового индукционного периода, полимеразы из *E. coli* катализируют синтез *de novo* двухцепочечного сополимера дезоксиаденин-5'-фосфата и тимидин-5'-фосфата с точно противоположной последовательностью. Оба дезоксинуклеозид-5'-трифосфата использовались на 80%, но при прибавлении дезоксигуанин-5'-трифосфата или дезоксицитидин-5'-трифосфата они также включались в очень незначительной степени. Физические свойства продуктов (молекулярный вес $\sim 5 \cdot 10^6$) были сходны со свойствами двухцепочечной ДНК, а тимидин-5'-трифосфат в них мог быть замещен 5-бром-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфатом. Соплимер тимидиловой и дезоксиадениловой кислот действует как затравка при синтезе такого же полимера без индукционного периода. Результаты этих исследований указывают на автокаталитический характер процесса, причем после начальной стадии *de novo*, в течение которой синтезируются несколько первых молекул полимера, происходит быстрая редупликация. Связывание матрицы и продукта было показано при использовании А — Т-сополимера как затравки для образования аналогичного сополимера 5-бром-2'-дезоксиуридиловой и дезоксиадениловой кислот. Из реакционной смеси можно было выделить гибридный полимер, содержащий 5-бром урацил только в одной гибридной цепи. Продукт второго типа был получен из дезоксигуанин-5'- и дезоксицитидин-5'-трифосфатов; он состоит из двух гомополимеров, связанных водородными связями в двухцепочечную структуру. Как отмечалось выше, в присутствии подходящей затравки и четырех основных дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов полимеразы из *E. coli* дают продукт, весьма сходный с дезоксирибонуклеиновой кислотой, с соотношением между аденином и тимином, а также гуанином и цитозином, равным единице.

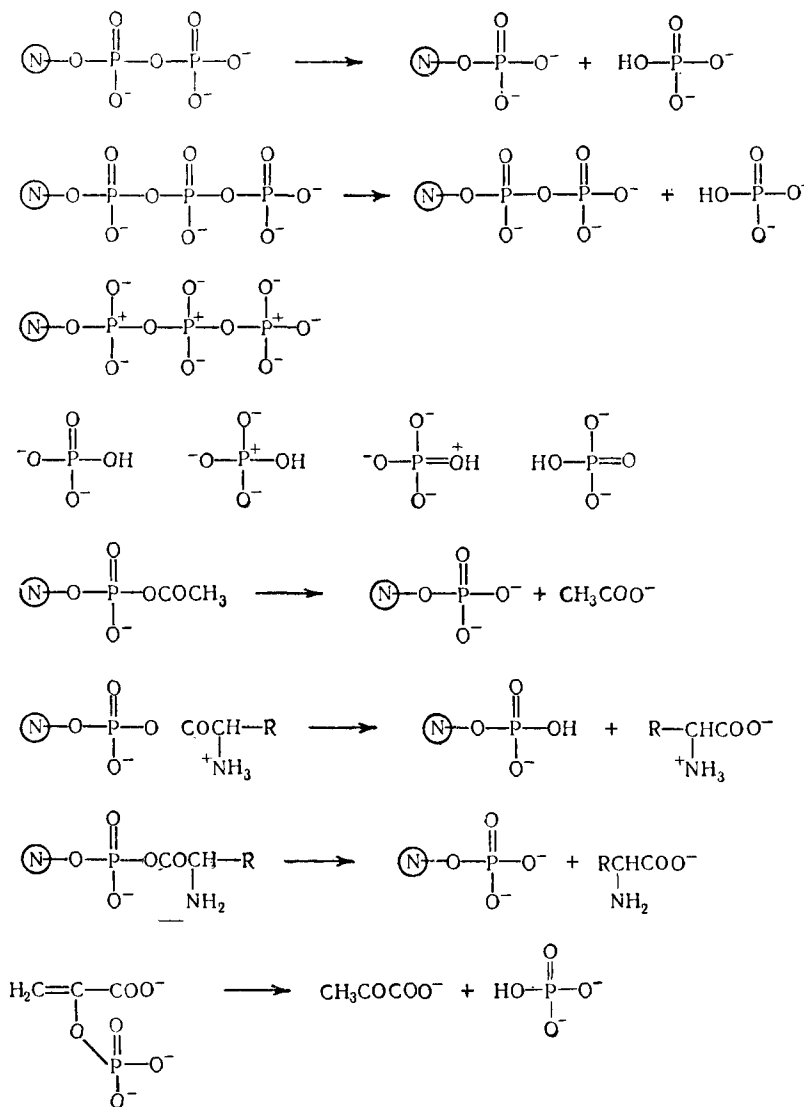
ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕАКЦИЙ НУКЛЕОТИДАНГИДРИДОВ

Концепция «макроэргических» фосфатных связей, предложенная Липманом [7] еще в 1941 г., имеет несомненно большое значение для биохимии при термодинамическом описании различных ферментативных реакций с участием органических фосфатов. Однако с химической точки зрения использование этого термина, который отражает свободную энергию гидролиза, иногда может ввести в заблуждение [8]. И вновь, опять же с чисто химической точки зрения, в дальнейшем, по-видимому, необходимо проводить четкое разграничение между простыми эфирами фосфорной кислоты и ангидридами органических фосфатов (с фосфорной и другими кислотами), фосфоамидами и фосфоенолами. Общие характеристики

и различия в понятиях, вкладываемых в термины «эфир» и «ангидрид» кислоты, рассмотрены в большинстве учебников по органической химии и здесь обсуждаться не будут. Однако следует также заметить, что разделение производных фосфорной кислоты на две группы на основании свободных энергий гидролиза довольно условно, так как простой компиляцией таблиц «низкоэнергетических» и «высокоэнергетических» фосфатов может быть получен полный спектр соединений, в котором соседние фосфаты резко не отличаются друг от друга.

Свободная энергия гидролиза производных фосфатов может быть связана с рядом характерных свойств, включающих относительную резонансную стабилизацию самих веществ и продуктов их гидролиза, таутомерную стабилизацию соединений, эффекты электростатического отталкивания и ионизации [9—11]. Значение резонансной стабилизации особенно велико, когда продукты гидролиза обладают относительно высокой резонансной стабилизацией. Так, неорганический фосфат и аденозин-5'-фосфат обладают намного большим числом возможных резонансных форм, чем число допустимых резонансных форм на один фосфатный остаток в аденозин-5'-пирофосфате; далее, в аденозин-5'-трифосфате число резонансных форм на один остаток фосфата еще меньше вследствие «противоположного» резонансного эффекта (т. е. несовместимости форм с зарядами одного и того же знака на соседних атомах). Этот эффект приложим к ангидридам нуклеотидов с кислотами, иными, чем фосфорная кислота, такими, как карбоновые кислоты, сульфо- и аминокислоты, а также к таким фосфоамидам, как фосфокреатин, фосфоаргинин и аденозин-5'-фосфоамид. Число резонансных форм изменяется с изменением числа ионизированных групп, входящих в соединение (например, H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} имеют соответственно 23, 25, 29 и 35 резонансных структур).

В случае некоторых фосфоенолов, например фосфоенолпируватов, кроме «противоположного резонансного» эффекта, существенный вклад в свободную энергию гидролиза вносится таутомерными переходами от енольных форм к более устойчивым кето-формам. В случае таких соединений, как нуклеозид-5'-трифосфаты и в меньшей степени фосфоенолпируваты и нуклеозид-5'-пирофосфаты, определенное значение имеет электростатический эффект, возникающий в результате отталкивания одинаково заряженных групп. Эффекты ионизации и сольватации вызывают ионизацию свободных диссоциирующих групп в продуктах гидролиза. Высокая свободная энергия гидролиза в каждом упомянутом выше случае в большей или меньшей степени зависит от pH; так, изменение pH от 6 до 8 (перекрывающее область вторичной диссоциации фосфорной кислоты) оказывает довольно сильное влияние на свободную энергию гидролиза АТФ до АДФ ($\sim 1,4$ ккал при 38°). Ионы металлов также



оказывают сравнительно большое влияние на свободную энергию гидролиза благодаря образованию комплексов. Так, при гидролизе АТФ до АДФ и фосфорной кислоты при pH 7,5 и 37° в отсутствие ионов магния (или других двухвалентных катионов) свободная энергия гидролиза равна приблизительно —9,3 ккал, в то время

как при гидролизе магниевой соли АТФ она составляет $-7,0$ ккал (при рН 7 и 37°).

Хотя из термодинамических расчетов и можно определить положение равновесия для данной реакции (некоторые выводы, вытекающие из расчета таких равновесных состояний, едва ли приложимы к биологическим условиям *in vivo*), эти исследования не отвечают на вопрос, почему некоторые фосфаты являются более активными фосфорилирующими агентами. В этом отношении, по-видимому, не бесполезно констатировать, что АТФ сам по себе не является активным фосфорилирующим агентом; однако при помощи определенных катализаторов энергия активации может быть значительно снижена, так что реакции фосфорилирования гидроксильных и других групп протекают легко.

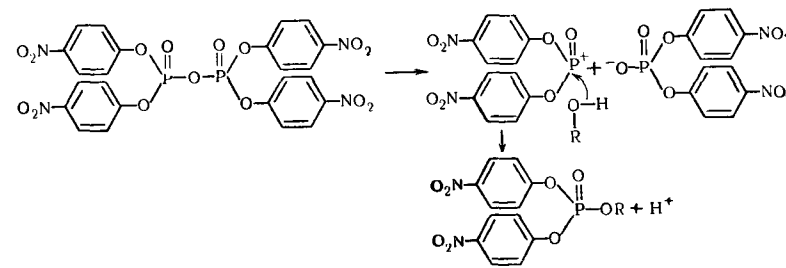
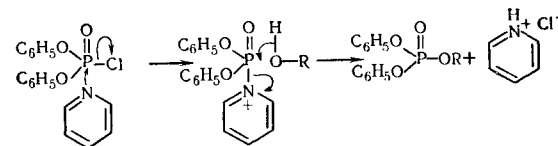
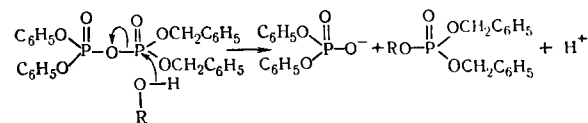
Сведения о возможном механизме, управляющем биохимическими реакциями фосфорилирования, за последние десять лет значительно расширились, и поэтому здесь уместно кратко рассмотреть некоторые химические свойства сложных эфиров и ангидридов фосфатов [12—14].

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Полностью этерифицированные пирофосфаты представляют собой эффективные химические фосфорилирующие агенты в присутствии третичных оснований, причем в значительной степени их активность зависит от природы алкильных или арильных групп. Так, тетрабензилпирофосфат — относительно слабый фосфорилирующий агент по отношению к таким слабым нуклеофилам, как спирты, в то время как тетрафенилпирофосфат является более сильным агентом, а тетра-*n*-нитрофенилпирофосфат настолько активен, что потребность в основном катализе вообще отпадает. В общем случае активность полностью этерифицированного пирофосфата как фосфорилирующего агента непосредственно связана с величиной кислотности его диалкил(или арил)фосфатных компонентов, т. е. чем выше положительный заряд на атомах фосфора, тем активнее ангидрид как фосфорилирующий агент. Для несимметрично замещенных пирофосфатов (таких, как P^1 -дифенил- P^2 -дибензилпирофосфат) фосфорилирование протекает таким образом, что продукт обычно образуется из более слабой из двух кислот, образующих ангидрид.

Так как оба атома фосфора в молекуле ангидрида несут некоторый положительный заряд (причем в более кислом компоненте этот заряд выше), любой подходящий нуклеофильный реагент может, по-видимому, атаковать оба атома. А так как группа $P=O$ в фосфорных ангидридах практически не обладает аддитивными свойствами, такая атака будет успешной только в том случае, если происходит одновременный «уход» группы с противоположной стороны

атакуемого атома фосфора*. Уход более стабильного аниона (т. е. остатка более сильной кислоты) благоприятствует, таким образом, атакам, кульминационным моментом которых является присоединение нуклеофильного реагента к менее положительному атому фосфора, а фосфорилирование будет происходить преимущественно за счет более слабого из двух фосфатов, образующих ангидрид. В случае более сильных фосфорилирующих агентов этого типа, по-видимому, происходит ионизация (или эффективная ионизация, происходящая благодаря обычно присутствующему третичному основанию), но для смешанных ангидридов получаются абсолютно те же результаты, так как фосфорилий-катион образуется из более слабого кислотного остатка.



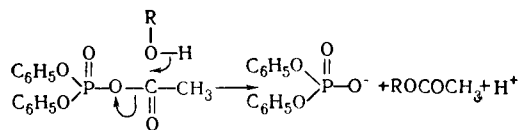
* Необходимо помнить, что формула $\text{HO}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$, как и иногда более

предпочтительная формула $\text{HO}-\text{P}^+(\text{OH})_3$, представляет собой просто символические приближения к истинному изображению структуры. Если принимать это во внимание, то использование понятия «группа $P=O$ » имеет определенный смысл; более правильно подразумевать при этом поляризованную $P-O$ группу. Атом фосфора (в описываемых соединениях) тетраэдрический и, подобно углероду, он подвергается нуклеофильному замещению с «инверсией». Известны оптически активные фосфорные соединения (в отношении атома Р).

Реагенты этого типа (включая хлорфосфаты) использовались исключительно для фосфорилирования спиртов (в таких реакциях, как синтез нуклеотидов из нуклеозидов); они также очень активны при фосфорилировании аминов.

Аналогичным образом смешанные ангидриды дизфиров фосфорных кислот и сульфокислот действуют как фосфорилирующие агенты, когда сульфокислота является более сильной кислотой, чем фосфорная; в противоположном случае происходит сульфирование. Однако в этих случаях очень существенным может оказаться влияние среды. Так, в диоксане смешанный ангидрид метансульфокислоты (или этансульфокислоты) и уридин-2',3'-циклофосфата в присутствии три-*n*-бутиламина (пространственно затрудненного основания) является *сульфирующим агентом* и в результате реакции образуется 5'-О-метансульфо(или этансульфо)уридин-2',3'-циклофосфат. В пиридине то же вещество ведет себя как *фосфорилирующий агент*, а продуктами реакции являются метансульфокислота и полиуридилловые кислоты с различной длиной цепи. По-видимому, пиридин действует «каталитически» через образование фосфопиридиниевого производного. (На реакцию также могут оказывать влияние такие факторы, как ионизация и сольватация, см. стр. 331.) Аналогичный эффект, возможно, хорошо заметен при образовании смеси полиадениловых кислот (оканчивающихся на 5'-бензилфосфитную группу) и аденозин-2',3'-циклофосфат-5'-бензилфосфита из смешанного ангидрида аденозин-2',3'-циклофосфата и бензилфосфористой кислоты в диоксановом растворе в присутствии пиридина (см. также стр. 513).

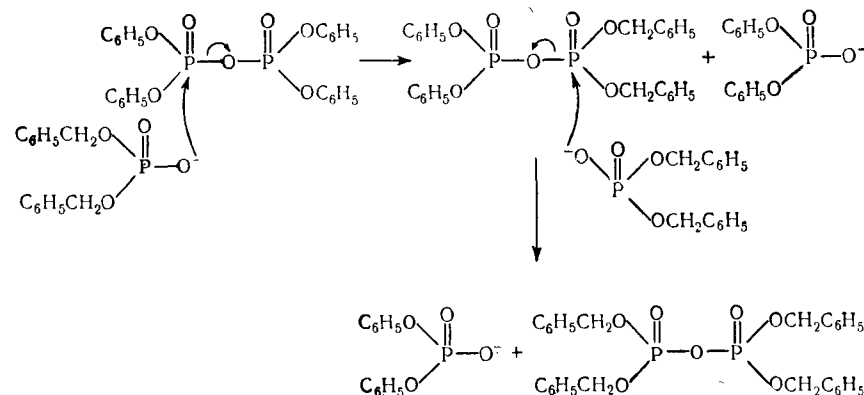
Смешанные ангидриды диэфиров фосфорной кислоты и карбоновых кислот (или аминокислот) действуют как ацилирующие агенты, а не как фосфорилирующие агенты, так как диэфиры фосфорной кислоты почти всегда более сильные кислоты, чем карбоновые кислоты. Так, ацетилдифенилфосфат представляет собой ацилирующий агент, причем эта функция усиливается благодаря аддитивным свойствам группы $C=O$; при гидролизе при всех значениях pH связь $C-O$ расщепляется быстрее, чем связь $P-O$.



ОБМЕН АНИОНОВ

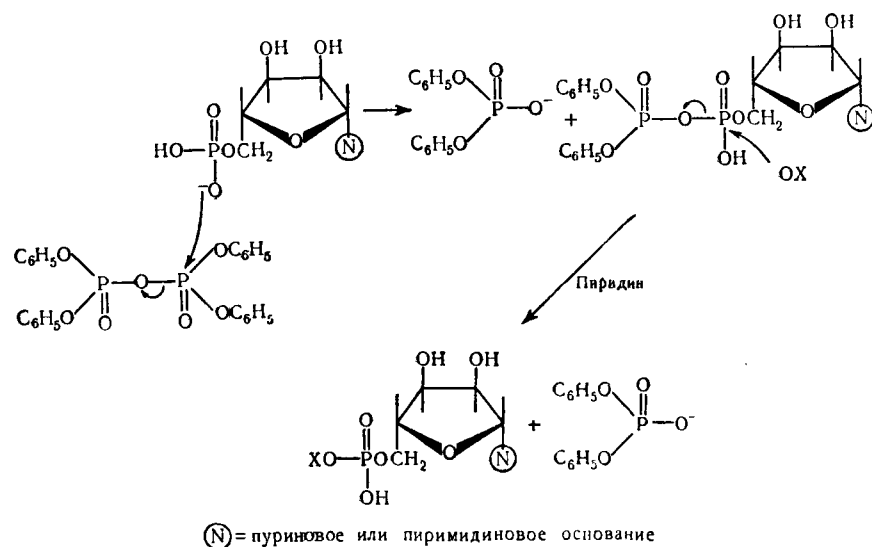
Кроме фосфорилирования относительно слабых нуклеофильных реагентов, таких, как спирты и амины, полностью этерифицированные пиродифосфаты легко фосфорилируют кислоты, т. е. они участ-

вуют в обмене анионов. И в этом случае имеет место общий эффект ухода из ангидрида более стабильного аниона (т. е. аниона более сильной кислоты), который определяет ход или направление обменной реакции. Так, тетрафенилпирофосфат реагирует с дибензилфосфорной кислотой (более слабой кислотой) с образованием Р¹-дифенил-Р²-дибензилпирофосфата, который затем претерпевает дальнейшее нуклеофильное замещение анионом дибензилфосфата с образованием тетрабензилпирофосфата.

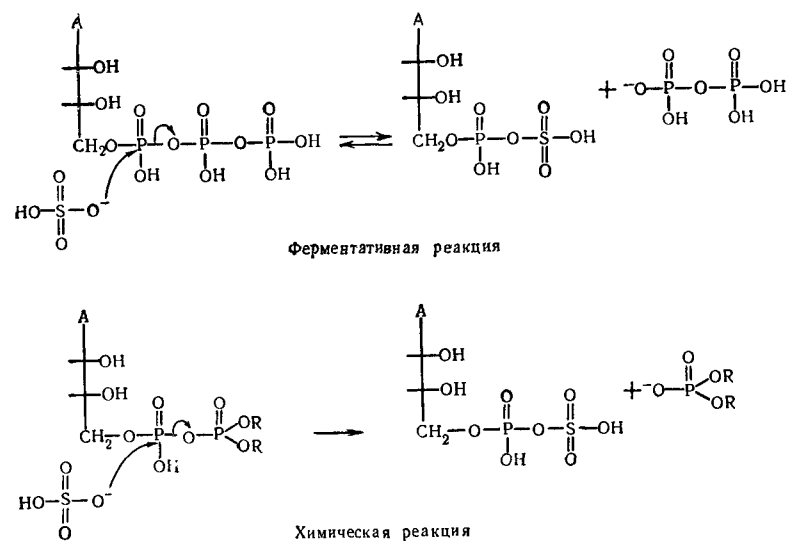


В то время как контроль за образованием промежуточных соединений при реакциях полностью этерифицированных смешанных ангидридов затруднен вследствие высокой скорости, с которой происходит нуклеофильное замещение остатка сильной кислоты более слабой кислотой, контроль за образованием промежуточных соединений для ангидридов, содержащих свободные диссоциирующие кислотные группы, вполне осуществим. Так, обработка уридин-5'-фосфата тетрафенилпирофосфатом в диоксановом растворе (в присутствии три-*n*-бутиламина) дает с количественным выходом P¹-уридин-5'-P²-дифенилпирофосфат. При этих условиях ионная природа триэфира затрудняет атаку нуклеофильными реагентами (понижение электрофильного характера атома фосфора и электростатическое экранирование) настолько, что дальнейшего обмена с освобождением более стабильного аниона и образованием P¹,P²-ди(уридин-5')-пирофосфата не происходит.

Если такие промежуточные производные, как R¹-нуклеозид-5'-R²-дифенилпирофосфат, относительно устойчивы в диоксановом растворе в присутствии пространственно затрудненного третичного основания, то в *пиридиниевом* растворе они легко вступают в реакции дальнейшего обмена путем атаки соответствующего нуклеофильного реагента с замещением более сильного кислотного остатка (остатка



дифенилфосфорной кислоты) в ангидриде. Можно ожидать, что нуклеофильный реагент должен давать менее стабильный анион, чем замещаемый кислотный остаток, и, как и в случае полностью этерифицированных ангидридов, атакуется преимущественно, если не исключительно, атом фосфора в остатке более слабой кислоты

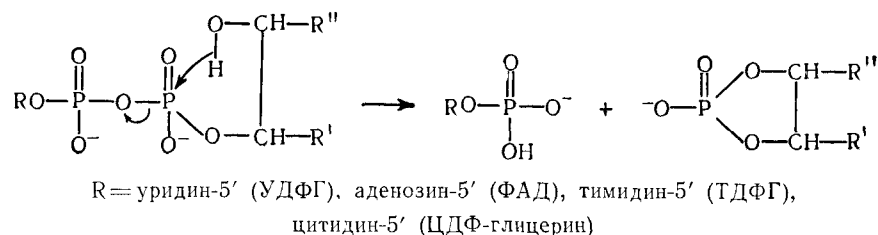


в промежуточно образующемся ангидриде. В качестве нуклеофильных реагентов подходят карбоновые кислоты, аминокислоты, пептиды, сульфаты, фосфаты, фосфиты, пирофосфаты, трифосфаты, рибофлавин-5'-фосфат, фосфаты сахаров и пантотенин-4'-фосфат. Для этих реакций применима формальная аналогия с ферментативными синтезами смешанных ангидридов нуклеотидов из нуклеозид-5'-трифосфатов и моноэфиров фосфорной кислоты (или других кислот), т. е. дифенилфосфатная группа химически эквивалентна пирофосфатному остатку, который используется в биологических системах.

Хотя термин «более сильная кислота» и может быть использован для приближенного определения направления химической реакции, понятие «замещение более стабильного аниона при существующих локальных условиях» должно более точно отражать сущность процесса. Конечно, это связано, как и в случае биохимических реакций, с рядом свойств, включая относительную резонансную стабилизацию промежуточных и конечных продуктов реакций, эффекты электростатического отталкивания, эффекты ионизации и сольватации. (Замена растворителя должна оказывать заметное влияние на последние три фактора.) Для некоторых химических фосфорилирующих агентов, родственных фосфоенолпировиноградной кислоте (таких, как диэтил- α -этокси- β , β -дихлорвинилфосфат и имидоилфосфатные промежуточные соединения, образующиеся из карбодиимидов), важную роль играет таутомерная стабилизация продуктов реакции.

Было показано, что триэтерифицированные пирофосфаты менее реакционноспособны, чем тетраэфиры пирофосфорной кислоты. Диэтерифицированные (P^1 , P^2) пирофосфаты еще менее реакционноспособны. Это уменьшение реакционной способности вновь можно отнести за счет наличия отрицательно заряженного атома кислорода, который не только значительно понижает электрофильный характер атома фосфора, но также в определенной степени электростатически экранирует атаку нуклеофильного реагента. Тем не менее даже P^1 , P^2 -диэфиры пирофосфорных кислот в соответствующих условиях могут действовать как фосфорилирующие агенты не только в реакциях анионного обмена, но и на спиртовые гидроксильные группы, при условии, что они расположены соответствующим образом по отношению к пирофосфатной связи. Так, щелочной гидролиз уридиндифосфатглюкозы и флавинаденидинуклеотида дает глюкозо-1,2-циклофосфат и рибофлавин-4',5'-циклофосфат соответственно. Близость гидроксильной группы в подходящей конфигурации понижает устойчивость пирофосфатной связи, так как в аналогичных условиях P^1 , P^2 -ди(аденозин-5')-пирофосфат вполне устойчив. Другой пример химического фосфорилирования P^1 , P^2 -диэтерифицированного пирофосфата (благодаря тому, что гидро-

кислая группа находится в подходящей конфигурации) должен быть найден при расщеплении кофермента А, при котором образуется пантотеин-2',4'-циклофосфат. Непосредственное отношение к этому типу реакций имеет интрафосфорилирование, которое происходит при обработке АТФ водным раствором гидроксида бария.

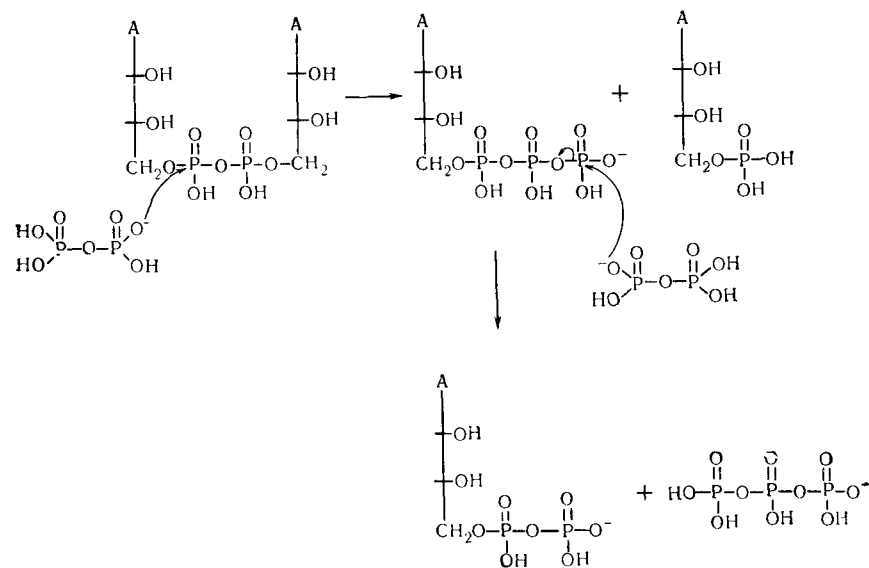


Связывание иона бария фосфатными остатками, несомненно, играет важную роль в механизмах реакций, которые ведут к образованию аденозин-3',5'-циклофосфата и аденозин-2'(или 3'),5'-дифосфата наряду с большим числом других продуктов. Равным образом важным моментом этих механизмов является специфическое расположение гидроксильных групп сахаров.

Так как диэтерифицированные (P^1 , P^2) пирофосфаты при определенных условиях могут фосфорилировать гидроксильные группы со слабыми нуклеофильными свойствами, не удивительно, что они обменивают свои анионы на подходящие нуклеофильные анионы в реакциях, которые аналогичны биологическому пирофосфорилизу таких нуклеотидангидридов, как УДФГ и ФАД. И снова эти реакции химически осуществимы только в том случае, если направление реакции таково, что остаток более сильной кислоты замещается остатком более слабой кислоты. Так, обработка P^1, P^2 -ди(аденозин-5')-пирофосфата неорганическим пирофосфатом в пиридине дает смесь аденозин-5'-трифосфата, аденозин-5'-пирофосфата и аденозин-5'-фосфата. Действительно, здесь происходит замещение вторичного гидроксила ($pK = 6,0$) аденозин-5'-фосфата третичным гидроксидом ($pK = 6,54$) неорганического пирофосфата. По-видимому, аденозин-5'-пирофосфат возникает в результате дальнейшей атаки неорганическим пирофосфатом γ -атома фосфора первоначально образующегося аденозин-5'-трифосфата, так как прямое отщепление аденозина от диаденозинпирофосфата весьма маловероятно и в действительности не наблюдается.

Отмечено понижение реакционной способности в ряду: тетраэфиры, триэфиры и диэфиры пирофосфорной кислоты. Дальнейшее понижение активности наблюдается у моноэтерифицированных пирофосфатов. Тем не менее можно наблюдать неферментативное фосфорилирование такими соединениями, так как кислые кальциевые

(или натриевые) соли нуклеозид-5'-пирофосфатов в твердом состоянии медленно превращаются в смеси, содержащие нуклеозид-5'-трифосфат, причем этот процесс эквивалентен ферментативным реакциям миокиназного типа. Однако следует заметить, что симметрично диэтерифицированные пирофосфаты, такие, как P^1, P^2 -ди(аденозин-5')-пирофосфат, значительно более устойчивы по отношению



к кислотному и щелочному гидролизу, чем моноэтерифицированные пирофосфаты, например, аденозин-5'-пирофосфат. Неравенство положительных зарядов на двух атомах фосфора имеет такое же значение, как и абсолютная величина. Это, в частности, демонстрируется исключительной нестабильностью P^1, P^1 -диэтерифицированных пирофосфатов; в качестве промежуточных соединений, возможно образуются метафосфаты. Наконец, неорганическая пирофосфорная кислота является очень слабым фосфорилирующим агентом и активна только при повышенных температурах (200—300°).

АДЕНИЛИЛСУЛЬФАТ

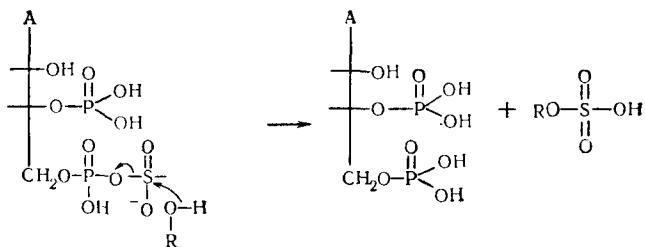
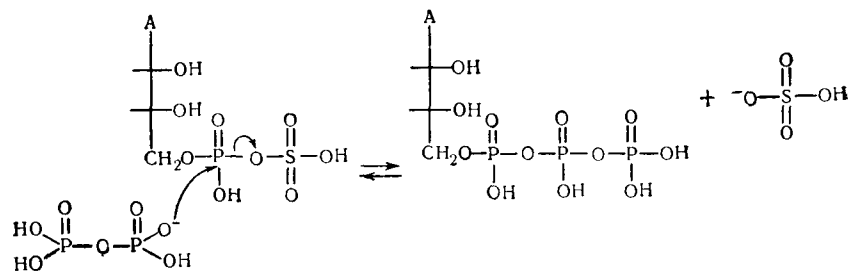
Ангидриды нуклеотидов с неорганическими кислотами, иными, чем фосфорная кислота, могут быть рассмотрены аналогичным образом. Серная кислота — более сильная кислота, чем фосфорная кислота или моноалкилфосфаты, и, следовательно, аденилилсульфаты представляют собой смешанные ангидриды относительно сла-

бой (аденозин-5'-фосфат) и сильной кислот. Поэтому ангидрид значительно менее устойчив, чем аденозин-5'-пирофосфат. Его химический гидролиз, по-видимому, происходит за счет нуклеофильной



атаки атома фосфора, а не серы, т. е. при гидролизе H_2O^{18} меченый атом кислорода окажется в образующемся аденозин-5'-фосфате, но не в сульфате. Однако могут быть рассмотрены и другие механизмы.

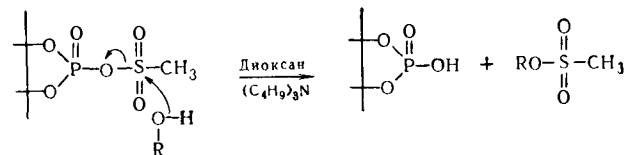
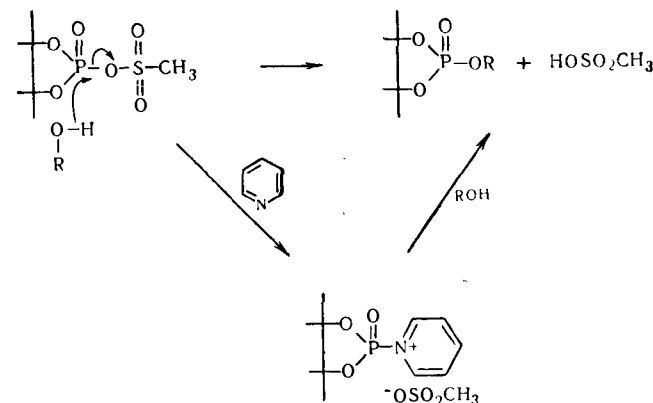
Ферментативный пирофосфоролиз (или фосфоролиз) аденилсульфата может служить биохимическим примером нуклеофильной атаки атома фосфора в этом соединении.



Ферментативная реакция

Аденилсульфат-3'-фосфат — «активный сульфат» — функционирует как биохимический сульфорирующий агент, а не как донор нуклеотидного остатка*. Имеется два типа реакций, находящихся под контролем ферментов, сходным с химическим контролем за тече-

* Описано неферментативное сульфирование в присутствии древесного угля.

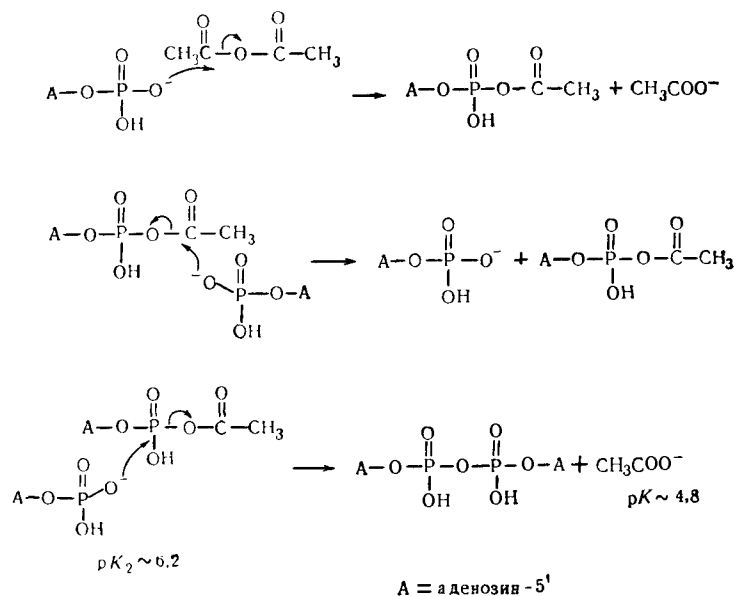


нием реакции метансульфонилангидридов нуклеозид-2'3'-циклофосфатов.

СМЕШАННЫЕ АНГИДРИДЫ НУКЛЕОТИДОВ И КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Многие из приведенных выше рассуждений применены для реакций нуклеотидангидридов карбоновых кислот и аминокислот, хотя в этом случае необходимо принимать во внимание отчетливо выраженный аддитивный характер группы $\text{C}=\text{O}$. Действительно, это означает, что ангидрид действует как ацилирующий агент не только тогда, когда остаток фосфата является более сильной кислотой, чем карбоновая кислота (т. е. происходит замещение более стабильного аниона), но и тогда, когда карбоновая кислота более сильная, чем освобождающийся остаток фосфорной кислоты [15]. В последнем случае аддитивные свойства атакуемой группы облегчают нуклеофильную атаку атома с более высоким положительным зарядом. Следовательно, даже по отношению к таким слабым нуклеофильным реагентам, как спиртовые гидроксильные группы (или гидроксилы воды), аденилацетат действует как ацилирующий, а не фосфорилирующий агент. Однако в безводных условиях подходящие нуклеофильные реагенты могут действовать таким обра-

зом, что произойдет замещение аниона более сильной кислоты (т. е. остатка карбоновой кислоты). Так как аддитивные свойства группы $C=O$ оказывают активирующее действие, анионный обмен при

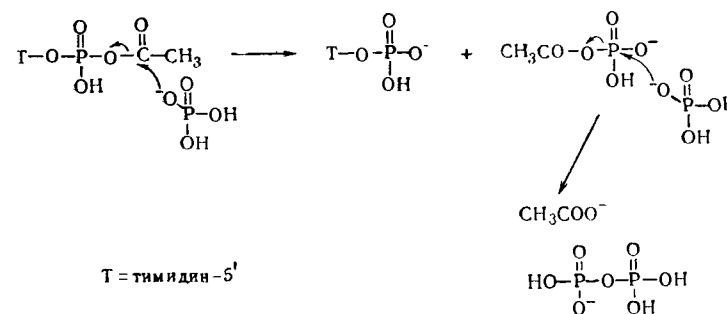


нуклеофильной атаке нуклеотидного остатка происходит значительно медленнее, чем обменная реакция при нуклеофильной атаке карбоксильного компонента ангидрида. Поэтому действие аденозин-5'-фосфата на аденилилацетат приводит к образованию P^1, P^2 -ди(аденозин-5')-пирофосфата, причем вследствие более быстрого обмена ацетатных остатков вновь образуется только аденилилацетат. (Следует отметить, что ангидрид, образованный уксусной кислотой и аденозин-5'-фенилфосфатом, может действовать только как ацилирующий агент, т. е. нуклеофильная атака направлена преимущественно на карбонильную группу, а не на атом фосфора практически при всех возможных условиях [15].)

Образующийся в конечном счете P^1, P^2 -ди(аденозин-5')-пирофосфат вполне устойчив по отношению к нуклеофильной атаке ацетат-анионами, так как аддитивные свойства в этом случае отсутствуют; если бы эта атака проходила успешно, то это бы означало замещение менее стабильной диссоциирующей группы более устойчивым анионом.

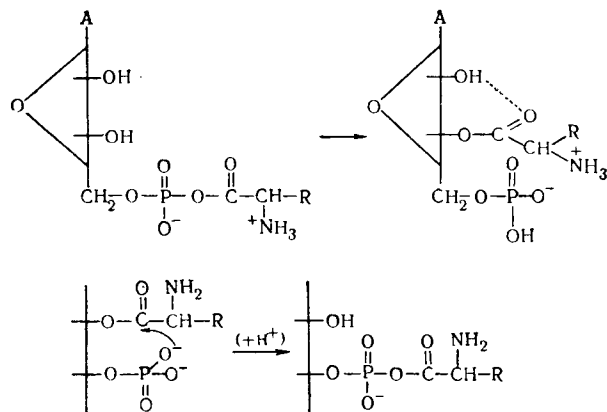
Действие фосфорной кислоты на тимидилилацетат в пиридине приводит к образованию тимидин-5'-фосфата (а не пирофосфата)

и ацетилфосфата также вследствие аддитивных свойств группы $C=O$. Затем происходит дальнейшая атака неорганического фосфата (более сильного нуклеофильного реагента, чем тимидин-5'-фосфат) как на карбоксильный, так и на фосфатный остаток ацетилфосфата, но только во втором случае образуется новый продукт — неорганический пирофосфат. Кроме того, будучи более устойчивым по отношению к атаке ацетат-ионом (так как менее стабильный анион не должен замещаться), пирофосфат (в пиридиновом растворе), по-видимому, является более сильным нуклеофильным агентом, чем неорганический фосфат, и может далее реагировать с ацетилфосфатом. Поэтому в качестве конечных продуктов при действии неорганического фосфата на тимидилилацетат в безводном пиридине образуются тимидин-5'-фосфат, ацетат, пирофосфат и более высокополимерные полифосфаты.



Ангидриды нуклеотидов и аминокислот ведут себя аналогично. Присутствие α -аминогруппы увеличивает положительный заряд на карбонильной группе (т. е. происходит увеличение кислотности вследствие электростатических эффектов), и ангидриды аминокислот и нуклеотидов значительно менее устойчивы, чем соответствующие ангидриды с карбоновыми кислотами, если только аминогруппа не защищена. Это увеличение реакционной способности отчетливо видно также у 2'(3')-аминоацильных производных рибонуклеотидов по сравнению с их 2'(3')-ацилпроизводными, но даже последние значительно менее устойчивы, чем простые алкиловые эфиры, и такие, как 3'- или 5'-эфиры дезоксирибонуклеозидов, у которых отсутствует соседняя гидроксильная группа. Одно из возможных объяснений этого факта заключается в образовании водородных связей между соседней *цис*-гидроксильной группой и карбонилем, что облегчает нуклеофильную атаку этого атома углерода. Инфракрасные спектры 3',5'-ди-О-ацетиладенозина и 2',3'-ди-О-ацетиладенозина показывают, что такие водородные связи имеются лишь в первом соединении [16]. Однако обширное исследование реакционной

способности ряда модельных эфиров аминокислот (например, эфиров 3-окситетрагидрофурана, а также *цис*- и *транс*-диолов) и эфиров различных нуклеозидов показало, что определенное значение могут иметь и другие факторы [17—19]. Оценка кинетических данных, полученных при определении скоростей расщепления эфиров гидроксиламином и омыления при pH 9,8, показала, что на реакционную способность эфирной связи сильно влияет структура кислоты, атом кислорода, находящийся в кольце углевода, и соседняя гидроксильная группа. Индукционный и стерический эффекты, а также образование водородных связей, вполне возможно, играют важную роль в образовании нового состояния связи, которую несколько произвольно называют макроэргической связью. Заметное влияние также может оказывать соседняя фосфатная группа [31], по-видимому, вследствие нуклеофильной атаки анионом фосфата карбонильной группы эфира с образованием переходного аминокцил-фосфатного ангидрида. (При гидролизе этот ангидрид может и не



давать циклического фосфата.) Наличие фосфатной группы, даже полностью этерифицированной и даже в 5'-положении, также увеличивает «кислотность» 2'-гидроксильной группы (по отношению к реакции с диазометаном) в рибонуклеотидах. таких, например, как уридин-5'-фосфат [16, 32] и аденозин-3',5'-циклофосфат [16].

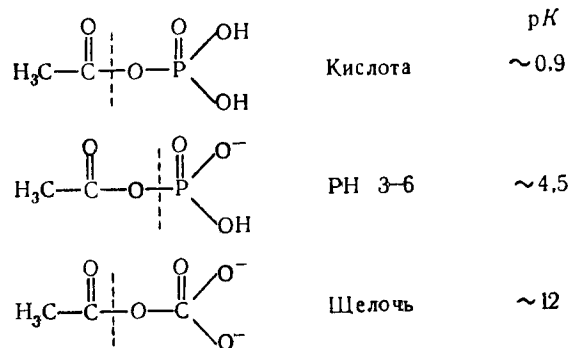
Аденилилтриптофан при pH от 6,0 до 8,5 ведет себя как ацилирующий агент, спонтанно разрушаясь с образованием аминокислотных эфиров (образованных вторичными гидроксильными группами сахара), а также политриптофана. Однако в безводных условиях, как и в случае ацетиладенилатов, может происходить нуклеофильная атака на атом фосфора в аминокциладенилатах. Так, карбобензоксиглициладенилат (в виде три-*n*-бутиламмониевой соли) отно-

сительно устойчив в диоксановом растворе, но в пиридиновом растворе превращается в диаденозин-5'-пирофосфат [20].

Как и в случае пирофосфатных производных, стереохимические факторы могут играть важную роль в реакционной способности карбоксиангидридов нуклеотидов. Это было показано сравнением смешанных ангидридов, полученных действием этилхлорформиата на уридин-5'- и уридин-3'-фосфаты. Если первое соединение относительно устойчиво, то второе существует только как промежуточное соединение, превращаясь в уридин-2',3'-циклофосфат даже в водном растворе. Специфическое расположение (и конфигурация) соседней 2'-гидроксильной группы в этилкарбоксиангидриде уридин-3'-фосфата не только ведет к увеличению его реакционной способности (по сравнению с аналогичным ангидридом уридин-5'-фосфата в присутствии воды), но и является также причиной того, что этот ангидрид действует как фосфорилирующий агент, а нуклеофильная атака направлена исключительно на атом фосфора, а не на карбонильную группу.

Поведение ангидридов свободной фосфорной кислоты (неэтерифицированных фосфатов), таких, как ацетилфосфат, карбамилфосфат или аминокцилфосфаты, зависит от наличия ионизированных групп в молекуле и от таких внешних факторов, как присутствие в среде ионов двухвалентных металлов. Если аддитивный характер группы $C=O$ является менее существенным, чем нуклеофильное замещение более сильного аниона, то эти соединения будут действовать как фосфорилирующие, а не как ацилирующие агенты. Кроме образования полипептидов, смешанные ангидриды аминокислот и фосфорной кислоты могут также в водном растворе фосфорилировать аденозин-5'-фосфат с образованием аденозин-5'-пирофосфата. Аналогичным образом действие уксусного ангидрида на фосфат натрия (или калия) приводит к количественному образованию триметафосфата, а обработка фосфорной кислоты хлористым ацетилом и уксусным ангидридом дает ацетилполифосфорные кислоты [21]. В каждом случае промежуточно образующиеся ацетилфосфаты действуют как фосфорилирующие агенты. Однако обычно фосфорилирование протекает значительно медленнее, чем ацилирование (ср. скорости гидролиза ацетилфосфатов, когда разрыв связи $C-O$ катализируется кислотой или основанием, со спонтанным расщеплением связи $P-O$ при значениях pH от 3 до 6). Можно отметить, что фосфорный ангидрид 3-фосфоглицериновой кислоты действует исключительно как биохимический фосфорилирующий агент, а не как ацилирующий агент, т. е. при этом освобождается более стабильный ион карбоновой кислоты (pK приблизительно 4,5), а не трехосновная фосфорная кислота, не полностью диссоциирующая при физиологических значениях pH ($pK \approx 12$). Выше упоминалось, что различие в силе (электрофильном характере) кислот, обра-

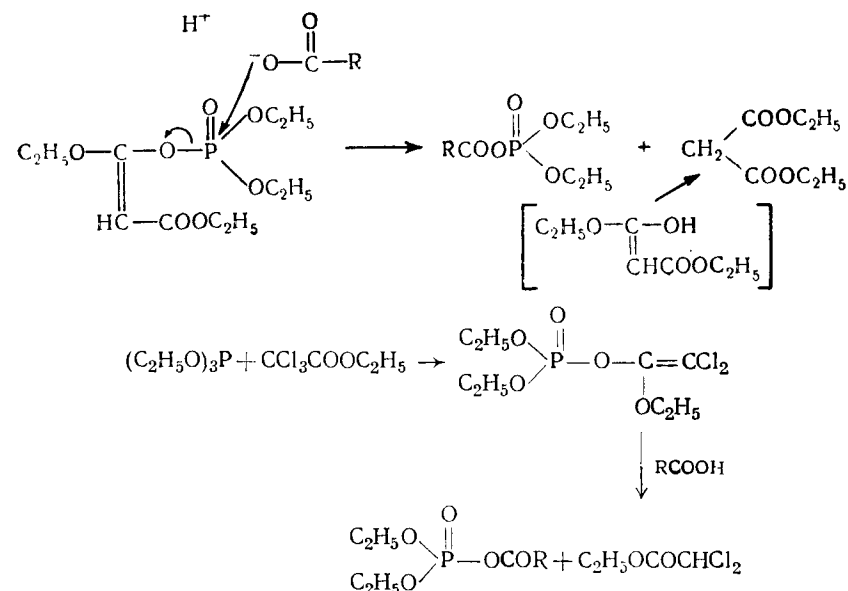
зующих ангидрид, является важным фактором для реакционной способности несимметричных диэтерифицированных пирофосфатов. Это справедливо и для ангидридов фосфорных и карбоновых кислот. Ацетилфосфаты (значение pK приблизительно 4,5 и 12 соответственно) более реакционноспособны как фосфорилирующие агенты, чем ацилнуклеотиды или ацетилфенилфосфаты (соответствующие значения pK 4,5 и 6,5). В первом случае, по-видимому, образуются промежуточные мономерные метафосфаты (разрыв по связи $P-O$ катализируется пиридином, что указывает на образование активного четвертичного пиридиниевого фосфоамида). Во втором случае, вероятно, происходит прямая нуклеофильная атака на атом фосфора, которая протекает более медленно; однако образования мономерного метафосфата как стадии, лимитирующей скорость реакции, полностью исключить нельзя. Что же касается атаки на карбонильную группу, то второй заместитель на фосфатном остатке облегчает перенос ацила; фенилбензоилфосфат представляет собой хороший бензоилирующий агент, а диацетилфосфат более реакционноспособен, чем моноацетилфосфат [15]. Еще более высокую реакционную способность можно ожидать у ацетилдифенилфосфата.



ДРУГИЕ ФОСФОРИЛИРУЮЩИЕ АГЕНТЫ

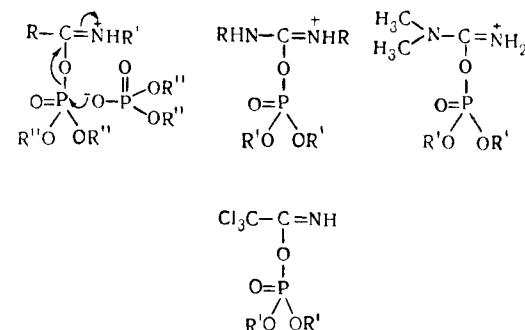
Енолфосфаты, которые содержат группировки, вызывающие сильное смещение электронов от связи Р — О (т. е. увеличивают электрофильный характер фосфора), являются химическими фосфорилирующими агентами и формально сходны с фосфоенолпируватом по своей биохимической активности. В качестве примеров таких енолфосфатов приведем диэтил- α -этокси- β -карбоксиэтилвинилфосфат и диэтил- α -этокси- β,β -дихлорвинилфосфат.

Другие енолфосфаты, не обладающие высокой реакционной способностью непосредственно в реакциях фосфорилирования, могут



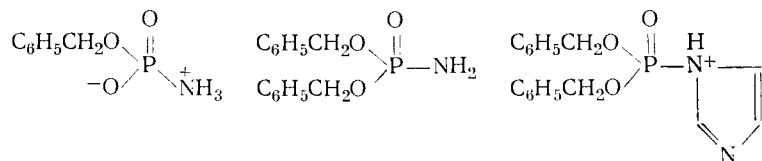
проявлять это свойство в присутствии окислителей, т. е. при внешнем оттягивании электронов. К таким соединениям относятся хинолмоно- и хинолдифосфаты; в присутствии брома (или иода) или солей четырехвалентного церия эти эфиры могут фосфорилировать в водном растворе неорганический фосфат до пиродифосфата. Аналогичное окислительное фосфорилирование наблюдается для эфиров тиофосфорной кислоты в присутствии иода, причем реакция инициируется окислением атома серы.

Имидоилфосфаты и родственные соединения представляют собой азотистые аналоги енолфосфатов. В протонированной форме они легко реагируют с анионами с образованием ангидридов и значительно



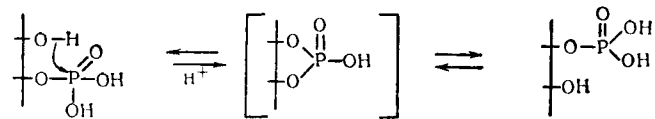
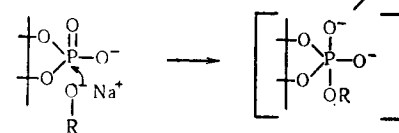
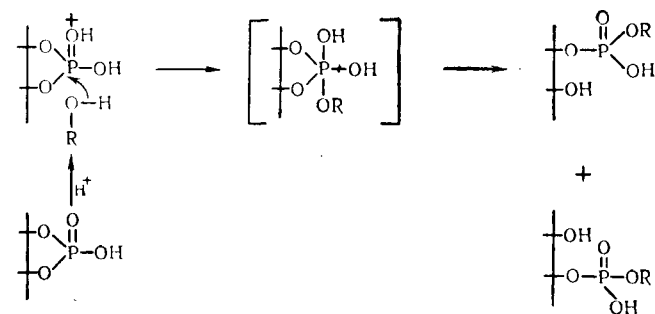
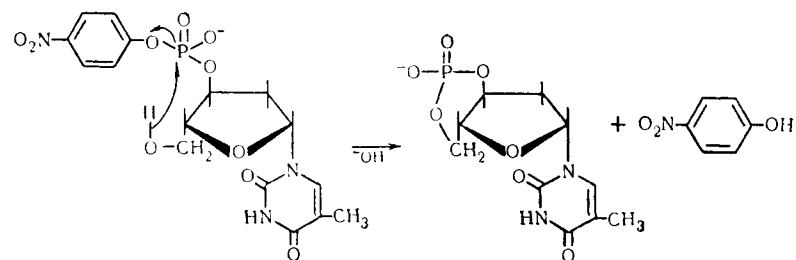
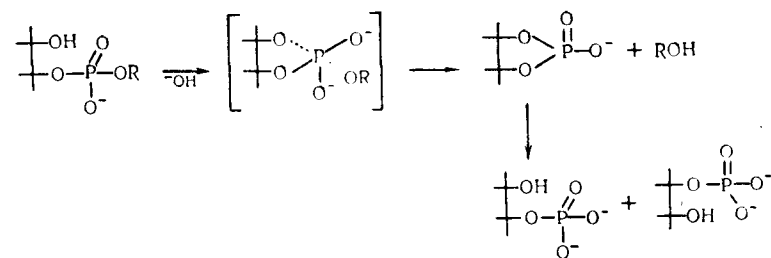
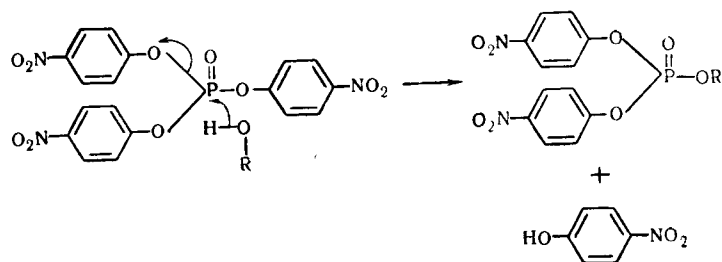
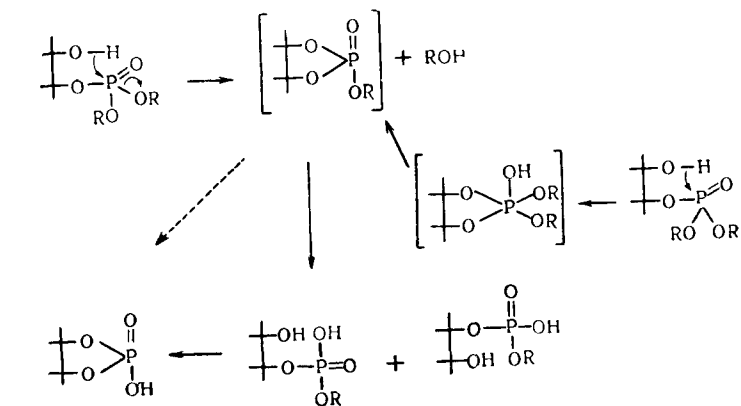
менее легко с такими слабыми нуклеофильными реагентами, как спирты, образуя сложные эфиры.

Фосфоамиды представляют собой активные фосфорилирующие агенты, причем их структура обуславливает протонирование атома азота, а не кислорода. Хотя диэтерифицированные имидазолилфосфаты и обладают весьма высокой реакционной способностью в отношении фосфорилирования спиртов, более простые фосфоамиды, такие, как бензилфосфоамид, фосфорилируют только анионы, а дибензилфосфоамид и в этих реакциях довольно инертен.



ТРАНСФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Влияние подходящим образом расположенной гидроксильной группы в соответствующей конфигурации (и конформации) на реак-



ционную способность P^1, P^2 -диэтерифицированных пирофосфатов уже обсуждалось в связи с внутримолекулярным фосфорилированием. Подобный эффект отчетливо заметен у три-, ди- и моноэфиров фосфорной кислоты и это обуславливает внутримолекулярное трансфосфорилирование (см. схему на стр. 342 и 343). Во время как тимидин-5'-дибензилфосфат относительно устойчив при нейтральных значениях pH, уридин-3'-дибензил(или диметил)фосфат неустойчив при любых значениях pH, распадаясь до смеси моноэфиров уридин-2'- и уридин-3'-фосфатов со следами уридин-2',3'-циклофосфата. Межмолекулярное трансфосфорилирование может быть достигнуто для триэтерифицированных фосфатов, содержащих сильные электрооттягивающие группы. Например, при действии метилового спирта на три-*n*-нитрофенилфосфат образуются ди-*n*-нитрофенилфосфат и *n*-нитрофенол.

Предполагают, что щелочной гидролиз диэфиров фосфорной кислоты, имеющих соседнюю *цис*-гидроксильную группу, протекает через пятивалентное промежуточное переходное состояние (на основании опытов с O^{18}) и, по-видимому, аналогичные промежуточные соединения участвуют в образовании тимидин-3',5'-циклофосфата из тимидин-3'-*n*-нитрофенилфосфата и в переносе (т. е. трансфосфорилировании) бензилфосфата при частичном кислотном гидролизе цитидин-3'-бензилфосфата. При межмолекулярной переэтерификации рибонуклеозид-2',3'-циклофосфатов первичными спиртами, катализируемой кислотами или основаниями, легко образуются нуклеозид-2'(или 3')-алкилфосфаты; в первом случае протонирование фосфата увеличивает электрофильный характер атома фосфора, а во втором случае образование алкокси-аниона усиливает нуклеофильный характер спирта.

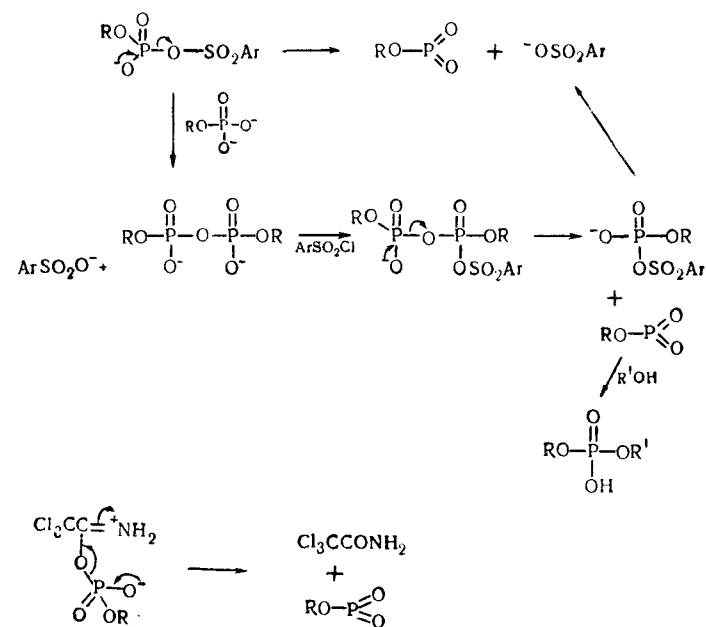
Наконец, катализируемая кислотой переэтерификация моноэфиров фосфорной кислоты легко протекает для 2'(или 3')-фосфатов рибонуклеозидов. Легкость этой реакции, которая вообще не идет в щелочном растворе, является результатом протонирования фосфатной группы, что способствует нуклеофильной атаке подходящим образом расположенной 3'(или 2')-гидроксильной группой. По-видимому, кроме увеличения электрофильного характера атома фосфора, важное значение имеет происходящее при этом исчезновение электростатического экранирования при подавлении ионизации *.

МОНОМЕРНЫЙ МЕТАФОСФАТ [12]

Ряд химических реакций смешанных ангидридов фосфорных кислот (или эквивалентных имидоилпроизводных), содержащих сво-

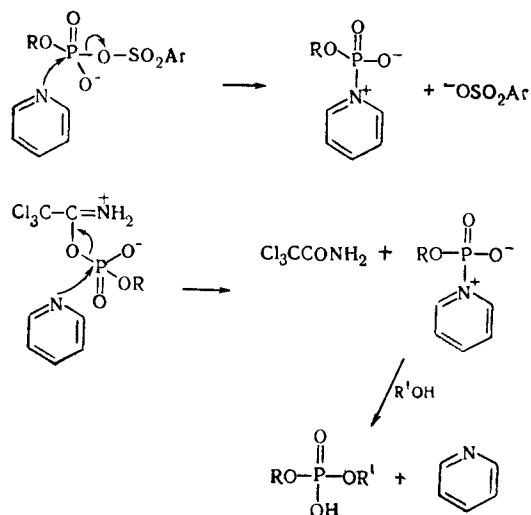
* Очевидно, что протонирование фосфатной группы — более эффективно, чем ионизация спиртовой гидроксильной группы (и всех гидроксильных групп фосфатного остатка).

бодные фосфатные группы, по-видимому, протекает через образование мономерного метафосфатного промежуточного производного. Например, спирты могут быть проэтерифицированы моноэфирами фосфорной кислоты с использованием хлорангидрида очень сильной кислоты в присутствии пиридина. Промежуточно образующийся смешанный ангидрид (или продукт взаимодействия хлорангидрида кислоты с первоначально образующимся P^1, P^2 -диалкилпирофосфатом) расщепляется, возможно, до мономерного алкилметафосфата и аниона сильной кислоты. Аналогичные рассуждения справедливы и при фосфорилировании спиртов (включая синтез полинуклеотидов) действием дициклогексилкарбодиимида на моноэфиры фосфорной кислоты. Промежуточный мономерный метафосфат, по-видимому,



образуется также при использовании в этих реакциях трихлорацетонитрила, имидофосфатное производное которого содержит сильную электроноакцепторную группу.

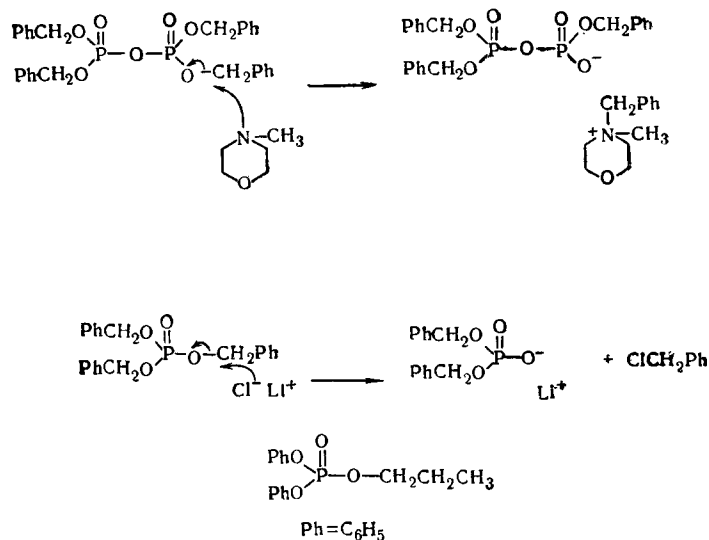
Так как в этих реакциях в качестве растворителя обычно используется пиридин, аналогичные механизмы приводят к промежуточному образованию активных фосфоамидов. Фактически такие промежуточные соединения действительно эквивалентны мономерному метафосфату и могут рассматриваться как «комплексы основание —



метафосфат», которые в любом случае могли бы образоваться из мономерного метафосфата.

ХИМИЧЕСКОЕ ОБРАЗОВАНИЕ СВЯЗЕЙ С — О, С — N И С — С

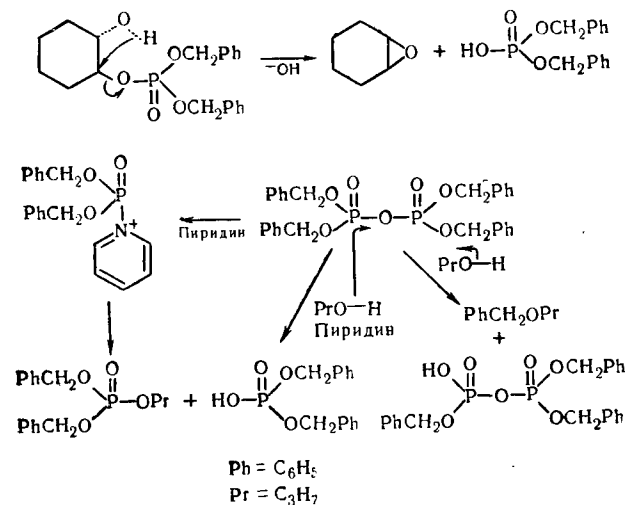
Алкилирующие свойства эфиров фосфорной кислоты отчетливо проявляются в ряде химических реакций, которые ведут к образованию связей С — О, С — N и С — С. Действие N-метилморфолина



на трибензилфосфат (или на тетрабензилпирофосфат) дает бензил-N-метилморфолиниевую соль; был использован также и аналогичный метод дебензилирования путем анионного расщепления. Как и следовало ожидать, природа этерифицирующих групп оказывает существенное влияние; три-*n*-пропилфосфат устойчив по отношению к дезалкилированию при действии солей или оснований, но *n*-пропидифенилфосфат при этом легко дезалкилируется. (Дифенилфосфат — более сильная кислота, чем дипропилфосфат.)

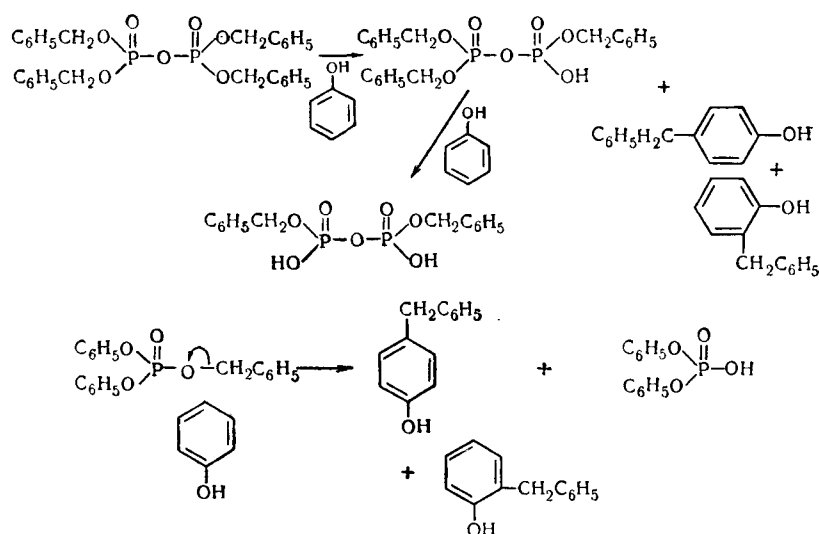
При нагревании растворов 2',3'-О-изопропилиденгуанозин-5'-ди-*n*-нитрофенилфосфата происходит алкилирование атома азота в гуаниновом остатке. В достаточно жестких условиях и при соответствующем расположении атома кислорода алкилирование может происходить и в отсутствие полной этерификации. Так, при действии полифосфорной кислоты на уридин (или цитидин) образуется, возможно, через промежуточное 2'-полифосфопроизводное, О²,2'-циклоуридин(или цитидин)-5'-фосфат. При сольволизе дибензил-*транс*-2-оксициклогексилфосфата гидроксил-ионами или *трет*-бутилатом калия наблюдалось внутримолекулярное О-алкилирование; значительную долю среди продуктов реакции составляла окись циклогексана (и дибензилфосфат) [22].

Сольволиз тетрабензилпирофосфата *n*-пропиловым спиртом в присутствии пространственно затрудненных аминов (такие основания действуют не каталитически, а просто препятствуют автокаталитическому ходу сольволиза, нейтрализуя образующуюся



кислоту), дает в результате межмолекулярного О-алкилирования главным образом бензилпропиловый эфир и трибензилпирофосфат. Такие основания, как пиридин или 2,6-лутидин, катализируют сольволиз связи Р — О, а не разрыв С — О-связи, и пирофосфат действует как фосфорилирующий агент, образуя *n*-пропилдибензилфосфат [23].

Наконец, образование связей С — С при помощи эфиров фосфорной кислоты можно продемонстрировать на примере реакций, в которых дебензилирование полностью этерифицированных бензилфосфатов или бензилпирофосфатов под действием фенола приводит к образованию *o*- и *n*-бензилфенолов [24].



ВЫВОДЫ [13]

Из результатов чисто химического изучения реакций эфиров фосфорной кислоты и нуклеотидангидридов можно сделать ряд выводов, которые, по-видимому, имеют биохимическое значение.

1. Обычно нуклеофильная атака атома фосфора в пирофосфате осуществляется только в том случае, если одновременно с противоположной стороны от атакуемого атома «уходит» другой заместитель. Уход более стабильного аниона (при определенных локальных значениях pH и концентрации катионов) означает в действительности, что в фосфорилировании участвует более слабая из двух кислот, образующих ангидрид.

2. Аддитивные свойства карбонильной группы в карбоксиангидридах определяют не только легкость протекания реакции, но и ее направление.

3. Смысл основного катализа (образование пиридиниевых производных) также заключается в направлении хода реакции и может быть эквивалентен роли имидазольных остатков в некоторых ферментах.

4. Возможное влияние растворителя: диэлектрические свойства растворителя могут влиять на распределение электронов в ангидриде и, совершенно очевидно, будут влиять на ионные свойства реагентов и продуктов реакции. Аналогичные эффекты могут иметь место в связи с изменением диэлектрической проницаемости вблизи поверхности белков.

5. Подавление ионизации увеличивает активность вследствие увеличения положительного заряда на атоме фосфора и исчезновения эффекта электростатического экранирования. Химически это достигается этерификацией или использованием кислых растворов. Биохимически аналогичный результат получается при связывании субстрата с белком.

6. Стереохимические эффекты. Например, специфическое расположение гидроксильной группы может не только привести к атаке определенной части ангидрида, но и повышает его реакционную способность и препятствует обычному гидролизу молекулами воды.

7. Конформация ангидрида, связанного с поверхностью фермента, может иметь значение для направления атаки на определенный атом фосфора в том случае, если анион, находящийся на противоположной стороне атома фосфора, легко уходит.

БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

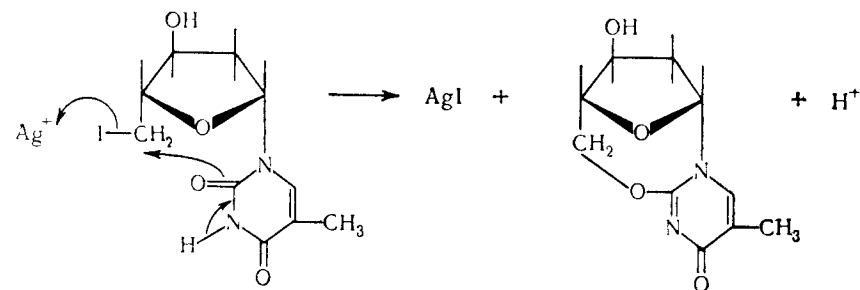
Биологическое значение производных фосфорной кислоты может быть связано главным образом с множеством реакций, в которых они могут участвовать в относительно мягких условиях, а не с какими-то их уникальными свойствами. Эфиры и ангидриды фосфорной кислоты не являются ни слишком стабильными, ни слишком лабильными в условиях, характерных для живых систем и окружающей их среды. Далее, наличие трех способных к диссоциации групп (одной — диссоциирующей в сильно кислой среде, второй — диссоциирующей в области физиологических значений pH и третьей — во многих отношениях сходной со спиртовой гидроксильной группой) и изменение ионизации при образовании эфиров и ангидридов обуславливают то разнообразие свойств фосфорной кислоты, которое было бы невозможным в живых системах, построенных на базе силикатов или сульфатов. Уже приводились многочисленные примеры влияния ионизированного состояния на энергию активации и реакционную способность производных фосфорной кислоты.

В основе биохимических функций органических фосфатов, несомненно, лежит атомная структура самого фосфора; это выражается в том, что во многих активированных комплексах реагирующие вещества действительно связаны друг с другом, т. е. комплексы представляют собой химические соединения, а не каким-то особым образом ориентированные молекулы или их фрагменты [25].

Химические факторы, определяющие скорость и направление реакций органических фосфатов, связаны главным образом с расположением гидроксильной или фосфатной группы (или других функциональных групп) субстрата относительно реагирующей части органического фосфата, присутствием или отсутствием основных катализаторов и распределением заряда в ангидриде или эфире. Химически распределение зарядов может быть изменено рядом способов, таких, как подавление диссоциации фосфатных групп при образовании эфира или проведение реакции в кислой среде (например, катализируемые протонами взаимопревращения нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфатов и нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-алкилфосфатов, которое не наблюдается в щелочной среде) и образование смешанных ангидридов из кислот, сила которых несоизмерима с силой фосфорной кислоты. Для неферментативных химических реакций также наблюдались «каталитические» и направляющие эффекты, возникающие в результате образования комплексов с ионами некоторых поливалентных металлов. В биохимических реакциях аналогичный контроль может осуществляться с помощью таких факторов, как конформация нуклеозид-5'-полифосфатов, связывание субстрата и фермента через металл, связывание диссоциирующих групп фермента с группой $P=O$ водородными связями, что эквивалентно протонированию. (С точки зрения резонансных форм фосфатов, разница между группами $P=O$ и $P-O^-$ носит чисто формальный характер.) Образование катион-субстратных комплексов, таких, как комплекс АТФ с магнием, по-видимому, увеличивает электрофильный характер атомов фосфора (препятствуя ионизации) и почти наверняка приводит к такому смещению электронной плотности, которое облегчает атаку данного атома фосфора, зависящую от определенной стереохимической конфигурации комплекса. В фермент-металл-субстратных комплексах, в которых металл служит мостиком между ферментом и субстратом, свободная энергия активации, по-видимому, значительно снижена.

В то время как нуклеофильная атака положительно заряженного атома фосфора с последующим замещением, вполне возможно, имеет существенное значение для различных ферментативных реакций, в некоторых случаях могут действовать и противоположные механизмы, включающие промежуточное образование «мономерного метафосфата» в качестве фосфорилирующего агента. В некоторых случаях может происходить реакция (фосфорилирования)

или образование комплекса субстрата с имидазольным или каким-нибудь другим основным остатком фермента (в грубом приближении соответствующее каталитическому действию пиридина в химических реакциях), в других же случаях может возникать трехмерный комплекс фермент — субстрат — продукт. Не удивительно, однако, что общие черты в условиях и ходе ферментативных реакций, в которых субстратами являются органические фосфаты, не так уже легко заметны. Даже для такой простой гидролитической реакции, как химический гидролиз глюкозо-1-фосфата, в зависимости от различных условий может быть предложено около шести механизмов. Однако ясно, что «почти все химические процессы, катализируемые ферментами, имеют прототипы среди так называемых органических или неферментативных реакций» [26]. Далее, хотя ферментативные реакции и протекают обычно в водных растворах, одна из функций некоторых ферментов, несомненно, заключается в том, чтобы расположить реагенты так, чтобы фактически исключить из сферы реакции молекулы воды, т. е. чтобы создать локальные «безводные» условия. Таким образом, прямое сравнение этих процессов с химическими реакциями в безводной среде не является таким уж неправомерным. Можно также отметить, что поверхность фермента служит не только для расположения реагентов и создания соответствующих условий, но на определенных стадиях субстрат должен быть связан с этой поверхностью (при любом постулируемом пути реакции) и поэтому обязательно в некоторой степени модифицирован (так же как и фермент). И однако во многих отношениях аналогии между ферментативными и неферментативными реакциями, возможно, более близки к истине, когда в последнем случае органический фосфат изменен в химическом отношении, а не идентичен данному субстрату. Наконец, исходя из требований стереоспецифичности, характерных для многих ферментов, можно предположить, что согласованные реакции с одновременным участием как электрофильных, так и нуклеофильных групп происходят достаточно часто. Образование $O^2,5'$ -циклотимидина



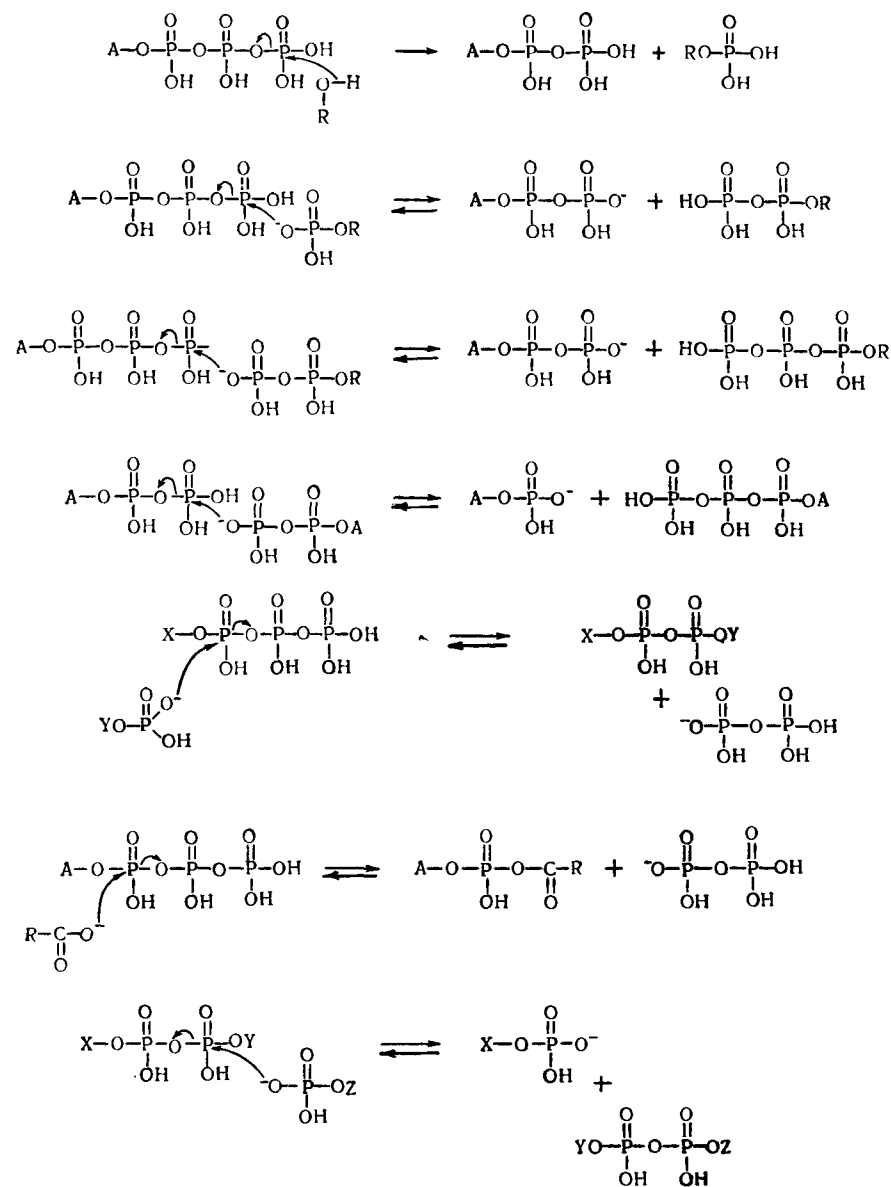
из 5'-иод-5'-дезокситимидина, «катализируемое» ионами серебра, может служить химической аналогией этого типа реакций.

Опыты с мечеными атомами, особенно с O^{18} , позволили установить механизмы ряда ферментативных реакций, связанных с биосинтезом нуклеотидов и их производных, хотя в большинстве случаев роль фермента все еще остается предметом спекуляций [27]. Как нуклеозид-5'-трифосфаты, так и нуклеозид-5'-пирофосфаты могут действовать как катализируемые ферментами фосфорилирующие агенты. Можно ожидать, что соединения первого типа — более сильные агенты (будучи смешанными ангидридами фосфорной кислоты и нуклеозид-5'-пирофосфата) и будут легко фосфорилировать спирты, в то время как нуклеозид-5'-пирофосфаты активны только по отношению к таким сильным нуклеофильным реагентам, как анионы, например нуклеозид-5'-пирофосфаты (нуклеозидмонофосфокиназы). Исключения могут быть найдены в реакциях полимеризации, катализируемых полинуклеотидфосфорилазой, где нуклеофильная атака 3'-гидроксильной группы α -атома фосфора приводит к образованию полирибонуклеотидов.

Для нуклеозид-5'-трифосфатов атака может осуществляться по α - или γ -атому фосфора, что приводит к двум типам разрыва связей: $A-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-OR$ или $A-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-O-P(=O)(OH)-OR$. Различные киназы катализируют фосфорилирование спиртов (таких, как глюкоза, глицерин и нуклеозиды) и анионов (таких, как нуклеозид-5'-фосфаты и нуклеозид-5'-пирофосфаты) посредством атаки γ -атома фосфора в АТФ. Можно привести много различных биохимических примеров реакций первого типа, которые протекают с освобождением неорганического пирофосфата за счет обмена анионами. Они включают обратимый ферментативный синтез P^1, P^2 -диэтерифицированных фосфатов, например уридиндифосфат-глюкозы и флавинаденидинуклеотида, и смешанных ангидридов нуклеотидов с карбоновыми кислотами и аминокислотами (см. схему на стр. 353).

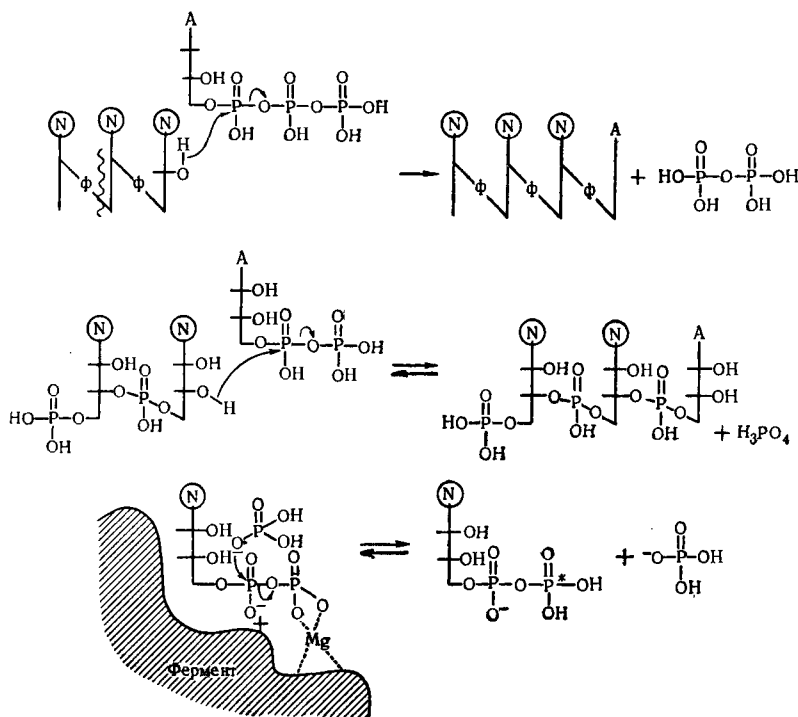
Нуклеозид-5'-трифосфаты, будучи смешанными ангидридами пирофосфорной кислоты и нуклеозид-5'-фосфата, способны переносить моонуклеотидный остаток на такие слабые нуклеофильные реагенты, как гидроксильные группы, как это происходит при ферментативном синтезе ДНК и РНК.

Влияние образования комплекса с металлом (или водородных связей) по β -фосфатной группе нуклеозид-5'-пирофосфатов хорошо видно на примере ферментативного синтеза полирибонуклеотидов из таких субстратов, где обычно более сильная кислота (нуклеозид-5'-фосфат) используется для фосфорилирования 3'-гидроксильной группы. (Следует отметить, что комплексы нуклеозид-5'-трифосфатов с двухвалентными катионами более устойчивы, чем



соответствующие комплексы нуклеозид-5'-пирофосфатов, которые в свою очередь заметно более стабильны, чем аналогичные комплексы P^1, P^2 -диэтерифицированных пирофосфатов.) Кроме снижения сво-

бодной энергии активации на стадии, определяющей скорость реакции [28], связывание фермента с реагентами через металл приводит также к сильному смещению электронной плотности, которое влияет на направление реакции. Возможно, что обмен фосфатными остатками может легко происходить в таких системах и без



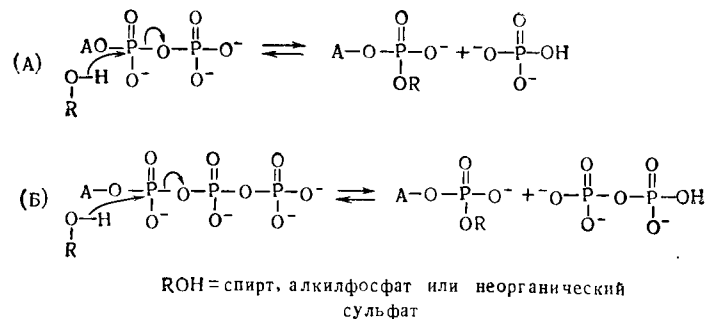
образования полимеров вследствие неспецифической атаки на неорганический фосфат, т. е. на значительно более сильный нуклеофильный реагент, чем нуклеозид-3'-гидроксильная группа. Аналогичные ферментативные реакции обмена анионами, ведущие к синтезу нуклеотидоферментов путем нуклеофильной атаки α -атома фосфора нуклеозид-5'-пирофосфатов, детально еще не описаны, но, по-видимому, их механизм довольно ясен на примере реакций образования аденилил-5'-сульфата из АДФ и неорганического сульфата с освобождением ортофосфата. Совсем недавно был описан фосфороллиз гуанозиндифосфатманнозы (который ведет к образованию гуанозин-5'-пирофосфата и маннозо-1-фосфата) очищенными дрожжевыми экстрактами. Вероятно, будет еще открыто большое число реакций этого типа.

До сих пор не известно, каким образом осуществляется стереохимический контроль за нуклеофильным замещением алкоксигруппы (нуклеозид-3'-) фосфатом при фосфороллизе полирибонуклеотидов, который дает нуклеозид-5', но не нуклеозид-3'-пирофосфаты. Эта специфичность, может быть, определяется общей конформацией полирибонуклеотидов (и олигонуклеотидов), которая направляет атаку преимущественно на доступную часть атома фосфора, которая противоположна 3'-положению.

Пока еще нельзя привести вполне определенного примера ферментативного пирофосфорилирования посредством нуклеофильной атаки β -атома фосфора в нуклеозид-5'-трифосфате. Возможное объяснение этого может заключаться в конформациях, которые могут иметь такие производные трифосфорной кислоты, а также в электростатическом экранировании или в экранировании самим ферментом в фермент-субстратных комплексах, которое может приводить к затруднению атаки β -атома фосфора с последующим замещением нуклеозид-5'-фосфата (или неорганического фосфата в случае переноса нуклеозид-5'-пирофосфата). Как и в многочисленных случаях реакций обмена аниона, разрыв связи при ферментативном гидролизе нуклеозид-5'-трифосфата до нуклеозид-5'-фосфата и неорганического пирофосфата происходит за счет нуклеофильной атаки α -, а не β -атома фосфора [29]. Считалось, что при ферментативном синтезе α -D-рибозо-1-пирофосфат-5-фосфата происходит пирофосфорилирование рибозо-5-фосфата посредством нуклеофильной атаки α -гидроксильной группой D-рибозы β -атома фосфора в АТФ [30]. Однако экспериментальные результаты (с использованием АТФ, меченного P^{32}) показали только то, что β - и γ -фосфатные остатки переносились в виде единого комплекса, и, таким образом, прямого доказательства этого механизма не было получено. Другой возможный механизм может состоять в следующем: нуклеофильная атака осуществляется с инверсией и направлена на $C_1\beta$ -D-рибозо-5-фосфата, причем реакция сопровождается образованием водородных связей между C_1 -гидроксильной и 5-фосфатной группами.

Вообще, оказалось, что нуклеозид-5'-трифосфаты выполняют более широкие биохимические функции, чем соответствующие нуклеозид-5'-пирофосфаты. Если рассматривать АДФ и АТФ как чисто химические реагенты, то можно ожидать, что АТФ (ангидрид АМФ и неорганического пирофосфата) будет более активным донором нуклеотидного остатка, чем АДФ (ангидрид АМФ и неорганического фосфата), так как пирофосфат представляет собой более сильную кислоту, чем ортофосфат (где термин «более сильная кислота» включает в себя все факторы, в том числе и способность образовывать комплексы с ионами металлов), а более сильная кислота, образуя смешанный ангидрид (с более высоким положительным зарядом на атоме фосфора), является более активным реагентом.

том. Поэтому кинетически нуклеозидтрифосфаты — более активные доноры нуклеотидного остатка, чем пирозинфосфаты, независимо от того, рассматривается ли нуклеофильная атака на α -атом фосфора нуклеотида сильного нуклеофильного реагента (такого, как алкилфосфат) или слабого нуклеофильного реагента (такого, как спиртовая гидроксильная группа). Термодинамически, т. е. по отношению к положению равновесия реакции, определение условий реакции безусловно важно. Однако при одних и тех же внешних условиях в области значений pH от 6 до 8 можно ожидать, что реакция Б будет протекать в направлении слева направо в большей степени, чем реакция А, если различия в резонансной стабилизации, ионизации, сольватации, влиянии ионов металлов и электростатических эффектов у продуктов реакции и АТФ (реакция Б) будут больше, чем у продуктов реакции и АДФ (реакция А).

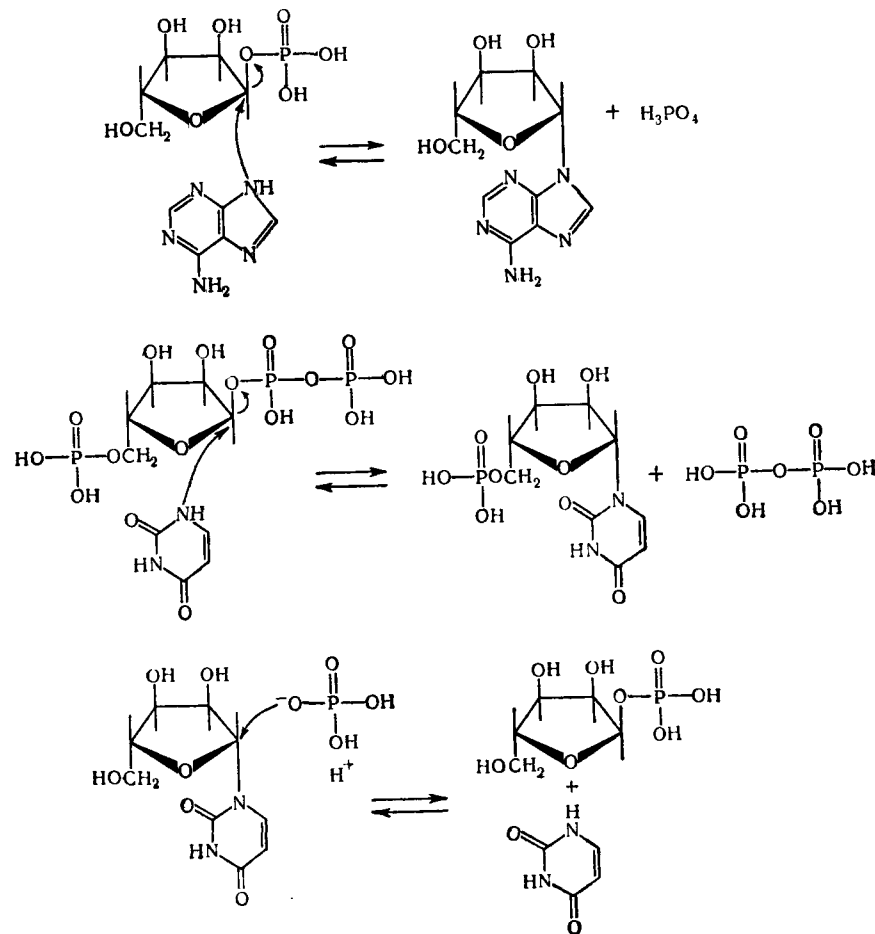


Сравнение констант равновесия для полинуклеотидфосфорилазы и ДНК-полимеразы или для любой другой пары аналогичных реакций, одна из которых фосфоролитическая, а другая — пирозинфосфоролитическая, может, по-видимому, показать, насколько эти рассуждения верны.

С химической точки зрения необходимо изучить реакцию, которая бы проходила полностью за ограниченный промежуток времени (т. е. в которой равновесие сильно смещено вправо). С экспериментальной точки зрения трудно разграничить термодинамический эффект блокирования диссоциации фосфатных групп (приводящего при данных условиях к образованию более стабильных продуктов, чем исходный ангидрид) и кинетический эффект, выражающийся в увеличении положительного заряда на атоме фосфора (т. е. в увеличении его электрофильного характера). В этом случае концепция «макроэргических связей» вполне оправдана, несмотря на ту критику, которой она подвергалась со стороны химиков.

Ферментативный синтез лецитина из цитидиндифосфатхолина и диглицерида служит примером биохимического «фосфорилирования» спиртовых гидроксильных групп P^1, P^2 -диэтерифицированными

пирозинфосфатами. Известны и другие реакции, в которых происходит перенос алкилфосфатного остатка с ЦДФ-Х на спиртовый гидроксил. Примерами ферментативного обмена анионами с диэфирами пирозинфосфорной кислоты могут служить реакции, катализируемые



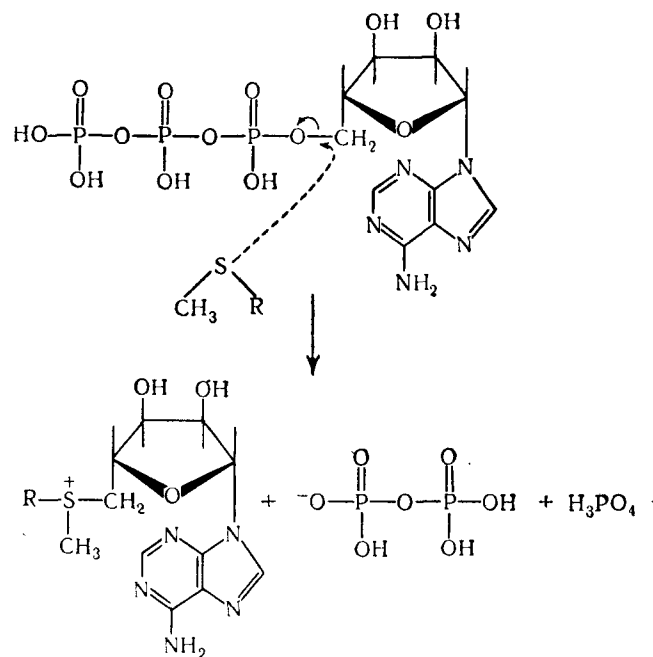
уридилтрансферазой, а также реакции превращения УДФГ или ФАД в УТФ или АТФ под действием неорганического пирозинфосфата.

Ферментативные синтезы нуклеозидов и нуклеотидов из свободного основания и α -D-рибозо-1-фосфата или α -D-рибозо-1-пирозинфосфат-5-фосфата могут служить примерами алкилирования производными фосфорной кислоты.

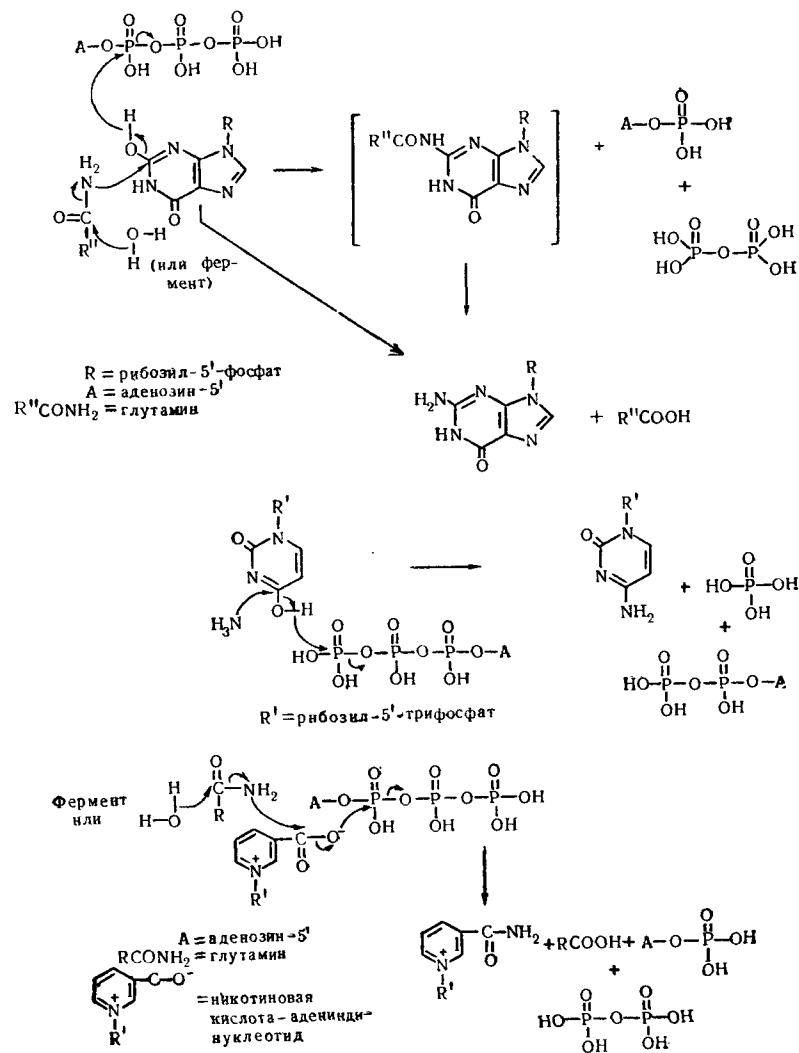
В каждом случае происходит нуклеофильное замещение фосфатного (или пиррофосфатного) остатка с инверсией, так что из фосфатов α -сахаров образуются β -производные нуклеозидов. Еще одним примером алкилирования третьего атома азота служит биосинтез тиминфосфата из оксиметилпиримидинпиррофосфата и тиазолфосфата.

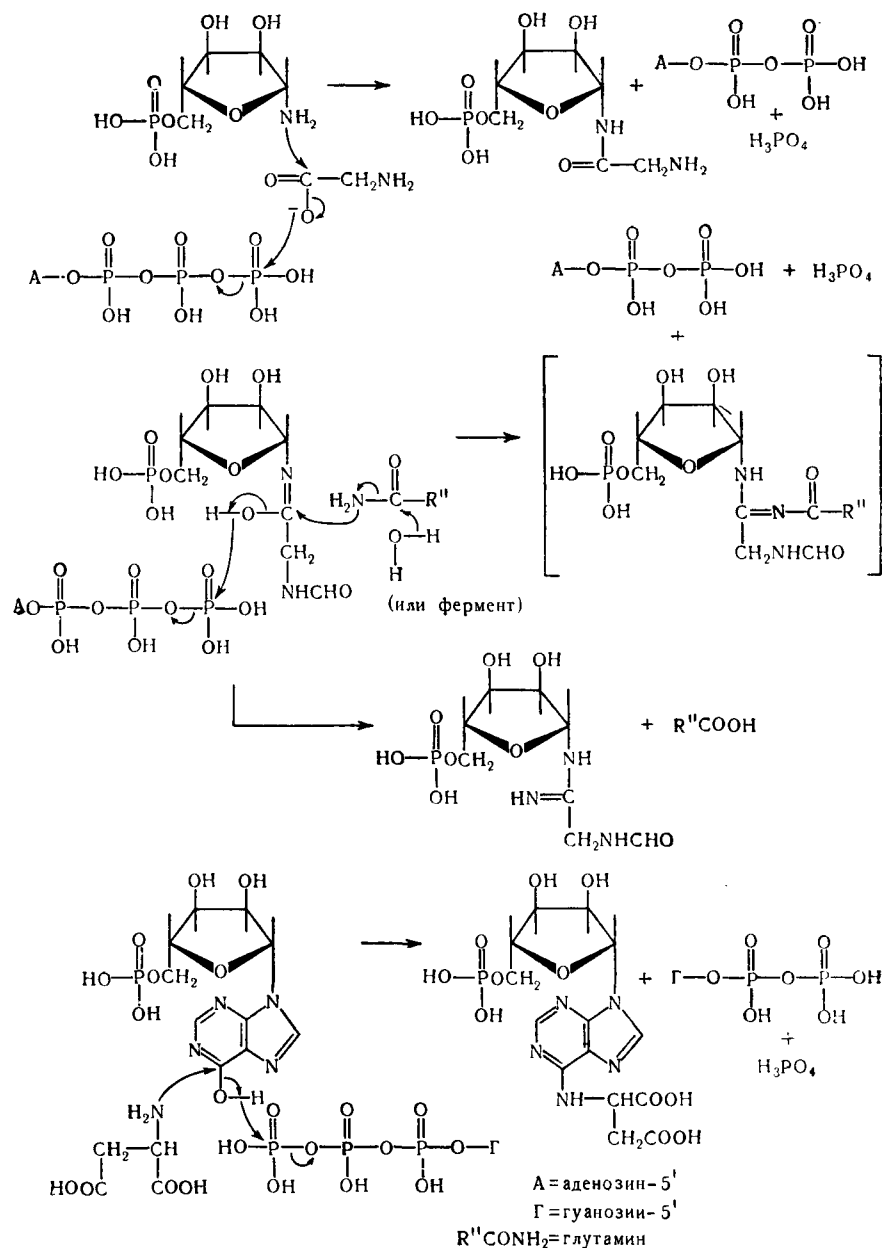
Аналогичные реакции алкилирования происходят при образовании углерод-кислородной связи, как, например, при ферментативном синтезе капсульного полисахарида типа III оболочки пневмококка (полицеллобиурановой кислоты) из УДФГ и уридиндифосфатглюкуроновой кислоты (с инверсией у C_1 переносимого гликозильного остатка) или гликогена (с сохранением конфигурации) из олигосахарида в качестве затравки и УДФГ. Другие ферментативные реакции, аналогичные сольволизу связи $C-O$ в тетрабензилпирофосфате, по-видимому, должны быть обнаружены в синтезах «активного метионина» из метионина и АТФ. В этом случае перенос аденозинового остатка происходит с образованием связи $C-S$ и соответствующим освобождением ортофосфата и неорганического пирофосфата.

* Предполагается, что механизм ферментативного синтеза связей C — N заключается в согласованной реакции субстратов, сопровождающейся замещением гидроксильной группы на аминогруппу



точником которой служит глутамин или аммиак) при участии аденозин-5'-трифосфата. Например, при аминировании ксантозин-5'-фосфата до гуанозин-5'-фосфата согласованное действие как кислотных, так и основных групп приводит к одновременному разрыву связи С — О, образованию связи С — N и разрушению АТФ (который действует как электрофильный активатор связи С — О) до





аденозин-5'-фосфата и неорганического пирофосфата (нуклеофильная атака на α -атом фосфора). Аналогичный распад АТФ происходит при amidировании (глутамином) никотиновая кислота-адениндинуклеотида до никотинамид-адениндинуклеотида, но превращение уридин-5'-трифосфата в цитидин-5'-трифосфат происходит с разрушением АТФ до аденозин-5'-пирофосфата и неорганического ортофосфата (нуклеофильная атака по γ -атому фосфора). Показано, что фермент в нейтральных условиях может индуцировать таутомерные переходы (например, превращение уридина из 6-окси- в 6-кетоформу), соответствующие ионизации. (Сравни химическое аминирование 6-тиоуридина, но не уридина. Сравни также высокую реакционную способность производных уридина, таких, как O^2 -этилуридин и $\text{O}^2,2'$ -(или 3', или 5')-циклоуридин, в которых пиримидин находится в таутомерной форме, облегчающей атаку аминов по C_2).

Аналогичным образом O^6 -этилуридин и $\text{O}^6,5'$ -циклопсевдоуридин легко аминируются по C_6 с замещением кислорода просто в спиртовом растворе аммиака.)

Аналогичные согласованные механизмы были предложены для ферментативных синтезов глицинамидриботида из глицина, рибозил-амин-5-фосфата и АТФ, а также формилглицинамидриботида при действии глутамин-5-фосфата и АТФ на формилглицинамидриботид. Эти механизмы приложимы также к реакциям образования аденилатарной кислоты из инозин-5'-фосфата, аспарагиновой кислоты и ГТФ. (Оказалось, что для всех этих примеров характерна нуклеофильная атака по γ -атому фосфора нуклеозид-5'-трифосфата с освобождением ортофосфата и нуклеозид-5'-пирофосфата) (см. схему на стр. 360).

КАТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ

Стереохимические факторы, способствующие протонированию полуацетального атома кислорода в остатке сахара, могут иметь значение при ферментативном расщеплении нуклеозидов до свободных оснований и сахаров (точно так же, как при реакциях фосфоролиза). Кроме того, на стабильность гликозидной связи может влиять природа связи фермента с субстратом. Выше (стр. 39) уже говорилось об уменьшении стабильности гликозидной связи в результате влияния заместителей в гетероциклической системе и природы сахара. Аналогичным образом изменение электронной плотности у C_2 и C_8 , вызванное чисто химическими факторами (введением заместителей в кольцо), может вести к облегчению атаки на эти центры, как, например, при ферментативном окислении аденина и гуанина до мочевиной кислоты.

Литература

1. Общая литература: Baddiley J., Buchanan J. G., Ann. Repts. Chem. Soc., **54**, 329 (1957); Buchanan J. M., Hartman S. C., Advances in Enzymology, **21**, 199 (1959); Reichard P., Advances in Enzymology, **21**, 263 (1959); Grunberg-Manago M., Ann. Rev. Biochem., **31**, 301 (1962); Hartman S. C., Buchanan J. M., Ann. Rev. Biochem., **28**, 365 (1959).
2. Davis B. D., Arch. Biochem. Biophys., **78**, 497 (1958).
3. Kornberg A., Advances in Enzymology, **18**, 191 (1957).
4. Grunberg-Manago M., Ochoa S., J. Am. Chem. Soc., **77**, 3165 (1955).
5. Lagerkvist U., Berg P., Dieckmann M., Platt F. W., Federation Proc., **20**, 363 (1961).
6. Bessman M. J., Lehman I. R., Simms E. S., Kornberg A., J. Biol. Chem., **233**, 171 (1958).
7. Lipmann F., Advances in Enzymology, **1**, 99 (1941).
8. Gillespie R. J., Maw G. A., Vernon C. A., Nature, **171**, 1147 (1953).
9. Kalckar H., Chem. Revs., **28**, 71 (1941).
10. Oesper P., Arch. Biochem., **27**, 255 (1950).
11. Hill T. L., Morales M. F., Arch. Biochem., **29**, 450 (1950); J. Am. Chem. Soc., **73**, 1656 (1951).
12. Todd A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 1389 (1959).
13. Michelson A. M., Strasbourg Meeting on RNA and Polyphosphates, July, 1961.
14. Michelson A. M., Ann. Rev. Biochem., **30**, 133 (1961).
15. Chantrenne H., Biochim. et Biophys. Acta, **2**, 286 (1948); Nature, **160**, 603 (1947).
16. Michelson A. M., неопубликованные данные.
17. Wieland T., Merz H., Pfeleiderer G., Chem. Ber., **93**, 1816 (1960).
18. Zachau H. G., Chem. Ber., **93**, 1822 (1960).
19. Zachau H. G., Karau W., Chem. Ber., **93**, 1830 (1960).
20. Michelson A. M., Letters R., в печати.
21. Grunze I., Thilo E., Grunze H., Chem. Ber., **93**, 2631 (1960).
22. Brown D. M., Hamer N. K., J. Chem. Soc., **1960**, 406.
23. Dudek G. O., Westheimer F. H., J. Am. Chem. Soc., **81**, 2641 (1959).
24. Kenner G. W., Mather J., J. Chem. Soc., **1956**, 3524.
25. Schmulbach C. D., Wazer J. R. V., Iraní R. R., J. Am. Chem. Soc., **81**, 6347 (1959).
26. Buchanan J. M., Hartman S. C., Advances in Enzymology, **21**, 230 (1959).
27. Общая литература: Koshland D. E., in The Mechanism of Enzyme Action, ed. by McElroy W. E., Glass B., The Johns Hopkins Press, 1954; Kornberg A., Advances in Enzymology, **18**, 191 (1957); Buchanan J. M., Hartman S. C., Advances in Enzymology, **21**, 199 (1959).
28. Ingraham L. L., Green D. E., Science, **128**, 310 (1958).
29. Cohn M., Biochim. et Biophys. Acta, **37**, 344 (1960).
30. Khorana H. G., Fernandes J. F., Kornberg A., J. Biol. Chem., **230**, 941 (1958).
31. Shabarova Z. A., Hughes N. A., Baddiley J., Biochem. J., **83**, 216 (1962).
32. Szer W., Shugar D., Biokhimiya, **26**, 840 (1961).

ОРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты представляют собой полимерные соединения, которые различными способами могут быть расщеплены на мононуклеотиды. Для удобства полимеры мононуклеотидов будут называться олигонуклеотидами, когда число мономерных единиц в молекуле составляет от 2 до 7 (приблизительно), и полинуклеотидами, когда это число превышает 7*. Как и в случае многих макромолекул, понятие молекула становится довольно неопределенным при очень больших молекулярных весах вследствие процессов агрегации и дезагрегации, которые могут происходить с большей или меньшей легкостью. И снова для удобства молекулами следует называть только структуры, образованные целиком ковалентными связями; макромолекула — это очень большая одиночная молекула (которая, кроме ковалентных связей, может содержать вторичные внутримолекулярные связи); агрегаты должны быть описаны отдельно и могут быть определены, когда это известно, как ди-, три- или полимолекулярные, указывая число молекул или тяжей, образующих комплекс.

Нуклеиновые кислоты первоначально были названы так потому, что их выделяли из клеточных ядер. Впоследствии определились два основных класса нуклеиновых кислот; типичными представителями первого класса являлись нуклеиновые кислоты, выделенные из зубной железы, а второго — нуклеиновые кислоты из дрожжей. Дальнейшее исследование показало, что классификация нуклеиновых кислот по происхождению (например, растительные или животные) вводит в заблуждение, так как в любых клетках содержатся нуклеиновые кислоты обоих типов. Оба они присутствуют в ядре, но во многих клетках основная масса нуклеиновых кислот (рибонуклеиновая кислота) находится в цитоплазме. Поскольку биологические различия часто оказываются неясными, особенно когда дело касается систем, находящихся на грани между живым и неживым, таких, как вирусы, более удобна химическая характеристика, поэтому в настоящее время нуклеиновые кислоты классифицируются как дезоксирибонуклеиновые или рибонуклеиновые, в зависимости от природы углеводного компонента. Рибонуклеиновая

* Это рабочее определение, но возможно также и физическое обоснование такого деления.

кислота найдена главным образом в цитоплазме, тогда как местонахождение дезоксирибонуклеиновой кислоты ограничено, возможно, исключительно клеточным ядром. Существенные различия между двумя классами нуклеиновых кислот были обнаружены, кроме того, в пиримидиновом составе и, в меньшей степени, в природе белков, с которыми эти кислоты обычно связаны.

Хотя уже первые исследователи установили малую устойчивость нуклеиновых кислот, все же в течение многих лет применялись довольно жесткие условия их выделения. Отчасти из-за этого исследование нуклеиновых кислот, особенно в отношении состава оснований, молекулярного веса, числа вторичных фосфатных групп по отношению к числу первичных, дает результаты, которые хотя и характеризуют сильно разрушенные изучаемые образцы, но едва ли соответствуют нуклеиновым кислотам *in vivo*. С появлением мягких методов выделения обрисовалась более точная картина, но даже и теперь известны лишь наиболее общие черты структуры нуклеиновых кислот.

РИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

ВЫДЕЛЕНИЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Методы, используемые для экстракции рибонуклеиновых кислот, частично зависят от природы органа или организма. В одном из ранних методов, использованном Левиным [1], к густому тесту из дрожжей добавляли щелочь, смесь перемешивали с пикриновой кислотой, фильтровали и нуклеиновую кислоту осаждали из фильтрата добавлением соляной кислоты. Такая довольно жесткая обработка приводила к тому, что полученная нуклеиновая кислота значительно отличалась от «нативной» рибонуклеиновой кислоты. Для выделения рибонуклеиновых кислот, приближающихся по структуре к нуклеиновым кислотам живой клетки, необходимо избегать применения жестких условий (рН, температура) в то же время необходимо, насколько возможно, затормозить ферментативный распад. Широко применялась экстракция рибонуклеопротеидов изотоническим раствором хлористого натрия [2,3]. Белки от нуклеиновых кислот могут быть отщеплены различными методами, такими, как обработка смесями хлороформа с октиловым спиртом [4], додецилсульфатом натрия [5], нитратом стронция [6] или спиртом [7], а также расщепление белковой фракции трипсином [8]. И снова эффективность каждого метода определяется природой рибонуклеопротеида. Для инактивации ферментов в процессе экстракции полезно применение хлоргидрата гуанидина (денатурирующего агента) [9]; для выделения рибонуклеиновых кислот и нативных рибонуклеопротеидов из дрожжей был применен метод,

использующий адсорбцию рибонуклеаз на бентоните после предварительной обработки ионами цинка [10].

Особые преимущества имеет выделение рибонуклеиновых кислот из гомогенатов тканей млекопитающих, микроорганизмов и вирусов экстракцией фенолом и водой при комнатной температуре, так как при этом белки и дезоксирибонуклеиновые кислоты выпадают в осадок, активность рибонуклеазы подавляется и высокополимерные продукты могут быть получены с хорошими выходами [11—14]. Прямая экстракция дрожжей водным раствором фенола была применена для препаративного получения транспортных РНК [15]. В примененных условиях экстракции высокомолекулярный материал почти не экстрагировался. Комбинирование экстракции с быстрой очисткой РНК на анионитах ЭКТЕОЛА- [16] или ДЭАЭ-целлюлозе [17, 18] дает возможность получать относительно чистую транспортную нуклеиновую кислоту в больших количествах.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ

Помимо ряда вирусных нуклеиновых кислот, большинство выделенных полирибонуклеотидов, бесспорно, представляют собой сложные смеси, содержащие полимеры с различной длиной цепи, нуклеотидной последовательностью и составом оснований (присутствие или отсутствие «минорных» оснований). Существует ряд приемов для частичного фракционирования, однако, пока не разработаны удовлетворительные методы характеристики, трудно определить степень чистоты или гомогенности рибонуклеиновых кислот. В основу оценки чистоты транспортных РНК, этих сравнительно низкомолекулярных полирибонуклеотидов, может быть положена их ферментативная реакция с аминокислотами (через аминокислотацилирование), почти, конечно, позволяет оценить и их биохимическую однородность.

Методы фракционирования включают осаждение нейтральными солями [19—21], электрофорез [22, 23], хроматографию на фосфате кальция [24—26] и осаждение дигидрострептомицином [27]. Недавно для фракционирования рибонуклеиновых кислот была использована фракционная диссоциация комплексов нуклеиновая кислота — гистон, примененная ранее к дезоксинуклеиновым кислотам [28]. Во всех фракциях отношение 6-амино- к 6-кетонуклеозидам было близко к единице. В некоторой степени фракционирование происходит при экстракции фенолом [29—32], возможно как результат дифференциального связывания нуклеиновых кислот с белками. Анионообменные целлюлозы, такие как ЭКТЕОЛА и ДЭАЭ, широко применяются в настоящее время для фракционирования не только рибонуклеиновых кислот [33, 34], включая специфичные для аминокислот транспортные РНК [35], но и рибонуклео-

протеидов [36] и даже вирусных препаратов [37]. Для элюирования обычно используют растворы нейтральных или близких к нейтральным солей. Поразительной особенностью метода является способность этих ионообменников к разделению очень широкого спектра веществ, начиная от изомеров мононуклеотидов [38] и олигонуклеотидов с различной длиной цепи или различного состава [39—42] и кончая полинуклеотидами чрезвычайно высокого молекулярного веса *. Опубликовано сообщение о разделении на колонках из ДЭАЭ-декстрана РНК, меченной валином, от немеченой акцепторной РНК [43]. Для фракционирования рибонуклеиновых кислот были также применены модифицированные ионообменные целлюлозы, в которых к целлюлозе с помощью эпихлоргидрина присоединены нуклеозиды (вместо триэтаноламина), особенно аденозин и гуанозин [44]. Подобное использование ЭКТЕОЛА-целлюлозы для фракционирования или выделения информационной РНК, связанной в данный момент с ДНК, основано на способности к специфическому образованию водородных связей: ЭКТЕОЛА связывает денатурированную ДНК данного организма (для элюирования ДНК необходим растворитель чрезвычайно высокой ионной силы), а информационная РНК элюируется растворами понижающейся ионной силы. Посредством хроматографии на *трет*-аминоалкилированном крахмале (на анионите Cato 2, ранее Cato 8) транспортная рибонуклеиновая кислота была разделена на фракции на основании повышенного сродства к тирозину и лейцину [45, 46]. Хроматография на оксиапатите дает хорошее разделение рибонуклеиновых кислот, специфичных для валина и фенилаланина [47].

Частичное фракционирование рибонуклеиновых кислот может быть также осуществлено с помощью противоточного распределения [48]; этим методом было достигнуто почти полное отделение РНК, специфичной для аланина, от РНК, специфичной для тирозина [49, 50], и фракций, акцептирующих тирозин, от фракций, акцептирующих валин [17], из смеси так называемых «растворимых» РНК («транспортных», или «акцепторных» РНК). За 400 циклов переноса в системе фосфатный буфер — формамид — изопропиловый спирт было осуществлено частичное или полное разделение рибонуклеиновых кислот, специфичных для ряда различных аминокислот [51]. Хотя ни в одном из случаев не было достигнуто полной чистоты и гомогенности, метод удобен для предварительного фракционирования [557]. Распределение РНК, специфичных для треонина и для лейцина, позволило предположить, что в транспортной РНК из

* Значительное улучшение разделения олигонуклеотидов и низкомолекулярных полинуклеотидов может быть достигнуто ионообменной хроматографией в присутствии мочевины для устранения образования вторичных связей [569].

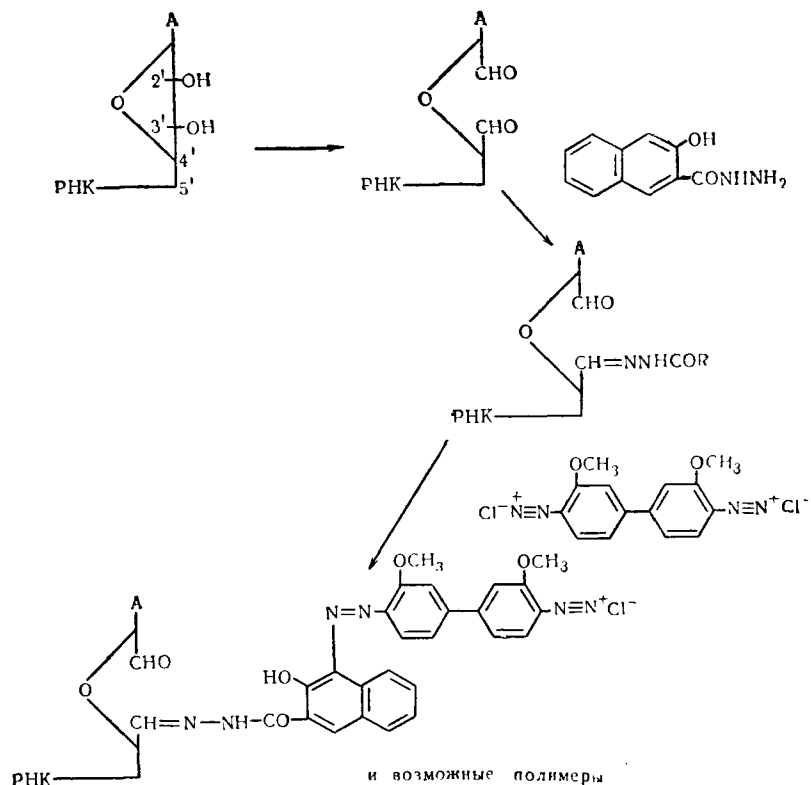
дрожжей они гетерогенны [51]. Другие системы растворителей также были использованы со значительным успехом [52—55].

Успешное разделение специфических транспортных нуклеиновых кислот было достигнуто с помощью распределительной хроматографии на кремневой кислоте при использовании растворителя фосфатный буфер (содержащий ионы магния) — формамид — изопропиловый спирт. Получено хорошее разделение тирозин-, триптофан-, гистидин-, валин- и аланин-активных акцепторных РНК [56] и стало возможным значительное улучшение выхода РНК (80%) [57].

Некоторая степень очистки [58] транспортных РНК, специфичных для валина и пролина, достигается при применении фракционного осаждения спермином при pH 5,6. Значение pH весьма критично; исследования [59] синтезированных ферментативным путем гомополимеров (из которых все осаждаются при pH между 4,1 и 6,8) и их спиральных комплексов указывают, что, тогда как комплекс полиадениловой и полиуридиловой кислот осаждается спермином при pH от 5,1 до 6,8, аналогичный комплекс полиинозиновой и полицитидиловой кислот со спермином растворим в этих пределах pH. Однако при подкислении до pH 4,5 происходит немедленная агрегация, вероятно вследствие разрушения спирального комплекса протонированием цитозиновых остатков. Результаты позволили предположить довольно заметную гетерогенность состава (или, возможно, структуры) транспортных нуклеиновых кислот.

Частичное разделение специфических транспортных РНК достигается химической обработкой. Аминокислоты, этерифицирующие 3' (или 2')-гидроксильную группу концевого нуклеозида рибонуклеиновых кислот, выделенных из дрожжей экстракцией фенолом, были удалены при pH 10. Смесь затем была специфически мечена C^{14} -L-валином при помощи активирующей аминокислоты ферментативной фракции. Периодатное окисление неэтерифицированных 2',3'-*цис*-гидроксильных групп дает рибонуклеиновые кислоты (кроме полимеров, защищенных валином), содержащие концевой диальдегид. Образование гидразона с гидразидом 2-окси-3-нафтойной кислоты и последующее сочетание с диазотированным *о*-дianiзидином дает нуклеиновую кислоту, связанную с красителем, в смеси с РНК, специфичной для валина. Фракционным осаждением на поверхности раздела двух фаз было получено обогащение последней фракции в 12 раз [60]. Практически чистую защищенную валином РНК удобнее отделить от связанной с красителем нуклеиновой кислоты с помощью хроматографии на колонках ДЭАЭ-декстрана [43]. Несомненно, можно применить ряд других вариаций этого метода фракционирования, и метод (и его возможные модификации) открывает большие перспективы. Одна из таких модификаций представляет собой сочетание окисленных периодатом рибонуклеино-

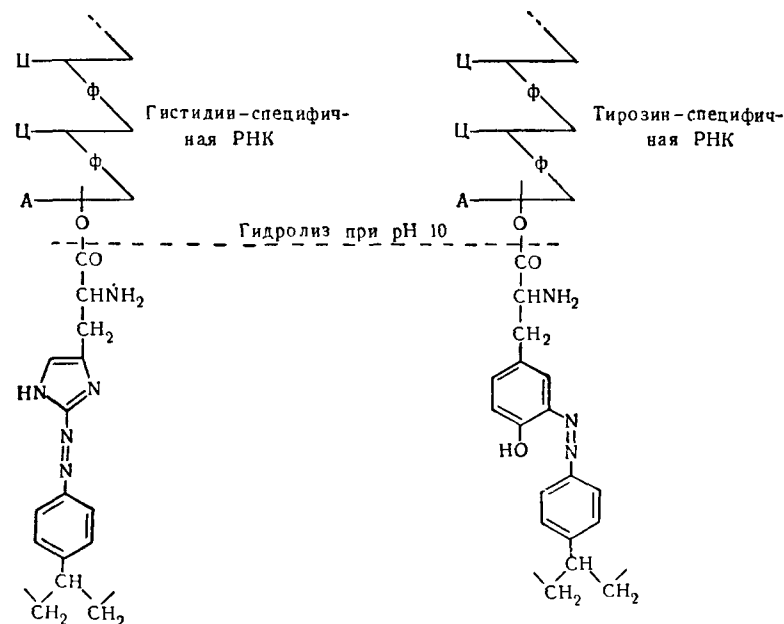
вых кислот (кроме специфических аминоксил-РНК) с фенилгидразиновой смолой, полученной из *п*-аминобензилцеллюлозы диазотированием и последующим восстановлением боргидридом натрия



[61]. С другой стороны, РНК-диальдегид можно сочетать с водорастворимым гидразидом полиакриловой кислоты; таким путем было достигнуто десятикратное обогащение фракции РНК, меченной L-валином [52, 62]. Метод воспроизводим и может быть использован для больших количеств материала. Было также применено сочетание с аминоэтилцеллюлозой [566].

В другом методе, имеющем значительную потенциальную ценность, используется поперечно сшитый полидiazостирол, полученный в результате реакции полиаминостирола с азотистой кислотой; метод основан на наблюдениях, что соединения диазония легко реагируют с некоторыми аминокислотами с образованием ковалентно связанных производных. В пределах pH от 7 до 8,5 быстро реагируют только тирозин и гистидин. Препараты транспортных РНК,

полностью этерифицированные аминокислотами, встряхивали с нерастворимым полидiazостиролом, который реагировал только с нуклеиновыми кислотами, меченными тирозином и гистидином. При



инкубации при pH 10 освобождались эти два специфических полинуклеотида в результате расщепления аминокислотно-эфирных связей. Дальнейшая очистка достигалась повторной этерификацией тирозином при использовании очищенного тирозин-активирующего фермента и повторной обработкой полидiazостиролом. С неэтерифицированной специфичной к гистидину рибонуклеиновой кислотой реакции не происходило, и она оставалась в растворе, в то время как специфичная к тирозину нуклеиновая кислота освобождалась, как и прежде, при обработке щелочью в мягких условиях. Обе фракции получены почти чистыми в отношении их аминокислотно-акцепторной специфичности [63]. Предварительные наблюдения показали, что специфичная к валину рибонуклеиновая кислота, вполне вероятно, может быть этерифицирована дипептидом тирозилвалином.

Опубликованы предварительные данные по употреблению специальных хроматографических материалов, действие которых основано скорее на образовании водородных связей (предположительно), чем ионных и ковалентных. *п*-Нитробензоильный эфир частично ацелированной целлюлозы восстанавливали до аминокислоты

ного, диазотировали и сочетали с гуанином* (при C_8), причем был получен продукт, содержащий один остаток гуанина на пятнадцать молекул глюкозы [64]. Этот материал легко адсорбировал рибонуклеиновые кислоты из солевых растворов с высокой ионной силой (способствующих образованию водородных связей); в случае низкомолекулярной РНК из дрожжей элюирование растворами уменьшающейся ионной силы давало фракции, существенно различающиеся по составу оснований. Вопреки ожиданию, в процессе элюирования не было отмечено заметного увеличения содержания цитозина; по-видимому, кроме комплементарного водородного связывания, действовали иные факторы (такие, как молекулярный вес, нуклеотидная последовательность и нерегулярное распределение в хроматографическом материале 8-замещенных остатков гуанина). Вероятно, некоторое значение имеет сама вторичная структура РНК, благодаря которой для водородного связывания может быть доступно сравнительно небольшое количество оснований.

Хроматография на метилированном сывороточном альбумине [551, 552] была весьма успешно применена для фракционирования информационной РНК (соответствующей по составу клеточной ДНК) самого различного молекулярного веса [553]. Легко достигнуто отделение низкомолекулярной транспортной РНК от микросомальной РНК [558]; возможно также дальнейшее фракционирование транспортной РНК [568].

Разработан изящный метод очистки Т4-специфичной РНК и выделения информационной РНК, соответствующей ограниченному генетическому сегменту ДНК бактериофага. Денатурированную Т4-ДНК конденсировали с помощью дициклогексилкарбодиимида с фосфатом ацетиловой целлюлозы [562]. Через колонку из этого материала в разбавленном буфере при 55° пропускали суммарную РНК из зараженных клеток *Escherichia coli* для осуществления гибридизации. Не связавшуюся в комплекс РНК (хозяина) элюировали, а затем буфером очень низкой ионной силы при 65° с колонки была снята Т4-информационная РНК. Состав оснований Т4-РНК этого типа (свободной от РНК *E. coli*) сходен с составом оснований Т4-ДНК, связанной с фосфатом целлюлозы; это еще раз подтверждает то, что адсорбция осуществляется за счет специфического образования комплементарно связанных водородными связями гибридных комплексов РНК — ДНК. Подобная обработка суммарной Т4-информационной РНК на второй колонке, содержащей ДНК из мутанта Т4, г 1272, полученного в результате делеции** (т. е. ДНК, потерявшую специфическую последовательность

* См., однако, *Z. physiol. Chem.*, **340**, 210(1965).

** Делеция — это хромосомная мутация, возникающая в результате потери участка хромосомы. — *Прим. перев.*

нуклеотидов), приводит к разделению РНК, специфичной для участка г II генома бактериофага (эта РНК не адсорбируется колонной), от информационной РНК, соответствующей доступным для связывания участкам ДНК (адсорбированной колонкой) [562].

Более поздние исследования показали, что легко можно осуществить физическую фиксацию ДНК в гелях ацетата целлюлозы или агар-агара (в отсутствие какого-либо химического агента); закрепленная таким образом ДНК образует водородные связи с комплементарными молекулами и, следовательно, может быть использована для очистки и выделения специфической РНК [570].

Описан родственный метод, основанный на образовании специфического комплекса с молекулами, имеющими относительно короткие цепи [563]. Этерификацией гидроксильных групп целлюлозы концевыми 5'-фосфатными остатками смеси политимидиловых кислот с небольшой длиной цепи при помощи дициклогексилкарбодиимида было достигнуто ковалентное связывание этих олигонуклеотидов с целлюлозой. При 4° гекса(дезоксидениловая кислота) удерживалась колонкой и, таким образом, могла быть отделена от гекса(тимидиловой кислоты); олигодениловая кислота элюировалась при 35° . Этим методом возможно фракционирование транспортных РНК [563].

ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ СТРОЕНИЯ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

После того как было установлено, что рибонуклеиновые кислоты состоят в основном из четырех мононуклеотидных единиц, в течение многих лет отсутствовали точные сведения относительно характера межнауклеотидных связей и поэтому было высказано множество предположений. Многие предполагаемые структуры включали пиррофосфатные, полифосфорные, эфирные и фосфоамидные связи, но относительно простая тетра-нуклеотидная структура, предложенная Левиным [65, 66] и содержавшая фосфодиэфирные связи между углеводными компонентами нуклеозидов, лучше всего, как позже было выяснено, соответствовала действительности. Хотя в настоящее время тетра-нуклеотидная теория строения нуклеиновых кислот полностью оставлена, уместно, быть может, упомянуть, что эта теория была в свое время значительно точнее тринуклеотидной теории [67, 68], с которой она находилась в оппозиции, и что, как писал сам Левин, «с другой стороны, нужно иметь в виду, что истинный молекулярный вес нуклеиновых кислот до сих пор еще неизвестен. Тетрануклеотидная теория (заметьте) — это минимальный молекулярный вес, а нуклеиновая кислота может представлять кратное его умножение» [69]. Кроме того, возможно, что материал, названный тогда нуклеиновой кислотой, был очень низкого молекулярного веса и средняя длина его цепи составляла пять или

шесть нуклеотидов. Последующие исследования Гулланда с сотрудниками позволили предложить модификацию теории, отраженную во фразе «статистический тетрануклеотид» [70], но лишь в 1949 г. в результате применения современных аналитических методов удалось внести ясность в этот вопрос.

В то время было известно, что рибонуклеиновые кислоты могут быть гидролизваны щелочью до мононуклеотидов, которые, как тогда считали, были исключительно нуклеозид-3'-фосфатами. Общий план строения нуклеиновых кислот с 2'—3'-фосфодиэфирными связями был предложен Левиным и Типсоном [71], причем было сделано допущение, что 2'-связь гораздо менее устойчива, чем 3'-фосфодиэфирная связь, и обуславливает таким образом образование при щелочном гидролизе исключительно нуклеозид-3'-фосфатов. Однако, когда рибонуклеиновую кислоту обработали змеиным ядом (который содержит фосфомоноэстеразу, специфичную для нуклеозид-5'-фосфатов), то получили неорганический фосфат и нуклеозиды [72, 73]. Далее, изучение рибонуклеиновой кислоты методом дифракции рентгеновских лучей, проведенное Астбери, позволило предположить, что основной межнуклеотидной связью является скорее 2'—5' или 3'—5', чем 2'—3' [74]. С другой стороны, прямого химического доказательства наличия 5'-фосфатной связи не существовало, и отсутствие 5'-фосфорилированных производных в кислых гидролизатах рибонуклеиновой кислоты, несмотря на их известную стабильность, действительно находилось в явном противоречии с предположением о 2'(или 3')—5'-межнуклеотидной связи. Устойчивость дезоксирибонуклеиновой кислоты (неизбежно 3'—5'-связанной) по отношению к щелочи в противоположность неустойчивости рибонуклеиновой кислоты также указывало, как считали в то время, на различие в типах связи. В противоположность этому при действии панкреатической рибонуклеазы на рибонуклеиновую кислоту получается смесь олигонуклеотидов, устойчивых к перио-



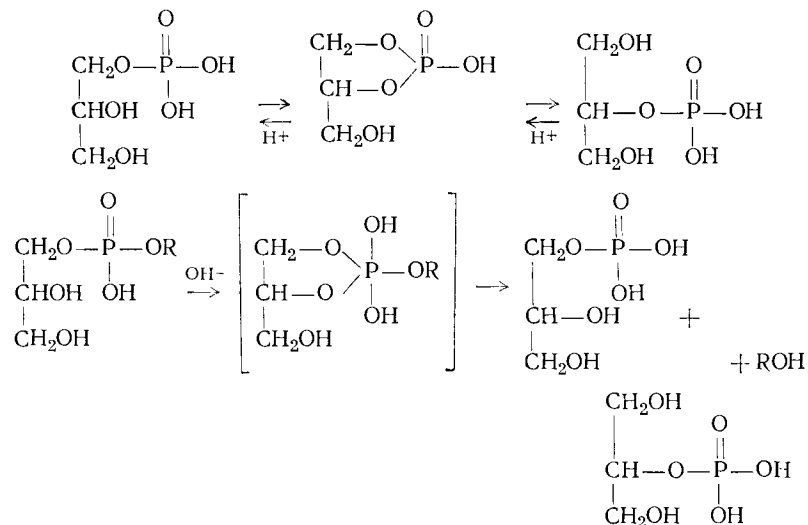
дату, которые после удаления моноэтерифицированного фосфата путем обработки фосфомоноэстеразой, окисляются периодатом. Это указывает на то, что конечный фосфат был расположен при 2'-или 3'-гидроксильной группе и что, поскольку нуклеозид в свободном виде не выделялся, имела место также связь через иные, чем 2'- или 3'-гидроксильные, группы [75].

Применение методов хроматографии на бумаге для быстрого анализа пуриновых и пиримидиновых оснований [76, 77] в гидролизатах небольших количеств рибонуклеиновых кислот вскоре показало, что молярная эквивалентность этих оснований скорее была исключением, чем общим правилом. Еще более важным было наблюдение, что разделение смеси нуклеотидов в щелочном гидролизате рибонуклеиновой кислоты при помощи ионообменной хроматографии дает изомерные пары нуклеотидов, являющихся, как позже было показано, нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфатами [78]. Хотя эти изомеры не подвергались взаимопревращению в щелочи, кислота легко катализировала миграцию фосфатного остатка между 2'- и 3'-гидроксильными группами. Таким же методом были обнаружены 5'-фосфаты аденозина, цитидина, гуанозина и уридина (среди прочих продуктов) после гидролиза кишечной фосфодиэстеразой рибонуклеиновых кислот, предварительно обработанных рибонуклеазой [79]. Со значительно более высокими выходами нуклеозид-5'-фосфаты получены при действии диэстеразы змеиного яда на рибонуклеиновые кислоты из дрожжей и печени телят; гидролизаты содержали также свободные нуклеозиды и нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфаты [80].

Проблема основной схемы строения нуклеиновых кислот была решена в 1952 г. Брауном и Тоддом, которым удалось примирить казавшиеся противоречивыми данные [81]. Предварительно в исследованиях с применением радиоактивного фосфора было показано, что катализируемая кислотой изомеризация α - или β -глицерофосфатов внутримолекулярна и проходит через образование промежуточного циклического фосфата [82]. Было также известно, что, хотя α -глицерофосфат устойчив к щелочи, его метиловый эфир при гидролизе щелочью или разбавленной кислотой легко превращается в метанол и смесь α - и β -глицерофосфатов. Для объяснения значительно меньшей устойчивости таких диэфиров фосфорной кислоты, содержащих остаток глицерина (или этиленгликоля), по сравнению с простыми фосфодиэфирами, не имеющими смежной гидроксильной группы, было постулировано образование промежуточного триэтерифицированного «ортоэфира» циклофосфата [83, 84]. Фоно предположил (в 1947 г.), что быстрая деградация рибонуклеиновой кислоты при обработке щелочью, в противоположность устойчивости дезоксирибонуклеиновой кислоты, зависит от присутствия *цис*-гидроксильной группы при атоме C_{2'} рибозного остатка (отсутствую-

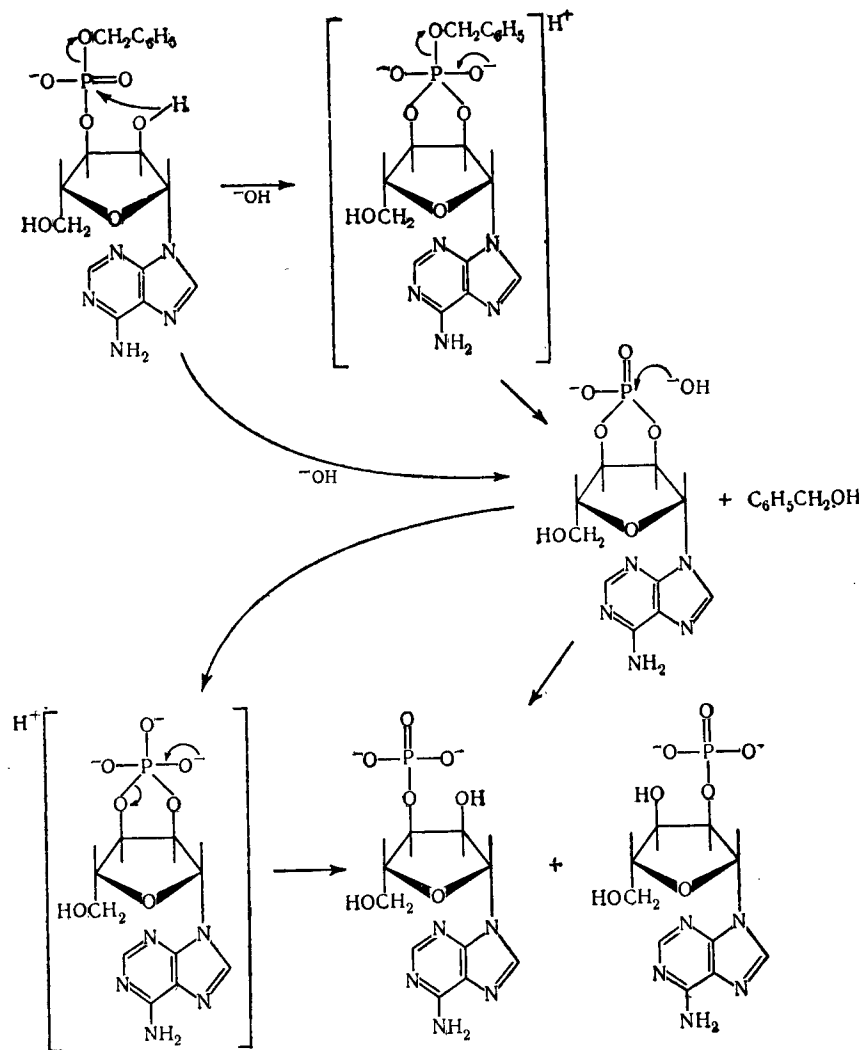
щей в дезоксирибонуклеиновых кислотах) и что при гидролизе рибонуклеиновых кислот и глицероалкилфосфатов ведут себя аналогично [84].

Подобные свойства были обнаружены у ряда простых синтетических нуклеотидных производных, таких, как аденозин-2'-бензилфосфат и аденозин-3'-бензилфосфат [81, 85]; каждый из последних легко подвергался гидролизу (кислотой или щелочью) с образованием бензилового спирта и смеси аденозин-2'- и аденозин-3'-фосфатов. Постулированный промежуточный аденозин-2',3'-циклофосфат был синтезирован и охарактеризован; свойства этого циклического фосфата оказались в полном соответствии со свойствами,



характерными для такого промежуточного продукта [86]. Дальнейшие исследования подтвердили эти наблюдения для ряда алкиловых эфиров рибонуклеозид-2'- и рибонуклеозид-3'-фосфатов, все из которых, в противоположность аденозин-5'-бензилфосфату, в кислых или щелочных условиях легко распадались с сопутствующей миграцией фосфатной группы [86, 87].

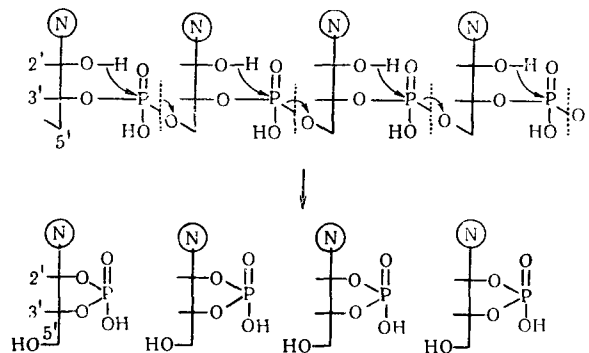
В результате был предложен общий план строения рибонуклеиновой кислоты, согласно которому нуклеозидные единицы соединены повторяющимися фосфодиэфирными связями между 3' (или 2')- и 5'-гидроксильными группами соседних нуклеозидов [81]. Щелочная деградация, как можно было теперь ожидать, дала бы нуклеозид-2',3'-циклофосфаты в результате разрыва исключительно связи $\text{C}_5' - \text{O} - \text{P}$ с последующим гидролизом до смеси нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфатов. При использовании мягкого щелочного



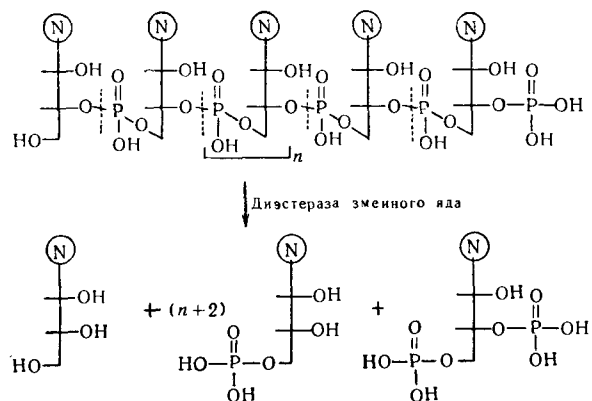
гидролиза было продемонстрировано присутствие в гидролизатах рибонуклеиновой кислоты этих постулированных нуклеозид-2',3'-циклофосфатов, что сразу же подтвердило выдвинутый механизм [88].

Необходимость присутствия соседней гидроксильной группы (стереохимические требования определяют еще ее как *цис*-смежную) для образования промежуточных циклических фосфатов объясняет,

таким образом, щелочеустойчивость дезоксирибонуклеиновой кислоты и таких синтетических диэфиров, как аденилил-5':5'-уридин (аденозин-5'-уридин-5'-фосфат) [89]. Вследствие своей стабильности межнуклеотидные связи такого типа, как в последнем соедине-



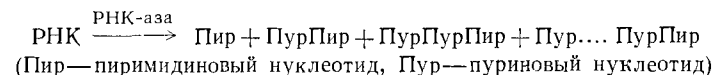
нии, должны быть почти полностью исключены из рибонуклеиновых кислот. Аналогично возможность наличия других, 2'—2'- и 3'—3'-межнуклеотидных связей (такие структуры должны расщепляться щелочью постадийно, а не в результате одновременной



атаки по многим местам цепи) должна быть исключена по ряду соображений, как, например, почти количественное выделение нуклеозид-5'-фосфатов из рибонуклеиновой кислоты под действием фосфодиэстеразы змеиного яда [90]. Специфичность этого фермента к эфирам нуклеозид-5'-фосфатов [91] (и природа продуктов) служит строгим доказательством участия 5'-гидроксильных групп, в то

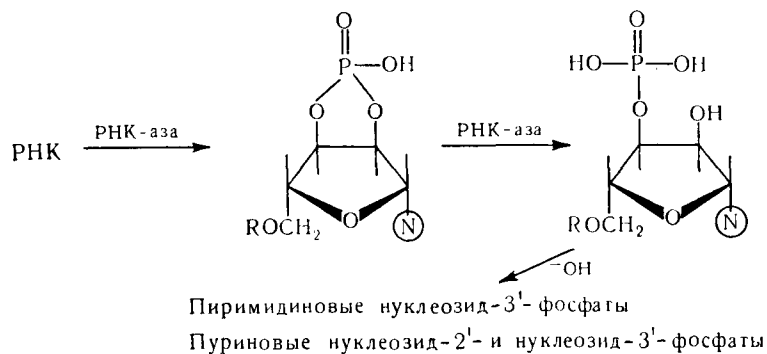
время как выделение нуклеозидов и нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфатов в равных небольших количествах легко объясняется наличием повторяющейся 3'(или 2') — 5'-межнуклеотидной структуры, так как эти соединения должны возникать из концевых единиц таких структур [92].

Хотя на данном этапе методы химического гидролиза не позволяют сделать выбора между 3'—5'- и 2'—5'-межнуклеотидными связями, доказательства, по-видимому, исключительного присутствия 3'—5'-структуры были получены на основании исследований ферментативного гидролиза рибонуклеиновых кислот и простых нуклеотидных производных. Из различных источников был выделен ряд нуклеаз, которые катализируют гидролиз нуклеиновых кислот на более мелкие фрагменты. Панкреатическая рибонуклеаза [93] — один из группы ферментов, обнаруживающих высокую специфичность к рибонуклеиновым кислотам, — была тщательно изучена и дано объяснение механизма ее действия. Ранние исследования показали, что фермент действует по пиримидиннуклеозидным звеньям, так как крупные недиализуемые остатки после ферментативного расщепления рибонуклеиновой кислоты значительно обогащены пуринами [94]; кроме того, выделяются пиримидиновые мононуклеотиды, но не обнаружено свободных пуриновых мононуклеотидов [75, 95, 96]. Дальнейшие исследования кислотного или щелочного гидролиза продуктов, полученных в результате последовательной обработки рибонуклеиновой кислоты рибонуклеазой и фосфомоноэстеразой предстательной железы, привели к заключению, что специфичность рибонуклеазы такова, что нуклеиновые кислоты расщепляются ею с образованием смеси пиримидиновых мононуклеотидов и пуриновых олигонуклеотидов, содержащих в качестве концевой единицы пиримидиновый нуклеозид-2'(или 3')-фосфат [75, 97].



Фракционирование рибонуклеазных гидролизатов рибонуклеиновых кислот при помощи ионообменной хроматографии [98], электрофореза на бумаге и хроматографии на бумаге [99] полностью подтвердило вывод, основанный на изучении грубых смесей, и привело к исследованию свойств индивидуальных олигонуклеотидных компонентов. Кратковременная обработка рибонуклеазой (или инкубация в условиях диализа) показала, что первоначально в результате трансфосфорилирования образуются пиримидиновые нуклеозид-2',3'-циклофосфаты (и олигонуклеотиды с концевым 2',3'-циклофосфатом) [100] и что последующее действие фермента осуществляет гидролиз этих циклических фосфатов до соответствующей

шего 3'-фосфата. Обработка синтетических уридин-2',3'-циклофосфата и цитидин-2',3'-циклофосфата панкреатической рибонуклеазой в обоих случаях дает исключительно нуклеозид-3'-фосфат в результате однонаправленного расщепления эфирной связи $C_2' - O - P$; кроме того, отсутствие действия на аденозин-2',3'-циклофосфат и гуанозин-2',3'-циклофосфат свидетельствовало о специфичности фермента к пиримидиновым нуклеотидным производным [101]. Таким образом, исчерпывающая обработка рибонуклеиновой кислоты рибонуклеазой приводит к получению пиримидиновых нуклеозид-3'-фосфатов и олигонуклеотидных продуктов с концевой 3'-фосфатной группой. Щелочной гидролиз последних дает смесь 2'-



и 3'-фосфатов пуриновых нуклеозидов и 3'-фосфатов только пиримидиновых нуклеозидов. (Миграции моноэтерифицированного фосфата в щелочных условиях не происходит.) Специфическое действие рибонуклеазы, катализирующей образование пиримидиновых нуклеотидов из участков нуклеиновой кислоты с двумя или более соседними пиримидиновыми остатками и олигонуклеотидов из участков, где пуриновые нуклеотиды ограничены пиримидиновыми нуклеотидами, было показано в результате изучения ферментативного гидролиза простых эфиров мононуклеотидов. В то время как алкиловые (бензиловые, метиловые и этиловые) эфиры пиримидиновых нуклеозид-3'-фосфатов легко превращаются в свободные 3'-нуклеотиды через нуклеозид-2',3'-циклофосфаты, аналогичные эфиры пиримидиновых нуклеозид-2'-фосфатов (или пуриновых нуклеозид-2'- или нуклеозид-3'-фосфатов) совершенно не затрагиваются. Следовательно, в рибонуклеиновой кислоте все остатки пиримидиновых нуклеотидов соединены скорее через 3'-фосфатную, чем через 2'-фосфатную группу [87]. Наконец, применение нуклеазы селезенки, которая расщепляет рибонуклеиновую кислоту как на пуриновые, так и на пиримидиновые нуклеотиды, этерифицированные по 3'-гидроксильной группе без промежуточного образования нуклеозид-2',3'-цикло-

фосфатов [102—104], полностью определяет основную межнуклеотидную связь как связь 3'—5'. Специфичность этого фермента (и других из кишечника, картофеля и райграсса) была аналогичным образом установлена путем использования простых синтетических субстратов. Если цитидин-3'- и аденозин-3'-бензилфосфаты гидролизировались до соответствующих 3'-фосфатов, ферментные препараты не действовали на эфиры нуклеозид-2'-фосфатов [105].

Пока не получено определенного доказательства разветвления рибонуклеиновых кислот посредством триэтерификации фосфатных остатков или путем присоединения полинуклеотидных цепей к 2'-гидроксильным группам нуклеозидов первичной цепи. В основном и, вероятно, *in toto* рибонуклеиновые кислоты представляют собой линейные полимеры мононуклеотидов, соединенных посредством 3'—5'-фосфодиэфирных связей.

Определения молекулярного веса рибонуклеиновых кислот часто приводили к противоречивым результатам, отчасти из-за того, что размер молекулы сильно зависит от предварительной обработки. Последнее может приводить не только к низким значениям молекулярного веса (в результате ферментативного или химического разрыва ковалентных связей), но также к обманчиво высокому молекулярному весу (в результате агрегации отдельных линейных цепей). Помимо изменения нуклеиновых кислот, связанного с экстракцией, внутри живой клетки, несомненно, наблюдаются значительные вариации длины цепей рибонуклеиновых кислот с различными биологическими функциями; непосредственная экстракция дает поэтому сложную смесь. Молекулярный вес рибонуклеиновых кислот колеблется приблизительно от 15000 (соответствующего примерно 50 нуклеотидам) до $2,1 \cdot 10^6$. Последнее значение отмечено для свежее выделенной рибонуклеиновой кислоты из вируса табачной мозаики и соответствует длине цепи приблизительно в 6000 нуклеотидов, так как нуклеиновая кислота существует, по-видимому, в виде одиночной свернутой цепи [106]. Большинство коммерческих препаратов рибонуклеиновой кислоты из дрожжей после очистки имеют среднюю длину цепи примерно 6 или 7 нуклеотидов.

СПОСОБ ДЕЙСТВИЯ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ

Панкреатическая рибонуклеаза (IA) широко изучена; это фермент относительно низкого молекулярного веса (13683), значительная часть молекулы которого может быть удалена перевариванием карбоксипептидазой [107] или пепсином [108] с сохранением ферментативной активности. Однако карбоксиметилирование одной гистидиновой группы (в имидазольной части) вызывает полную потерю активности [109]; этот гистидин, как точно установлено, является ближайшим к С-концу молекулы рибонуклеазы [110, 111].

Последовательность аминокислот в ферменте фактически расшифрована [112—115]. Дальнейшее исследование позволило предположить, что остатки № 119 (гистидин), 121 (аспарагиновая кислота), 15 (аспарагин) и 41 (лизин) — все находятся в активном центре или близко от него [116]. Искусственно вызванная микрогетерогенность рибонуклеазы может быть следствием различий скорее во вторичной и третичной структуре, чем в первичной последовательности аминокислот [117].

Представлены данные гидролиза полиадениловой и полиинозиновой кислот до мононуклеотидов большими количествами рибонуклеазы [118]. Возможность неферментативного катализа в этом случае полностью не исключена *. Подобные результаты были отмечены для пуринсодержащих олигонуклеотидов, которые при использовании обычных методов устойчивы к панкреатической рибонуклеазе [119]. В подходящих условиях фермент обнаруживает «синтетическую» активность. Помимо полимеризации нуклеозид-2',3'-циклофосфатов, рибонуклеаза может катализировать образование 3'-алкиловых эфиров при соответствующей обработке уридин-2',3'-циклофосфата рибонуклеазой и первичными спиртами. Вторичные и третичные спирты здесь не эффективны, как и в случае химической реакции с алкохолятами натрия [120].

Специфичность панкреатической рибонуклеазы по отношению к эфирам пиримидиновых рибонуклеозид-3'-фосфатов обсуждалась выше. Дальнейшее определение структурных требований к субстрату было получено при изучении действия фермента на широкий ряд производных, некоторые из которых представлены в табл. 6-1.

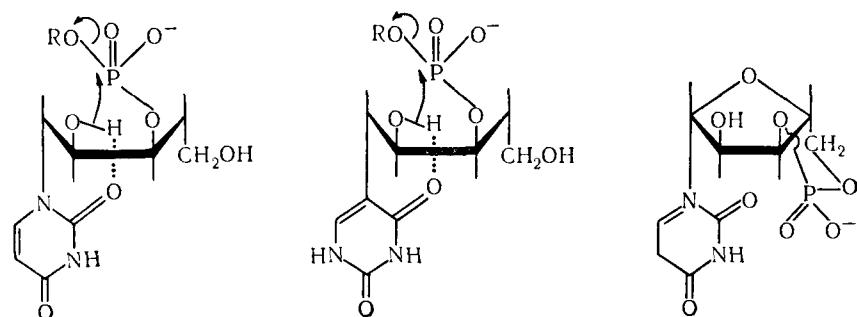
Приведенные в табл. 6-1 результаты позволяют предположить, что специфичность обусловлена присутствием и расположением функциональных групп, обнаруженных лишь в пиримидиновых производных, в соответствии с постулатом [125], согласно которому образование водородной связи между карбонильным кислородом при атоме С₂ пиримидинового кольца и 2'-гидроксильной группой сахара усиливает нуклеофильный характер этой гидроксильной группы (и может вполне объяснить любые различия в конформации сахара в пуриновых нуклеозидах по сравнению с пиримидиновыми нуклеозидами), облегчая таким образом нуклеофильную атаку атома фосфора и образование нуклеозид-2',3'-циклофосфата. (Некоторым подтверждением этой концепции может служить большая устойчивость к химическому гидролизу пуриновых полинуклеотидов по сравнению с пиримидиновыми полинуклеотидами.) Циклическая система пиримидинового кольца, по-видимому, необходима для сохранения стереохимических возможностей взаимодействия,

* Расщепление поли-8-азагуаниловой кислоты [571] дает убедительный пример более широкой специфичности панкреатической рибонуклеазы.

поэтому эфиры 3'-фосфатов рибофуранозилуреидопроепоиновой кислоты оказываются устойчивыми к ферментативной атаке, а дигидропиримидиновые производные — нет. Кинетические исследования ряда субстратов подтверждают такой механизм и показывают также, что природа алкильного компонента в эфирах пиримидиновых нуклеозид-3'-фосфатов может оказывать заметное влияние [561]. Так, в ряду ЦфА, ЦфГ, ЦфЦ и ЦфУ (где ф представляет 3'—5'-межнуклеотидную связь слева направо, а А, Ц, Г и У — соответствующие рибонуклеозиды) скорости гидролиза находятся в соотношении 3000 : 500 : 240 : 27. Это может быть следствием π-электронного взаимодействия между основаниями, так как увеличение поляри-

Таблица 6-1

Соединение	Ферментативный гидролиз	Литература
Метил-α(или β)-рибофуранозил-2',3'-циклофосфат	—	121
Этиленгликоль-1,2-циклофосфат	—	122
Полиглицерофосфат	—	123
Эфиры нуклеозидов и рибозо-3-фосфата	—	124
Эфиры нуклеозидов и рибит-3-фосфата	—	124
Эфиры 3'-фосфата рибофуранозилуреидопроепоиновой кислоты	—	125
Уридин-2',3'-циклофосфат-5'-пирофосфат	+	126
5'-Дезоксиуридин-2',3'-циклофосфат	+	18
5'-О-Метансульфонуридин-2',3'-циклофосфат	+	127
5'-Бром-5'-дезоксиуридил-3':5'-аденозин	+	127
Поли-5'-тиоуридилловая кислота	+	127
2-Тиоуридилловая кислота, связанная межнуклеотидной связью	+	128
5-Метилуридин-2',3'-циклофосфат	+	129, 130
Поли-5-метилуридилловая кислота	+	131
5-Галогенуридин-2',3'-циклофосфат	+	130, 132
Поли-5-хлор(бром или иод)уридилловая кислота	+	132
Эфиры 4,5-дигидроуридин-3'-фосфата	+	125
Поли-4,5-дигидроуридилловая кислота	+	133
Псевдоуридин-2',3'-циклофосфат	+	129, 130
Полипсевдоуридилловая кислота	+	134
N ⁶ -Ацетилцитидин-2',3'-циклофосфат	+	18
N ¹ -Метилуридин-3'-метилфосфат	—	135
Поли-N ¹ -метилуридилловая кислота	—	132, 133
Уридин-3',5'-циклофосфат	—	136
Цитидин-3',5'-циклофосфат	—	136



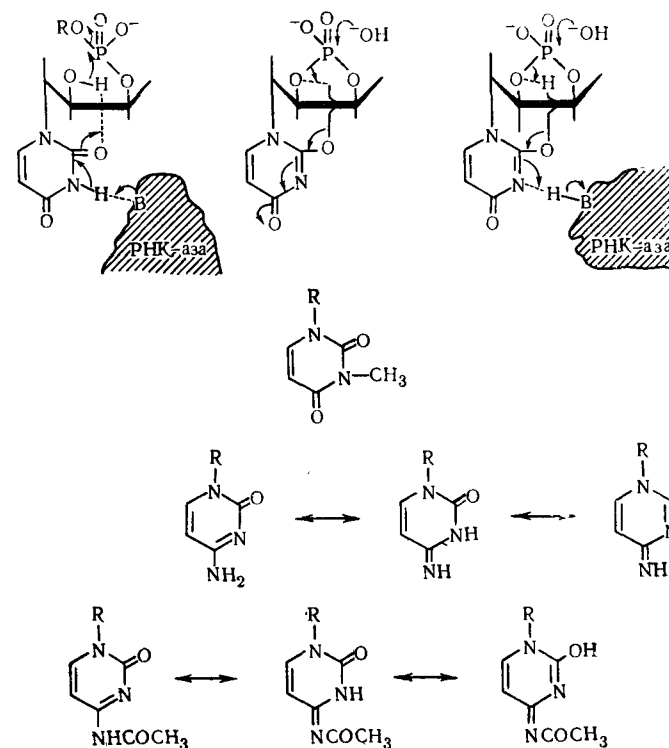
зуюмости и нуклеофильного характера цитидинового остатка зависит от степени взаимодействия [561].

В соответствии с механизмом производные ψ -уридина являются субстратами рибонуклеазы, так как в этом нуклеозиде карбонильный кислород также благоприятно расположен по отношению к 2'-гидроксильной группе [137—139]. В уридин-3',5'- и цитидин-3',5'-циклофосфатах необходимые структурные элементы в отношении агликона присутствуют, но в этих случаях нуклеофильная атака 2'-гидроксильной группой атома фосфора эфира 3'-фосфата становится невозможной как результат стереохимии 3',5'-циклофосфатной группы [136].

Ферментативной атаке также содействует, возможно, отдача электронов ферментом пиримидиновому кольцу посредством частичного или полного оттягивания протона [139]. Подобным же образом оттягивание электронов от таутомерной формы пиримидинового нуклеозид-2',3'-циклофосфата ферментом может определить как направление расщепления до 3'-фосфата, так и содействие этому расщеплению. Механизм такого рода получает некоторое подтверждение на примере поведения производных N^1 -метилуридина и N^6 -ацетилцитидина.

Был выдвинут несколько отличный механизм действия панкреатической рибонуклеазы, затрагивающий два гистидиновых остатка под номером 119 и 48 (или 105) [140]. По существу, он представляет собой перемещение протона от одного имидазольного остатка к другому, как схематически изображено на стр. 384.

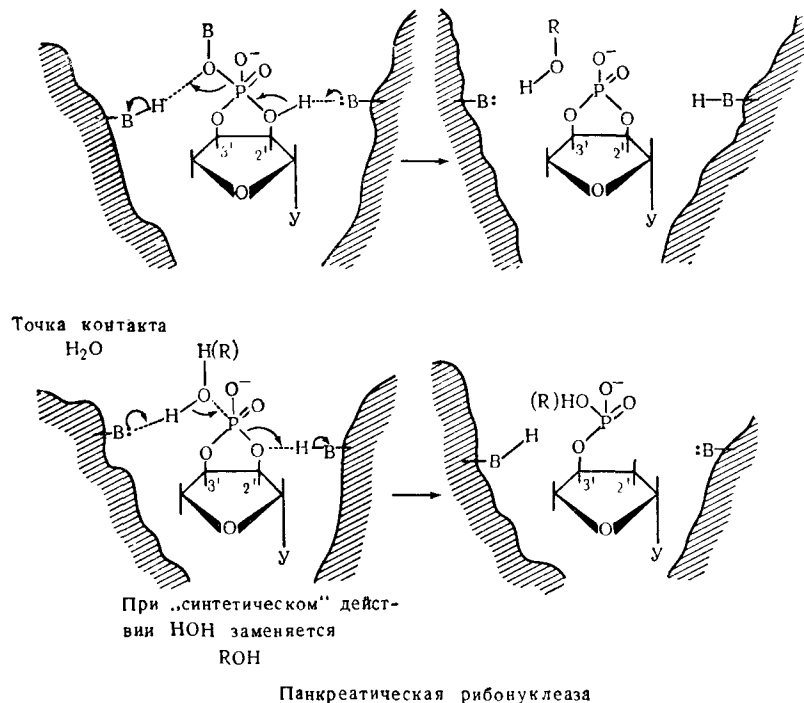
Следует заметить, что в этой схеме предполагается «активация» молекул воды, так же как и молекул органического субстрата. Гипотетический механизм в общих чертах может быть применен для объяснения действия ряда диэстераз (рибонуклеаза из такадиастазы, диэстеразы селезенки) на РНК (гидролиз до 3'-фосфатов без промежуточного образования 2',3'-циклофосфата) и на 2',3'-циклофосфаты (с образованием нуклеозид-2'-фосфатов), а также действия диэстеразы змеиного яда на полинуклеотиды (с образованием нуклеозид-5'-



фосфатов) и действия моноэстераз. Возможно, имеет место образование пятиковалентных фосфатных переходных состояний, хотя они не отмечены на схемах. Необходимо также помнить о различных допустимых для фосфатной группы резонансных структурах.

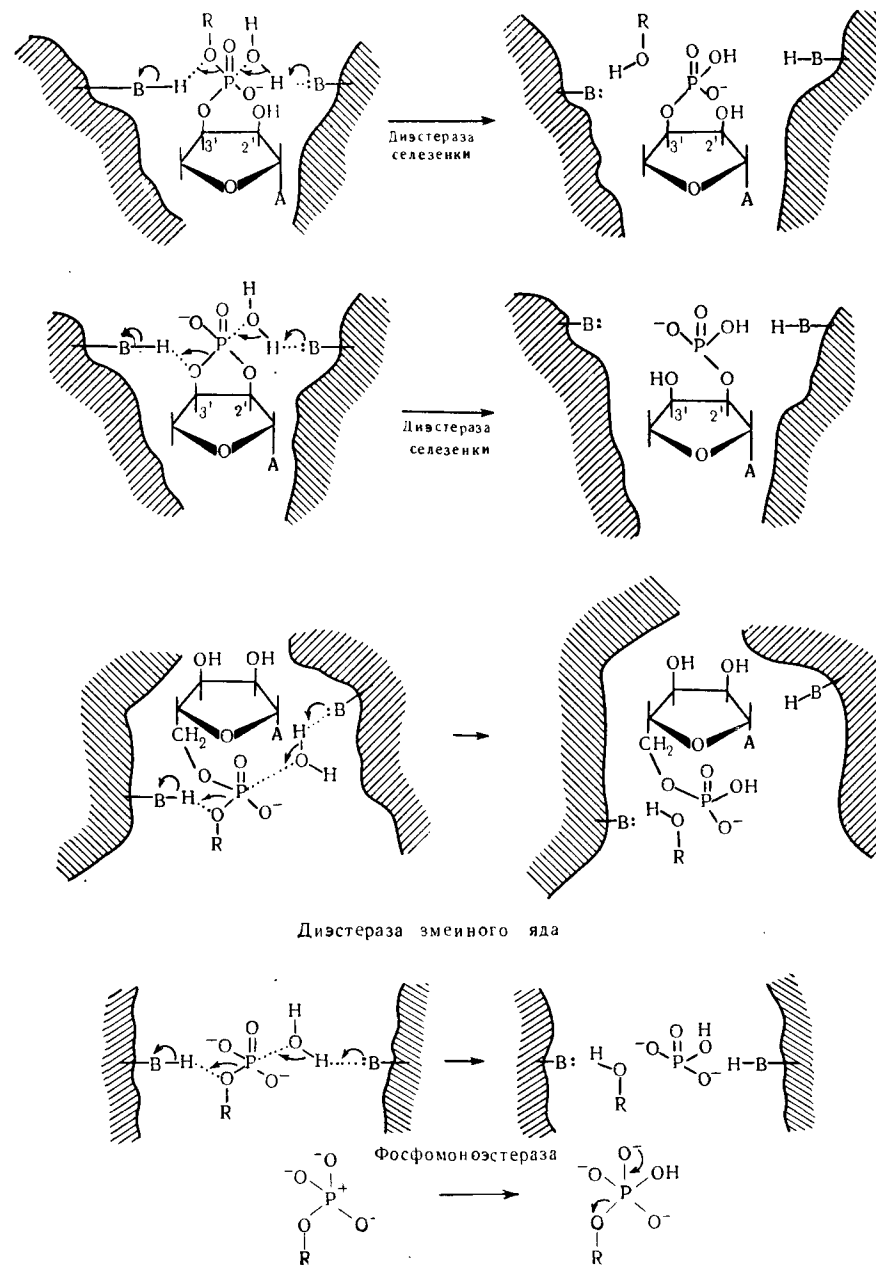
Субстратная специфичность заключается в доступности точек контакта в белке для пиримидиновых или пуриновых оснований; специфическое действие (расщепление связи 3' — О — Р или 5' — О — Р) состоит не во внутримолекулярном образовании водородных связей в субстрате, а в нуклеофильной атаке на определенную сторону атома фосфора (определяемую конформацией фермента и расположением точки контакта воды), обеспечивающей вытеснение определенной группы с противоположной стороны. На схемах специфичность субстрата указывается наклоном контуров фермента. Общая схема предполагает, что панкреатическая рибонуклеаза может обладать очень низкой активностью по отношению к пуриновым производным. Далее, рассмотрение химии диэфиров и моноэфи-

ров фосфорной кислоты позволяет предположить, что, возможно, существуют диэстеразы, полностью свободные от моноэстеразной активности, но все моноэстеразы могут обладать некоторой, очень слабой диэстеразной активностью не в результате загрязнения,



а вследствие свойства, присущего последовательности аминокислот в действующем участке моноэстеразы. В случае фосфомоноэстераз, которые могут действовать как трансферазы, точка контакта воды занята, по-видимому, спиртом; с другой стороны, можно предположить прямую нуклеофильную атаку имидазольным остатком в ферменте с образованием промежуточного фосфоамидного производного, которое затем претерпевает дальнейшее превращение.

Как указано, панкреатическая рибонуклеаза катализирует две реакции (обратимое трансфосфорилирование с образованием 2',3'-циклофосфата и необратимый гидролиз этого циклического фосфата), хотя с совершенно различными скоростями. Более четкого разделения этих активностей с точки зрения субстратной специфичности не отмечено. Концентрированные растворы мочевины способны осуществлять разделение, но причины этого совершенно неясны [141]. (Фермент активен в присутствии таких денатурирующих



агентов, как 8М раствор мочевины; под влиянием рибонуклеиновой кислоты белок, по-видимому, приобретает вновь активную конформацию [142].) В присутствии достаточных концентраций ингибиторов-поликислот инактивации ферментативного трансфосфорилирования (с образованием циклофосфатов и разрывом полинуклеотидной цепи) не происходит, в то время как гидролиз нуклеозид-2',3'-циклофосфатов до 3'-фосфатов затормаживается [143, 144]. (РНК, как полианион, является, возможно, лучшим конкурентом за фермент, чем мономерный циклический фосфат.)

Так как при ферментативном гидролизе нуклеозид-2',3'-циклофосфатов не происходит инверсии при атоме C_2' , разрыв связи $C-O$ маловероятен. При проведении гидролиза соответствующих субстратов в присутствии H_2O^{18} было получено подтверждение разрыва рибонуклеазой и диэстеразой селезенки связи $P-O$, т. е. атаки скорее на атом фосфора, чем на атом углерода [145].

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ* И КОНЦЕВЫЕ ГРУППЫ

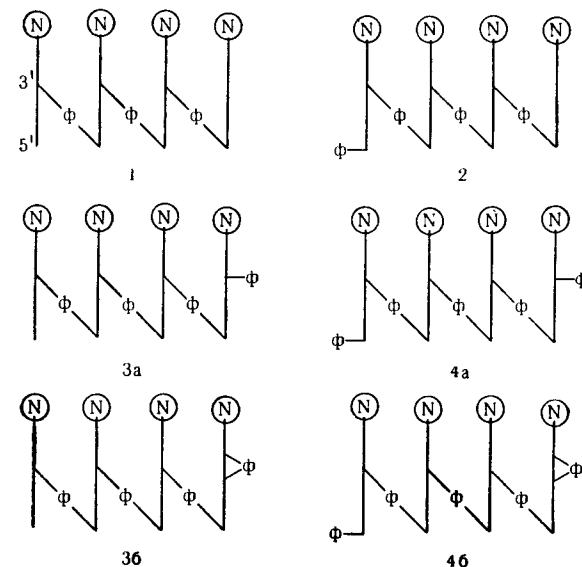
С признанием по крайней мере некоторых биологических функций рибонуклеиновых кислот возникло представление о том, что порядок расположения различных нуклеотидных звеньев имеет особое значение, как и в случае белков и полипептидов. Экспериментальное определение этой последовательности представляет собой главную проблему сегодняшнего дня; пока же наибольший фрагмент из природной рибонуклеиновой кислоты, структура которого установлена с определенностью, имеет длину меньше десяти нуклеотидов**. Вследствие относительно небольшого числа разновидностей мономеров, участвующих в образовании молекулы нуклеиновой кислоты, методы, включающие частичную деградацию рибонуклеиновых кислот до малых полинуклеотидов с последующим разделением, анализом последовательности и реконструкцией исходной цепи посредством специфического наложения, подвержены довольно строгим ограничениям. Присутствие в нуклеиновой кислоте небольших количеств минорных нуклеотидов и щелочеустойчивых межнуклеотидных связей должно до некоторой степени содействовать этому при таком подходе. Ступенчатая деградация самой рибонуклеиновой кислоты, может быть, и осуществима, если говорить о нуклеиновой кислоте, содержащей 50—100 нуклеотидов; но анализ последовательности немногих известных гомогенных препаратов

* Обзоры по химической модификации нуклеиновых кислот с целью определения нуклеотидной последовательности см. Кочетков Н. К., Будовский Э. И., сб. «Молекулярная биология (проблемы и перспективы)», изд. «Наука», М., 1964, стр. 139; Кочетков Н. К., J. Sci. Industr. res., 23, 373 (1964).— Прим. ред.

** См. примечание редактора на стр. 395.

представляет собой огромные технические трудности. В дополнение к этим препятствиям задача очистки и разделения грубых смесей полинуклеотидов на однородные по молекулярному весу фракции полностью не решена, хотя в этом направлении достигнуты значительные успехи. До тех пор, пока не станут доступными совершенно гомогенные препараты, нельзя достичь большого успеха в определении первичной структуры нуклеиновых кислот. Тем не менее эти проблемы, без сомнения, будут решены, и ряд разрабатываемых в настоящее время методов, как, например, радиоактивная метка концевых групп для повышения чувствительности их обнаружения, облегчит их разрешение.

Хотя мало известно о действительном порядке расположения нуклеотидов в рибонуклеиновых кислотах и могут существовать иные, чем все возможные, бинарные комбинации, имеются методы для определения относительного распределения нуклеотидов и небольших олигонуклеотидных участков внутри цепи; значительные различия в таком распределении обнаружены в рибонуклеиновых кислотах из вирусов различных растений. Кроме того, имея достаточно гомогенный полинуклеотид, можно относительно простыми способами охарактеризовать его концевые группы; количественное определение этих концевых групп по отношению к общему содержанию мононуклеотидов дает длину цепи. Сопоставление последней с молекулярным весом, определенным физическими методами, приводит к установлению числа тяжей в данном макромолекулярном



агрегате. Более прямым путем число цепей можно определить, изучая кинетику начальных этапов ферментативного распада.

Хотя нуклеиновые кислоты могут иметь на концах молекулы 3'- или 5'-фосфатную группу [146] и, следовательно, могут рассматриваться как полимеры нуклеозид-3'- или нуклеозид-5'-фосфатов (это различие почти не имеет практической ценности), не существует никаких прямых данных о механизме биосинтетического контроля за длиной цепи и нельзя игнорировать другие возможности. Если не учитывать возможные концевые компоненты ненуклеотидной природы, то нуклеиновые кислоты можно отнести к одному из следующих четырех типов: 1) без концевого фосфата, 2) с 5'-фосфатом на конце, 3) с 3'-фосфатом (или 2',3'-циклофосфатом) на конце и 4) с фосфатными остатками на каждом (5' и 3') из концов молекулы. Нуклеиновая кислота одного типа может превращаться в нуклеиновую кислоту другого типа путем соответствующего ферментативного вмешательства *in vivo* или в процессе выделения.

Левый конец каждой из помещенных выше схем нуклеиновых кислот обозначим как головное звено, а нуклеозидную компоненту справа — как хвостовое звено. Из рассмотрения описанных выше механизмов очевидно, что хотя при щелочном гидролизе цепь разрывается с образованием нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфатов, в случае нуклеиновой кислоты первого типа хвостовое звено появляется в виде свободного нуклеозида, второго типа — головное звено освобождается в виде нуклеозид-2',5'- и нуклеозид-3',5'-дифосфатов, а хвостовое звено — в виде нуклеозида, в то время как из нуклеиновой кислоты четвертого типа головное звено освобождается в виде нуклеозид-2',5'- и нуклеозид-3',5'-дифосфатов, но не образуется свободного нуклеозида. Нуклеиновая кислота третьего типа дает исключительно нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфаты. Ферментативный гидролиз диэстеразой селезенки (специфичной для эфиров нуклеозид-3'-фосфатов) привел бы к тем же результатам. Однако при применении диэстеразы змеиного яда (специфичной для эфиров нуклеозид-5'-фосфатов) можно получить дополнительную информацию. Так, в случае рибонуклеиновой кислоты первого типа из головного звена получается нуклеозид, а из остальной части цепи — нуклеозид-5'-фосфаты; из нуклеиновой кислоты второго типа

Тип	(1)		(2)		(3)		(4)	
	«го-лова»	«хвост»	«го-лова»	«хвост»	«го-лова»	«хвост»	«го-лова»	«хвост»
Щелочь	—	+	+	+	—	—	+	—
Диэстераза яда	+	—	—	—	+	+	—	+

образуются исключительно нуклеозид-5'-фосфаты; головное звено нуклеиновой кислоты третьего типа дает нуклеозид, а хвостовое — нуклеозид-3'(2'),5'-дифосфат; хвостовое звено нуклеиновой кислоты четвертого типа образует нуклеозид-3'(2'),5'-дифосфат. Поэтому применением комбинации щелочного гидролиза и гидролиза диэстеразой змеиного яда можно определить головное и хвостовое нуклеотидные звенья, а также установить тип полинуклеотида.

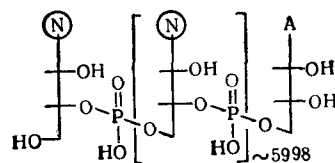
Как упоминалось выше, длину цепи полинуклеотида можно определить количественным определением концевых звеньев. В случае некоторых небольших полимеров гидролиз концевого фосфата (фосфатов) под действием очищенной фосфомоноэстеразы дает независимую оценку длины цепи из соотношения количества общего фосфора к количеству фосфора, выделенному в виде неорганического фосфата; исследование оставшегося полинуклеотида уточняет природу концевых звеньев. Применение такого рода методов до некоторой степени ограничено высокой степенью чистоты, необходимой для применяемых ферментов, и изменением активности моноэстераз (и диэстераз) с изменением длины цепи полимера. Однако нуклеиновые кислоты второго и третьего типов все же были обнаружены (хотя и в гетерогенных смесях рибонуклеиновых кислот), причем нуклеиновые кислоты последнего типа, возможно, возникли главным образом в результате процессов расщепления [92].

Изучение продуктов щелочного гидролиза транспортной РНК из печени кролика обнаружило цепи длиной приблизительно 100 нуклеотидов, содержащие в качестве концевых звеньев гуанозин-5'-фосфат и аденозин [147]. Для соответствующей РНК из печени крысы отмечена более короткая длина цепи (приблизительно 40 нуклеотидов), но и в этом случае при щелочном гидролизе наблюдалось образование, кроме смеси нуклеозид-2'(3')-фосфатов, нуклеозидов (главным образом аденозина и гуанозина) и гуанозин-2'(3'),5'-дифосфата в эквивалентном нуклеозидам молярном количестве [148]. Концевыми звеньями растворимой РНК из *Escherichia coli* также оказались гуанозин-5'-фосфат и аденозин [149]. На основании данных диффузионного и седиментационного анализа молекулярный вес этой РНК равен 35 000, но анализ продуктов гидролиза указывает на длину цепи приблизительно 62 нуклеотида, т. е. на молекулярный вес примерно 18 500. Интересно, что специфичная для фенилаланина РНК из *Escherichia coli* не имеет на конце гуанозин-5'-фосфата, так как при щелочном гидролизе не обнаружен гуанозин-2'(3'),5'-дифосфат [147]. Аналогичные результаты получены для «растворимой» РНК из зародышей пшеницы, но в этом случае количество гуанозин-2'(3'),5'-дифосфата по сравнению с количеством аденозина значительно меньше [150]. Щелочной гидролиз «нерастворимой» (в 3 М растворе NaCl) РНК из зародышей пшеницы дает все четыре классических нуклеозида в количествах, указывающих

на среднюю длину цепи 1200 нуклеотидов, т. е. на средний молекулярный вес приблизительно $4 \cdot 10^5$.

Для рибонуклеиновой кислоты из вируса табачной мозаики данных о наличии концевой 5'-фосфата не получено [151], хотя с некоторыми вирусными препаратами и могут быть ассоциированы короткие полинуклеотидные цепи, несущие на конце 5'-фосфомоноэфирную группу [152].

Периодатное окисление рибонуклеиновых кислот, содержащих концевой нуклеозид, этерифицированный только по 5'-гидроксильной группе, дает соответствующий диальдегид. Обработка последнего S^{35} -тиосемикарбазидом в водном растворе представляет чувствительный метод обнаружения концевых нуклеозидных остатков [153]. Такого рода остатков не обнаружено в рибонуклеиновых кислотах из вируса табачной мозаики и желтой мозаики турнепса [153]. Хотя при применении процедуры такого рода к рибонуклеиновой кислоте из вируса табачной мозаики до и после обработки ее моноэстеразой предстательной железы не получено отчетливых стехиометрических соотношений, результаты указывают на то, что по крайней мере какой-то из концевых моноэтерифицированных фосфатов расположен при 3' (или 2')-гидроксильной группе [154]. На основании количества неорганического фосфата, освобождающегося из меченного P^{32} вируса, можно предположить, что каждая цепь содержит скорее один концевой фосфат, чем два. Однако более поздние данные указывают на то, что инфекционная нуклеиновая кислота не имеет концевой фосфомоноэфирной группы и что концевые группы такого рода возникают в результате разрыва полинуклеотидных цепей [155]. Учитывая, что эти цепи содержат около 6000 нуклеотидов, можно оценить те трудности, которые связаны с такого рода исследованиями. Щелочной гидролиз меченной C^{14} РНК из вируса табачной мозаики приводит к образованию 1 моля аденозина на цепь, но не дает значительных количеств нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфата, что позволяет предположить для РНК окончательную структуру *, приведенную ниже, несмотря на уже упомянутые данные по периодатному окислению [156, 556].



* Данные по ферментативному гидролизу РНК указывают на то, что концевой аденозин связан с пиримидиновым нуклеотидом [572].

Метанолиз РНК (катализируемый метокси-ионами) служит подходящим методом определения концевых звеньев, несущих 2'- или 3'-фосфатную группу [157]. В то время как из внутренних диэтерифицированных межнуклеотидных связей образуются метиловые эфиры нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфатов, концевая группа не изменяется и выделяется в виде свободного нуклеотида (без миграции фосфата). Метанолиз аденозин-2'-диметилфосфата дает аденозин в противоположность щелочному гидролизу такого рода соединений. Метод был применен для изучения РНК из печени теленка и продажного препарата дрожжевой РНК.

Разработан способ метки концевых 5'-фосфомоноэфирных групп, заключающийся в обработке РНК (или ее рибонуклеазных гидролизатов) диизопропилкарбодиимидом и анилином (меченным C^{14}) [564]. Концевые 5'-фосфатные группы превращаются в фосфоанилиды (концевые 3'-фосфатные группы превращаются в 2',3'-циклофосфатные), которые можно обнаружить после ферментативной деградации поли(или олиго)нуклеотидов (для обогащения устойчивой к такой деградации меченой нуклеотидной фракции) и фракционирования на ДЭАЭ-целлюлозе. Результаты, полученные при изучении транспортной РНК, указывают на то, что хотя большинство цепей оканчиваются гуанозин-5'-фосфатом, в виде концевых звеньев присутствуют также аденозин-5'- и уридин-5'-фосфаты; в случае нерасфракционированной РНК наблюдается большое разнообразие в смежных с ними нуклеотидах. Метод, по-видимому, применим также к полидезоксинуклеотидам.

Специфическое действие панкреатической рибонуклеазы также позволяет установить природу концевых групп. В дополнение к присутствующим в рибонуклеазных гидролизатах дрожжевой рибонуклеиновой кислоты пиримидиновым нуклеозид-3'-фосфатам и олигонуклеотидам из этих гидролизатов выделены пять нуклеозидов (аденозин, цитидин, гуанозин, псевдоуридин и уридин), указывая «хвостовые» нуклеозидные звенья, этерифицированные через 5'-гидроксильную группу 3'-фосфатом пиримидинового нуклеотида.

Среди более крупных фрагментов, при щелочном гидролизе которых образуются нуклеозиды, идентифицированы аденилил-3' : 5'-уридин и аденилил-3' : 5'-цитидин, которые, подобно приведенному выше, указывают таким образом концевые (хвостовые) части полинуклеотидных цепей [158]. Та же нуклеиновая кислота при щелочном гидролизе образует небольшие количества нуклеозидов и нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфатов; ясно, что она состоит в основном из ряда полинуклеотидов второго типа. В рибонуклеазных гидролизатах РНК обнаружены также аденозин-2',3'- и гуанозин-2',3'-циклофосфаты [158, 159]. По-видимому, они представляют собой хвостовые концевые звенья полинуклеотидов третьего или четвер-

того типа или же возникают в результате действия примесей рибонуклеаз различной специфичности.

Обработка рибонуклеазой транспортной РНК, меченной аминокислотой, дает 2'(3')-аминоацильный эфир аденозина, из которого щелочным гидролизом в мягких условиях легко получить свободный нуклеозид [434]. Такая концевая группа обнаружена также в транспортной РНК из клеточного ядра [160].

Значительную ценность представляют собой рибонуклеазы высокой специфичности, так как они не только расщепляют нуклеиновую кислоту на олигонуклеотиды, которые во многих случаях можно разделить и определить их структуру, но и указывают также в общем распределение нуклеотидов. Так, обнаружено, что порция пиримидиновых нуклеозид-3'-фосфатов (по отношению к общему содержанию пиримидинов в нуклеиновой кислоте), выделяющихся под действием панкреатической рибонуклеазы, в значительной степени варьирует. При известной специфичности фермента высокий процент выделения свободных пиримидиновых нуклеотидов по отношению к общему содержанию пиримидинов указывает на наличие участков цепи, в которых два или более пиримидинов следуют подряд друг за другом, в то время как выделение мононуклеотидов в относительно малом количестве указывает на то, что пиримидиновые нуклеотиды в основном соединены (через 5'-гидроксильную группу) с 3'-фосфатами пуриновых нуклеотидных звеньев. В этой связи представляет интерес факт, что из растворимых в солевом растворе дрожжевых нуклеиновых кислот выделяется около 50% цитидиловой, уридиловой и псевдоуридиловой кислот в расчете на общее содержание каждой из них и только 10—20% тиминовых нуклеотидов [161]. Из рибонуклеиновой кислоты вируса табачной мозаики штамма М после исчерпывающего переваривания панкреатической рибонуклеазой выделено значительно большее количество пиримидиновых нуклеотидов, чем в случае штаммов TMV, HR и YA; следовательно, распределение пиримидиновых нуклеотидов в РНК из штамма М отличается от распределения нуклеотидов в РНК штаммов TMV, HR или YA [162] (ср. с приведенными ниже данными).

Электрофорез на бумаге с последующей хроматографией на бумаге представляет удобный метод разделения присутствующих в рибонуклеазных гидролизатах нуклеотидов и олигонуклеотидов (вплоть до тетра- и пентануклеотидов) [163]. Разделение, идентификация и количественное определение этих фрагментов дает некоторую информацию о природе и частоте повторения нуклеотидов в различных рибонуклеиновых кислотах. Хотя все возможные бинарные комбинации действительно имеют место, фактическое распределение нуклеотидов далеко не беспорядочно. В продуктах расщепления панкреатической рибонуклеазой нуклеиновых кислот из вируса табачной

мозаики между штаммами М и TMV значительных количественных различий не обнаружено, но между штаммом HR и двумя первыми имеются некоторые поразительные отличия, что указывает на измененный характер нуклеотидной последовательности [164, 165].

Недавно исследованы рибонуклеазы, имеющие даже большую специфичность, чем основной компонент кристаллического фермента из поджелудочной железы. Две рибонуклеазы из «такадиастазы Sankyo» представляют особый интерес в том отношении, что их действие комплементарно действию панкреатической рибонуклеазы [166]*. Так, например, рибонуклеаза T1 специфична для эфиров гуанозин-3'-фосфата, т. е. она катализирует разрыв межу-нуклеотидных связей между остатком гуанозин-3'-фосфата и 5'-гидроксильной группой соседнего нуклеотида, происходящий с промежуточным образованием гуанозин-2',3'-циклофосфатных остатков [167, 168]. Конечным продуктом гидролиза дрожжевой рибонуклеиновой кислоты является гуанозин-3'-фосфат (около 40% общего содержания гуанина) и олигонуклеотиды с гуанозин-3'-фосфатом на конце. Как и в случае панкреатической рибонуклеазы, стадия трансфосфорилирования обратима [169, 170] и фермент катализирует как полимеризацию гуанозин-2',3'-циклофосфата до олиго-, возможно, полигуаниловой кислот, так и трансфосфорилирование 5'-гидроксильной группы нуклеозидов (с образованием динуклеозидфосфатов, таких, как гуанилил-3': 5'-уридин и гуанилил-3': 5'-аденозин), нуклеозид-3'-фосфатов и нуклеозид-2',3'-циклофосфатов. Чрезвычайно высокая специфичность рибонуклеазы T1 была продемонстрирована на примере гидролиза нуклеазой транспортной РНК с последующим ферментативным удалением концевых моноэтерифицированных фосфатных групп и щелочным гидролизом смеси [171]. Все гуаниновые нуклеотиды были обнаружены в виде гуанозина (следовательно, разрываются все гуанилил-3': 5'-связи), тогда как производные метилированного гуанина (1-метилгуанина и 2-диметиламино-6-оксипурина) выделяются в виде нуклеотидов (как и производные аденина и пиримидиновых оснований), указывая таким образом, что 3',5'-фосфодиэфирные связи в этих соединениях устойчивы к ферментативному гидролизу рибонуклеазой T1.

В противоположность рибонуклеазе T1 рибонуклеаза T2 расщепляет межу-нуклеотидные связи между звеном аденозин-3'-фосфата и 5'-гидроксильной группой смежного нуклеотида с образованием олигонуклеотидов с аденозин-3'-фосфатным остатком на конце и аденозин-3'-фосфата (из участков с рядом стоящими адениловыми

* Об использовании специфических РНК-аз для определения нуклеотидной последовательности в индивидуальных РНК см. Holler R. W. et al., Science, 147, 1462 (1965).— Прим. ред.

нуклеотидами) [172]. При гидролизе этим ферментом дрожжевой рибонуклеиновой кислоты моонуклеотиды выделяются в очень малых количествах в противоположность большим количествам гуаниловой кислоты, выделяемым РНК-азой Т1. Таким образом, распределение этих двух нуклеотидов в нуклеиновой кислоте, по-видимому, совершенно различно. Хотя в гидролизатах РНК рибонуклеазой Т2 не обнаружено промежуточного образования аденозин-2',3'-циклофосфатных остатков (в виде моонуклеотидов или концевых звеньев олигонуклеотидов), фермент гидролизует циклофосфат до аденозин-3'-фосфата, а также катализирует трансфосфорилирование с образованием олигоадениловых кислот. В подходящих условиях реакции полимеризации могут быть, вероятно, сведены до минимума, и вполне вероятно, что рибонуклеазы из такадиастазы, кроме применения их для изучения распределения нуклеотидов в рибонуклеиновых кислотах, окажутся полезными при определении структуры олигорибонуклеотидов.

При обработке РНК вируса табачной мозаики РНК-азой Т1 освобождается в виде моонуклеотида около 26,9% общего содержания гуанина; таким образом, такое количество гуаниловых нуклеотидов содержится (как полагают) в нуклеиновой кислоте в виде участков из двух или более гуаниловых остатков [173]. Образуются также ди-, три- и тетрануклеотиды с гуанозин-3'-фосфатом на конце. Однако независимое определение гуанозин-3'-фосфата и гуанозин-2',3'-циклофосфата, выделяющихся при действии очищенной РНК-азы Т1 на РНК вируса табачной мозаики, показало, что освобождается около 55,7% общего содержания гуанина * (по сравнению с теоретическим значением 24,0% при расчете на беспорядочное распределение оснований) [174]. При подобной обработке дрожжевой РНК выделяется 48,7% общего содержания гуанина; при беспорядочном распределении оснований надо ожидать только 27,5%. Однако приводится также значительно более низкая величина процента выделения [559]. Фракционирование на ЭКТЕОЛА-целлюлозе пуриновых олигонуклеотидов (содержащих на конце пиримидиновый нуклеотид) из гидролизатов РНК панкреатической рибонуклеазой показало, что продукты более высокого молекулярного веса особенно богаты остатками гуаниловой кислоты, т. е. действительно имеются цепочки из остатков гуаниловой кислоты [175].

Распределение остатков адениловой кислоты в РНК вируса табачной мозаики было определено путем количественного анализа продуктов, образующихся в результате комбинированного действия панкреатической рибонуклеазы и рибонуклеазы Т1 из такадиастазы. Исходя из известной специфичности этих ферментов, гидролиз РНК можно выразить в общем виде следующим образом: РНК $\rightarrow$ ЦЗ'ф +

* В работе [567] приведено иное значение — 19%.

+ УЗ'ф + ГЗ'ф + (АЗ'ф)_n 5'ЦЗ'ф + (АЗ'ф)_n 5'УЗ'ф + (АЗ'ф)_n 5'ГЗ'ф, причем продуктам в интактной нуклеиновой кислоте предшествуют в каждом случае ЦЗ'ф, УЗ'ф или ГЗ'ф. Как утверждают, в нуклеиновой кислоте вируса около 56,6% адениновых нуклеотидов (к общему содержанию аденина) присутствует в виде одиночных звеньев (19,1% в виде АфЦф, 19,6% в виде АфУф, 17,9% в виде АфГф); 37,8% присутствуют в виде групп из двух или трех соединенных друг с другом звеньев (за которыми следуют Цф, Уф или Гф в приблизительно равных количествах) [176].

Из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* выделена кристаллическая внеклеточная рибонуклеаза. Ее действие подобно действию панкреатической рибонуклеазы; фермент катализирует специфический гидролиз эфирных связей в эфирах пуриновых рибонуклеозид-3'-фосфатов [177]. Из гороха [178, 179] и листьев табака [180] выделены другие рибонуклеазы, расщепляющие все межнуклеотидные связи в рибонуклеиновых кислотах с образованием нуклеозид-3'-фосфатов (или 2',3'-циклофосфатов). Абсолютной специфичности у этих ферментов не обнаружено: одни связи расщепляются быстрее, чем другие. Ценное, по-видимому, свойство рибонуклеазы из райграсса заключается в значительном снижении скорости гидролиза с уменьшением размера полинуклеотидного субстрата, так что в ферментативном гидролизате накапливаются существенные количества разнообразных олигонуклеотидных промежуточных продуктов [181]. Фермент расщепляет олигонуклеотиды независимо от природы их концевых групп.

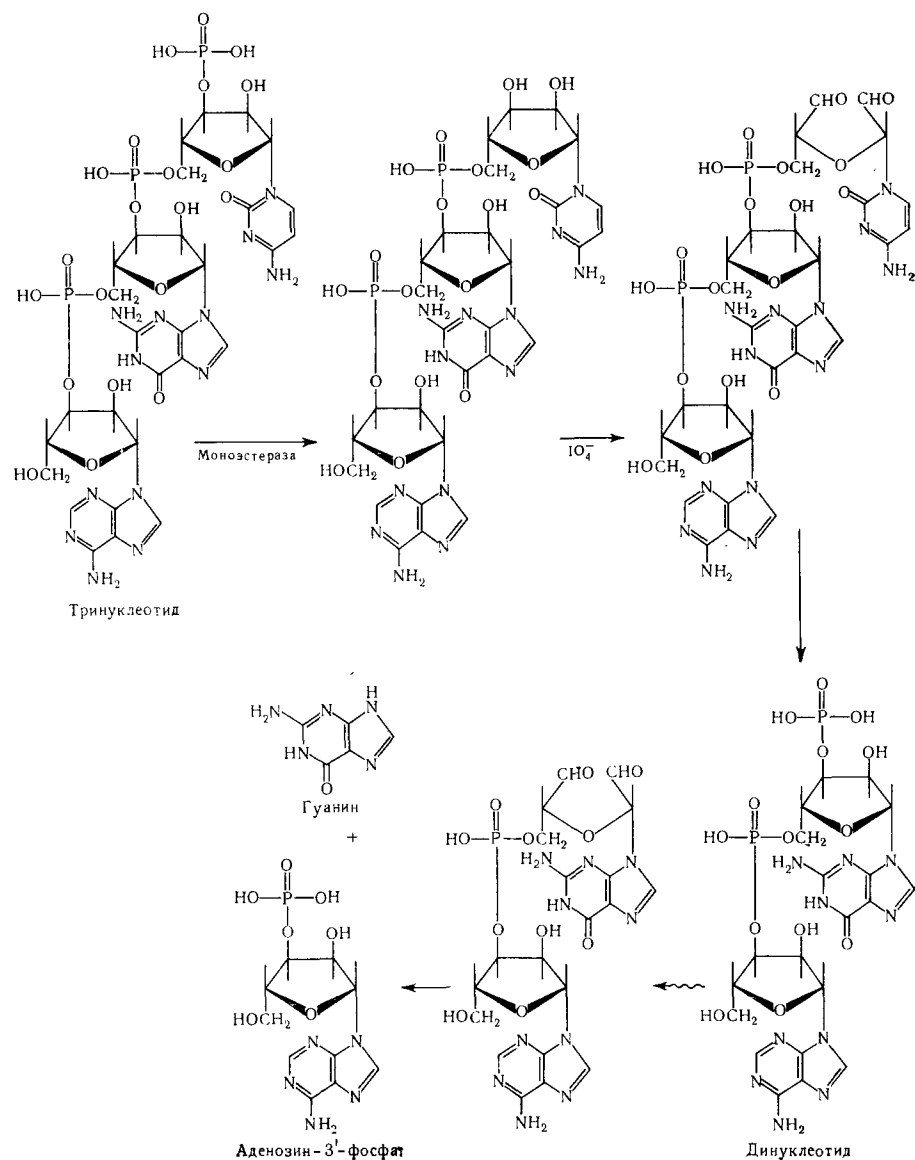
Высокоактивная (и весьма устойчивая) рибонуклеаза присутствует в водных смывах с пальцев человека, живого [182] или мертвого, а также в отпечатках пальцев; инактивация биологически активных рибонуклеиновых кислот может быть иногда результатом соприкосновения рук с материалом при работе.

Весьма тонкий подход к определению нуклеотидной последовательности в некоторых вирусных нуклеиновых кислотах, таких, как РНК вируса табачной мозаики, может заключаться в ступенчатом удалении белковых субъединиц из нативного вируса посредством мягкой обработки детергентом с последующей специфической ферментативной атакой на обнажившуюся часть стержня нуклеиновой кислоты [183].

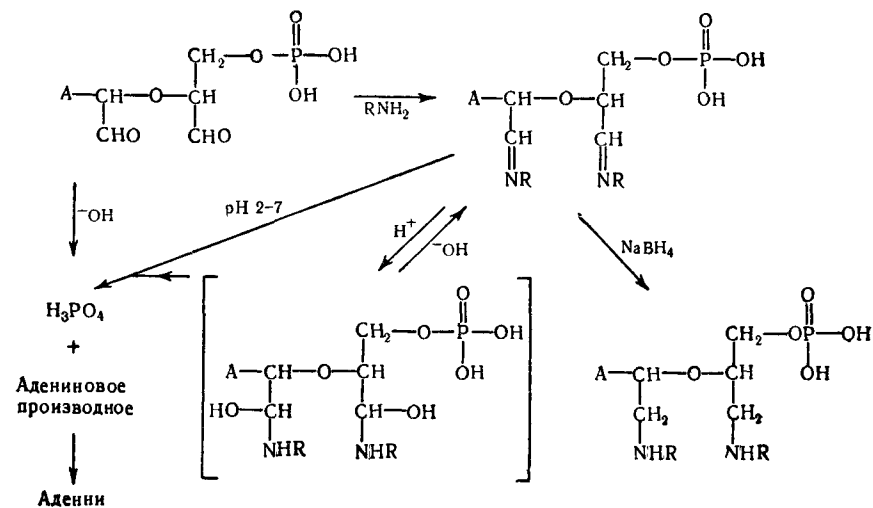
СТРУКТУРА ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ

В то время как окончательное установление нуклеотидной последовательности в рибонуклеиновых кислотах — дело будущего *, строение ряда олигонуклеотидов, выделенных из природных поли-

* В 1965 г. появилось сообщение Холли и сотрудников о полной расшифровке последовательности нуклеотидов в аланил-т-РНК [Holley R. W. et al., Science, 147, 1462 (1965)]. — Прим. ред.



фицированного фосфата предпоследнего нуклеозида [189, 190]. Применение лизинового буфера также дает количественное расщепление при более мягких условиях и за более короткое время, чем в первоначально предложенном методе (с использованием глицинового буфера) [191]. Следует отметить, что присутствие псевдоуридина



в полинуклеотидной цепи не будет служить препятствием для изучения нуклеотидной последовательности (несмотря на предположения об обратном [192]), пусть даже в результате элиминирования фосфата будет выделяться не урацил, а его 5-замещенное производное.

Более детальное изучение показало, что обработка диальдегида, полученного из аденозин-5'-фосфата, первичным амином при $\text{pH} > 9$ приводит к количественному образованию шиффового основания [190]. В нейтральных или слабокислых условиях последнее расщепляется на агликоновый фрагмент молекулы и неорганический фосфат. Восстановление шиффового основания боргидридом натрия дает кислотостойчивый продукт. Количественный выход фосфата и агликона получается также при обработке окисленного периодатом нуклеотида первичным амином в пределах $\text{pH} 6-8$, по-видимому через промежуточное образование ди- α -оксиамины. На начальных этапах расщепления рибоза, по крайней мере частично, остается связанной с пурином (или пиримидином), но в щелочной среде или при $\text{pH} 1$ происходит разрыв гликозидной связи с образованием свободного гетероциклического основания.

ХИМИЧЕСКИЙ ГИДРОЛИЗ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Механизм щелочного гидролиза рибонуклеиновых кислот имеет, несомненно, общее значение независимо от природы щелочи, примененной для гидролиза. Однако со многими препаратами рибонуклеиновой кислоты не наблюдается количественного распада; по-видимому, присутствует некоторое количество щелочеустойчивых связей. Исключительная устойчивость некоторых олигорибонуклеотидов (например, ди- и триадениловых кислот) [193] к щелочному гидролизу может до некоторой степени быть результатом противоположных эффектов: межплоскостного взаимодействия между основаниями (препятствующего необходимому смещению) и отталкивания между заряженными фосфатными группами, т. е. межнуклеотидная связь в малом олигонуклеотиде более устойчива, чем та же связь в середине олигонуклеотида большей длины [194]. Кроме того, так как щелочной гидролиз рибонуклеиновой кислоты включает трансфосфорилирование с образованием промежуточных 2',3'-циклофосфатов, то различия в легкости фосфорилирования 2'-гидроксильных групп нуклеозидов вполне могут отразиться на относительной устойчивости межнуклеотидных связей между различными нуклеозидами. Полигуаниловая кислота (имеющая как 2'—5'-, так и 3'—5'-связи) значительно устойчивее к разбавленной щелочи, чем аналогичная полиуридилловая кислота [18], и поэтому деградация рибонуклеиновых кислот может при подходящих условиях гидролиза приводить к выделению, помимо гуаниловой кислоты, еще и гуаниловых олигонуклеотидных участков, несущих на конце нуклеозид-2'(3')-фосфат (или нуклеозид-2',3'-циклофосфат). Нуклеофильный характер 2'-гидроксильной группы в остатках пиримидиновых нуклеозидов может быть усилен образованием водородной связи с карбонильным кислородом при атоме C₂ пиримидинового кольца, и, следовательно, межнуклеотидными связями, легче всего разрывающимися под действием слабой щелочи, будут те связи, которые расщепляются панкреатической рибонуклеазой *. В соответствии с этим основная часть динуклеотидов, полученных

* Проведенные недавно кинетические исследования щелочного гидролиза транспортной РНК в 1 н. КОН при 25° позволяют предположить наличие начальной стадии быстрого хаотического расщепления, за которым следует ступенчатый гидролиз олигонуклеотидов, причем конечное состояние определяет уменьшающуюся устойчивость. Константы скорости выделения цитидиловой, уридилловой и гуаниловой кислот очень близки (реакции первого порядка в течение первых 6—8 час), но значительно выше (приблизительно вдвое) соответствующего значения для адениловой кислоты [555]. Так как ионизация 2'-гидроксильной группы происходит при pH 12—13 (а это важно, так как разрыв цепи предусматривает атаку этой группой), интерес представляет сравнение приведенных выше данных с кинетическими данными гидролиза более слабой щелочью. Можно ожидать небольшую разницу в значениях *pK* для 2'-гидроксильной группы разных нуклеотидов.

частичным щелочным гидролизом рибонуклеиновой кислоты, устойчива к воздействию рибонуклеазы, т. е. является динуклеотидами типа: пурииннуклеозид-3'-фосфат-5'-пурин-(или пиримидин)-нуклеозид-2'(3')-фосфат [119, 193].

Гидролиз РНК гидроокисями различных металлов, такими, как гидроокиси свинца, кадмия, цинка или алюминия, приводит к образованию смесей нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов [195]. После расщепления дрожжевой РНК гидроокисью лантана остается устойчивая фракция [196]. Из гидролизатов рибонуклеиновой кислоты гидроокисью висмута (pH 4) выделены все шестнадцать димеров, которые возможно получить комбинированием четырех классических оснований [197]; при действии слабословных ионообменных смол образуются преимущественно динуклеотиды [198]. В последнем случае происходит миграция непрогидролизовавшихся фосфодиэфирных связей (изомеризация 3'—5'-связи в 2'—5') в противоположность тому, что имеет место при действии разбавленной щелочи на простые эфиры рибонуклеотидов.

Помимо описанной выше повышенной устойчивости межнуклеотидных связей в олигонуклеотидах к гидролизу (по сравнению со связями в рибонуклеиновой кислоте), имеются данные о существовании компонентов, которые можно назвать щелочеустойчивыми. Ввиду трудностей, связанных с получением однородных препаратов рибонуклеиновой кислоты, очень сложным является установление факта наличия ковалентных связей между компонентами такого рода с исходной рибонуклеиновой кислотой. Щелочные гидролизаты фракций РНК из икринок лягушки содержат, как сообщают, 10—20% устойчивого к гидролизу фрагмента [199]. Частично этот фрагмент может состоять из нуклеозиддифосфатов, особенно если учесть олигонуклеотидную природу препарата «РНК».

Было приведено более убедительное доказательство присутствия щелочеустойчивых динуклеотидных участков в рибонуклеиновой кислоте. Такая устойчивость является результатом присутствия 2'-замещенных соединений, вероятно 2'-О-метильных производных нуклеотидов [119, 200, 201]. Деградация изолированных динуклеотидов посредством обработки фосфомоноэстеразой с последующим периодатным окислением и элиминированием фосфата приводит к замещенным мононуклеотидам; после дефосфорилирования последние образуют соединения нуклеозидного характера, которые не окисляются периодатом. По своему поведению при хроматографии углеводный компонент идентичен 2(или 3)-О-метилрибозе [200]. Метилирование 2'-гидроксильных групп в рибонуклеиновой кислоте должно сообщать ей устойчивость к расщеплению как щелочью, так и панкреатической рибонуклеазой [202].

Деградация рибонуклеиновых кислот *трет*-бутилатом калия [203] (или карбонатом бария [204]) дает нуклеозид-2',3'-цикло-

фосфаты. Последние получают также при обработке растворов рибонуклеиновой кислоты в формамиде аммиаком [205].

При кислотном гидролизе рибонуклеиновых кислот в мягких условиях образование мононуклеотидов происходит по механизму, сходному с механизмом щелочного гидролиза, хотя вследствие сопутствующего разрыва гликозидной связи в пуриновых нуклеотидах получается весьма сложная смесь. Гидролиз в более жестких условиях приводит главным образом к пуриновым основаниям и пиримидиновым нуклеотидам [206]. При гидролизе буферных растворов рибонуклеиновой кислоты при pH 4 получают нуклеозиды с хорошими выходами [207]. Кратковременная обработка рибонуклеиновой кислоты крепкой соляной кислотой дает низкомолекулярные олигонуклеотиды (с небольшим выходом), из которых некоторые были выделены с помощью ионообменной хроматографии [208]. Дальнейшее исследование продуктов гидролиза при помощи хроматографии на бумаге обнаружило присутствие динуклеотидов, не найденных в гидролизатах РНК панкреатической рибонуклеазой, и показало, что в дрожжевой рибонуклеиновой кислоте присутствуют все возможные сочетания четырех классических оснований [209]. При кислотном гидролизе пуриннуклеозид-3'-пиримидиннуклеозид-5'-фосфатов образуются пиримидиннуклеозид-5'-фосфатные эфиры рибозы (по ее 3'-положению). Последующая обработка карбонатом натрия дает пиримидиннуклеозид-5'-фосфат в результате элиминирования фосфатной группы, находящейся в β -положении по отношению к альдегидной группе рибозы [210].

ГИДРАЗИНОЛИЗ

Реакция гидразина с пиримидиновыми нуклеотидами была описана в связи с исследованиями структуры выделяющихся при этой реакции рибозофосфатов. При гидразинолизе дрожжевой рибонуклеиновой кислоты образуется продукт, рибоапириимидиновая кислота, который содержит остатки рибозы, обладающие восстанавливающей способностью, и который почти свободен от пиримидиновых оснований [211, 212]. Такая рибоапириимидиновая кислота имеет, по-видимому, небольшую длину цепи и не гидролизует панкреатической рибонуклеазой IA [213].

ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ И ДЕЙСТВИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА

В результате дезаминирования рибонуклеиновых кислот при обработке азотистой кислотой нуклеотидные остатки, имеющие аминогруппу, превращаются в соответствующие оксисоединения без значительного повреждения цепи [214]. Изменение очень небольшого числа таких остатков вызывает потерю биологической актив-

ности [215, 216]. Обработка рибонуклеиновой кислоты вируса табачной мозаики формальдегидом также уничтожает ее инфекционность; по-видимому, реакция специфична для аминогрупп оснований [217, 218] и протекает, вероятно, через образование оснований Шиффа или аминометанольных и метиленовых производных. В случае адениловых остатков первоначальная атака может осуществляться на N¹-атом пуринового кольца.

ОБРАБОТКА ВОДОРАСТВОРИМЫМИ КАРБОДИИМИДАМИ *

Описана реакция присоединения, специфичная для уридиновых и гуанозиновых нуклеотидов и заключающаяся в реакции нуклеотида с толуолсульфокислым циклогексил-2-(N-метилморфолин)этилкарбодиимидом в водном растворе при pH 8 [554]. В случае пиримидина такое замещение (при N¹) сообщает устойчивость к действию панкреатической рибонуклеазы; при обработке РНК с последующим перевариванием ферментом получают осколки цепи значительной длины (так как расщепляются только цитидилил-3'-связи), цитидиловая кислота, и лишь следы уридин-3'-фосфата. (После удаления фермента блокирующая группа снимается гидролизом при pH 10,5 [554].)

ОБРАБОТКА ГИДРОКСИЛАМИНОМ **

Изучено действие водного гидроксиламина на РНК вируса табачной мозаики [219]. Пуриновые нуклеозиды не затрагиваются, но уридин быстро и в мягких условиях (pH 10) распадается до 5-изооксазолона и рибозилмочевины; при дальнейшем действии гидроксиламина из рибозилмочевины образуются мочевины и оксим рибозы. При щелочном pH цитидин реагирует очень медленно, но при pH 6 цитидиновые остатки в РНК реагируют примерно в 30 раз быстрее уридиновых и превращаются, по-видимому, в производные уридин-6-оксима [219, 220]. Таким образом, оказывается возможным довольно специфическое изменение или удаление оснований без особого вреда для целостности цепи РНК. Удаление остатков урацила из полинуклеотидной цепи предотвращает таким образом расщепление цепи в этих точках панкреатической рибонуклеазой [221]. При обработке рибосомальной РНК из *E. coli* гидроксиламином при pH 10 образуется продукт, из которого при переваривании

* См. также работы: Кнорре Д. Г. и сотр., Биохимия, 30, 189 (1965).— Прим. ред.

** Об использовании гидроксиламина и его O-замещенных см. работы Кочетков Н. К. и сотр., ДАН СССР, 152, 1005 (1963); 153, 597 (1963); Biochem. Biophys. Acta, 68, 493 (1963); Biochem. Biophys. res. commun., 19, 49 (1965).— Прим. ред.

рибонуклеазой не выделяется уридиловая кислота, а получают олигонуклеотиды. Та же обработка при pH 6 дает продукт, из которого при ферментативном гидролизе не освобождается цитидиловая кислота; щелочной гидролиз, однако, не обнаруживает уменьшения в содержании цитидиловой кислоты, вероятно, из-за обратимости первоначальной реакции присоединения гидроксилamina (по двойной связи 4,5) к цитидину [221]. Предложенный механизм реакции гидроксилamina с цитидином сходен с механизмом, выдвинутым для объяснения реакции гидроксилamina с 3-метилцитозином см. стр. 440).

СОСТАВ ОСНОВАНИЙ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В течение многих лет результаты трудоемких и весьма грубых анализов нуклеиновой кислоты, проведенных первыми исследователями, указывали, как полагали, на эквимолекулярные отношения двух пуриновых (аденин и гуанин) и двух пиримидиновых (урацил и цитозин) оснований. Позже применение хроматографии на бумаге [222] и, в меньшей степени, ионообменной техники дало быстрые и относительно точные методы количественного определения компонентов рибонуклеиновых кислот. При гидролизе нуклеиновой кислоты щелочью образуются мононуклеотиды, которые могут быть затем разделены либо как таковые, либо в виде нуклеозидов, после дефосфорилирования. Кислотный гидролиз, напротив, дает пуриновые основания и пиримидиновые мононуклеотиды. Спектрофотометрическое определение подвергнутых разделению компонентов после элюирования их с бумаги (с применением электрофореза [223] или хроматографии) или с ионообменной смолы позволяет получать молярные соотношения оснований.

Было проанализировано большое число препаратов нуклеиновых кислот (пока неоднородных из-за несовершенства методов выделения) животных, растений, микроорганизмов, а также ряд нуклеиновых кислот вирусов; некоторые характерные результаты приведены в табл. 6-2. Так как многие из исследованных препаратов представляют собой сложные смеси нуклеиновых кислот различных биологических функций, в разной степени подверженных как внеклеточному, так и внутриклеточному распаду (некоторые виды рибонуклеиновой кислоты, метаболически очень активные, обладают высокими скоростями обмена, и нельзя пренебрегать возможностью существования внутри клетки значительных количеств «недостроенных» рибонуклеиновых кислот), то неудивительно, что не наблюдается четких количественных соотношений, даже если они и действительно существуют *in vivo*. Представляет, однако, некоторый интерес то, что рибонуклеиновая кислота из дрожжей, наиболее широко изученная первыми исследователями, все же,

по-видимому, содержит основания в эквимолекулярном соотношении. Целесообразный подбор данных анализа рибонуклеиновых кислот млекопитающих и анализ целых клеток или клеточных фракций, полученных центрифугированием, позволил обнаружить, что во многих случаях отношение соединений с 6-кетогруппами (гуанин и урацил), к сумме соединений с 6-аминогруппами (аденин и цитозин) почти равно единице [224]. Обширные исследования Белозерского и сотрудников позволили установить, что эта закономерность даже более очевидна в случае рибонуклеиновых кислот из высших растений и микроорганизмов [225].

Сравнение состава дезоксирибонуклеиновых и рибонуклеиновых кислот из девятнадцати видов бактерий различных систематических групп обнаружило лишь небольшие различия в составе РНК, в то время как состав ДНК варьировал в значительной степени. Хотя заметного соответствия между составом двух типов нуклеиновых кислот из различных видов бактерий и не было обнаружено, все же была отмечена возможная корреляция, так как отношение суммы гуаниловой и цитидиловой кислот к сумме адениловой и уридиловой кислот в рибонуклеиновых кислотах имеет тенденцию к увеличению, если увеличивается соотношение суммы гуанин + цитозин к сумме аденин + тимин в дезоксирибонуклеиновых кислотах [226]. Величина регрессии первого соотношения ко второму очень мала, но все же данные позволяют предположить, что, тогда как большая часть клеточной рибонуклеиновой кислоты относительно независима от дезоксирибонуклеиновой кислоты, по крайней мере часть ее находится во взаимосвязи с последней, и такие две нуклеиновые кислоты могут тогда иметь аналогичный состав оснований [227]. Проведенное позднее сравнение скорости включения радиоактивного фосфата в нуклеозид-2' (и 3')- или нуклеозид-5'-фосфаты, получающиеся при действии щелочи или диэстеразы змеиного яда на дрожжевую нуклеиновую кислоту, показало, что фракция (с высокой скоростью обмена) рибонуклеиновой кислоты обладает составом, подобным составу дрожжевой дезоксирибонуклеиновой кислоты, причем урацил эквивалентен тимину [228]. Дальнейшие исследования подтвердили присутствие такого рода РНК в ряде микроорганизмов.

Следует отметить относительно заметные различия в соотношении оснований для РНК из *Escherichia coli*, определенном двумя различными группами исследователей (см. табл. 6-2). Это может быть до некоторой степени результатом изменений, возникающих в результате влияния на микроорганизм окружающей среды [229]. Такого рода усложнение, возникающее в интерпретации данных по составу РНК, можно проиллюстрировать на примере соотношения оснований общей РНК из *E. coli*, выросшей на среде с добавкой глюкозы и на среде с питательным бульоном и экстрактом из дрож-

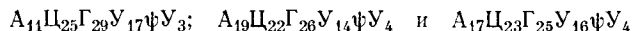
Таблица 6-2

СОСТАВ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Источник рибонуклеиновой кислоты	A	Ц	Г	У	Моляр- ное от- ношение пурины/ пирими- дины	$\frac{\Gamma + \Psi}{\Lambda + \Upsilon}$	ДНК $\frac{\Gamma + \Psi}{\Lambda + \Upsilon}$	Литера- тура	
Печень кролика	10	14,6	16,9	10,3	1,08	1,11	1,55	231	
Печень крысы	10	14,3	17,6	10,8	1,10	1,17	1,53	231	
Печень шпыленка	10	13,6	17,1	10,6	1,12	1,17	1,49	231	
Печень свиньи	10	15,3	18,8	9,1	1,23	1,10	0,69	232	
Печень теленка	10	14,9	17,9	8,4	1,20	1,06	1,78	9	
Селезенка теленка	10	17,7	19,7	8,6	1,13	1,02	2,01	9	
Зобная железа теленка	10	13,9	23,8	6,5	1,65	1,27	2,28	9	
Мозг кошки	10	12,0	14,7	9,5	1,15	1,10	1,37	233	
Яйцо морского ежа	10	12,3	13,3	9,3	1,07	1,01	1,33	234	
Яйцо морской звезды	10	14,0	15,0	11,0	1,0	1,08	1,38	235	
Ядра печени крысы	10	14,6	12,7	12,2	0,84	1,01	1,23	236	
Митохондрии печени крысы	10	15,1	16,9	11,0	1,03	1,11	1,52	231	
Микросомы печени крысы	10	17,1	17,9	9,9	1,03	1,03	1,76	236	
Клеточный сок печени крысы	10	16,5	17,3	9,8	1,04	1,02	1,71	236	
Дрожжи пивные	10	9,2	10,4	9,6	1,08	1,04	1,0	0,56	237
Дрожжи хлебные	10	8,5	10,9	9,5	1,16	1,10	1,0	0,56	238
Вирусы растений — мозаики табака	10	6,2	8,5	8,8	1,24	1,07	0,78	239	
Вирусы растений — огурцов	10	7,1	9,9	11,9	1,05	1,27	0,78	239	
Вирусы растений — мозаики дикого огур- ца	10	21,9	8,7	14,1	0,52	0,72	1,25	240	
Вирусы растений — желтой мозаики тур- непса	10	16,8	7,6	9,8	0,66	0,65	1,23	241	
Вирус полиомиелита	10	7,7	8,4	8,9	1,11	0,98	0,85	242	
Вирус мышинного энцефаломиокардита <i>Serratia marcescens</i>	10	8,5	8,6	9,5	1,03	0,98	0,88	243	
<i>Escherichia coli</i> (США)	10	8,5	10,2	8,3	1,2	1,0	1,02	1,45	224
<i>Escherichia coli</i> (СССР)	10	8,5	10,2	8,3	1,2	1,0	1,02	0,99	224
<i>Escherichia coli</i> (на глюкозе)	10	9,3	11,8	7,4	1,31	1,00	1,21	1,09	226
<i>Escherichia coli</i> (на бульоне)	10	8,6	11,3	7,7	1,30	1,02	1,12	—	229
<i>Escherichia coli</i> , фенилаланин-специфич- ная РНК	10	9,2	12,7	9,7	1,20	1,17	1,11	—	229
<i>Clostridium perfringens</i>	10	13,2	15,6	9,8	1,12	1,09	1,46	—	47
<i>Salmonella typhosa</i>	10	7,8	10,5	7,3	1,36	1,00	1,06	0,45	226
<i>Brucella abortus</i>	10	9,2	11,8	7,3	1,32	1,00	1,21	1,14	226
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	9,8	11,9	7,7	1,26	0,99	1,23	1,37	226
<i>Sarcina lutea</i>	10	9,5	12,6	7,8	1,31	1,05	1,24	2,03	226
<i>Aspergillus niger</i>	10	10,4	14,1	8,6	1,27	1,11	1,32	2,57	226
<i>Sclerotinia libertiana</i>	10	10,0	12,0	8,0	1,23	1,0	1,23	1,00	244
<i>Pinus sibirica</i>	10	7,8	10,1	7,8	1,29	1,01	1,01	0,83	244
<i>Ginkgo biloba</i>	10	9,7	12,5	7,7	1,27	1,02	1,25	0,675	245
<i>Magnolia glauca</i>	10	9,8	12,1	8,7	1,20	1,05	1,17	—	246
<i>Allium cepa</i>	10	10,0	12,0	8,3	1,20	1,02	1,20	—	246
	10	9,9	12,0	8,3	1,21	1,02	1,20	0,58	245

жей [229]. Эти изменения обусловлены изменением состава рибосомальной РНК, который варьирует в течение нормального цикла роста [230].

Весьма значительные различия в составе обнаружены среди очищенных транспортных рибонуклеиновых кислот из дрожжей [55]. Для нуклеиновых кислот, специфичных к аланину, тирозину и валину, «эмпирические» формулы являются соответственно



МИНОРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ *

Хотя рибонуклеиновые кислоты, несомненно, состоят главным образом из нуклеотидов — производных аденина, гуанина, цитозина и урацила, полная расшифровка состава таких полимеров сопряжена с рядом трудностей. Возможное присутствие очень малых количеств ненуклеотидных компонентов до недавнего времени игнорировалось в значительной степени из-за удобства применения количественных расчетов по поглощению в ультрафиолетовой области. Кроме того, выбор между артефактом и подлинным компонентом не всегда легко сделать; устойчивость или неустойчивость комбинации не является критерием ковалентного или нековалентного характера связывания с такими высокомолекулярными полиэлектролитами, как нуклеиновые кислоты. Теперь известно, что в некоторых рибонуклеиновых кислотах концевой аденозиновый остаток этерифицирован по 2'- или 3'-гидроксильной группе одной молекулой аминокислоты. (Аналогия с ацетильными производными аденозина позволяет предположить, что такие аминокислотные производные являются исключительно 3'-эфирами). Неоднократно отмечалось существование пептидных производных нуклеиновых кислот, и нельзя полностью пренебрегать возможностью присутствия в рибонуклеопротеидах некоторых относительно нестойких ковалентных связей между белком и нуклеиновой кислотой. Проблема минорных ненуклеотидных компонентов рибонуклеиновых кислот до некоторой степени дискуссионна и может быть разрешена соответствующим точным анализом нуклеиновой кислоты.

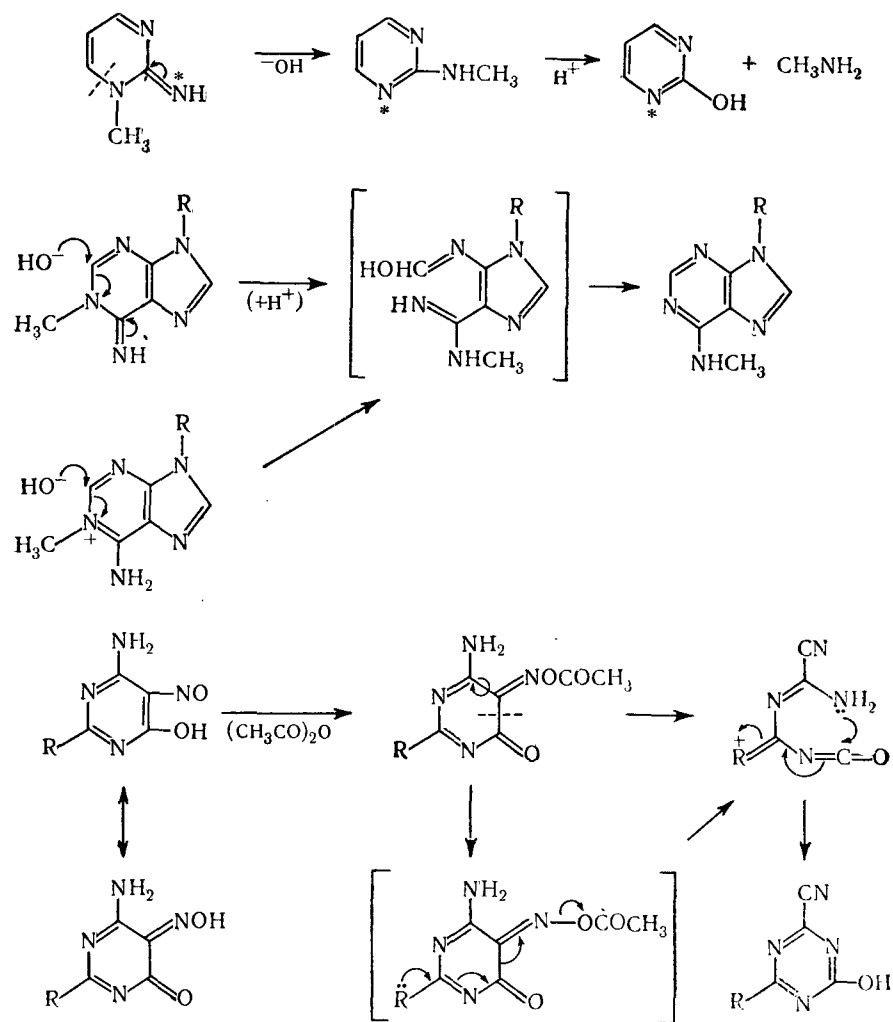
Применение ионообменной хроматографии и хроматографии на бумаге в дополнение к имевшимся методам быстрого анализа привело к разделению ряда минорных нуклеотидных компонентов в рибонуклеиновых кислотах. Многие из них в настоящее время идентифицированы, и выяснено, что они присутствуют в весьма малых количествах, составляющих 0,05—4% от общего числа звеньев урацила. Основания, входящие в состав таких, присутствующих

щих в незначительном количестве нуклеотидов, включают тимин, 5-метилцитозин, 2-метиладенин, 6-метиламинопурин, 6-диметиламинопурин, 1-метилгуанин, 2-метиламино- и 2-диметиламино-6-оксипурины [247—252]. Недавно в «растворимой» рибонуклеиновой кислоте из печени свиньи и крысы обнаружен 1-метиладенин [253]. 1-Метил-аденозин и соответствующий нуклеотид в щелочной среде превращаются в производные 6-метиламинопурина [254]. Таким образом, обнаружение 1-метиладенина в рибонуклеиновой кислоте зависит от природы процесса гидролиза. Повторное изучение состава низкомолекулярной РНК из печени крысы, печени свиньи, дрожжей, зародышей пшеницы и *Escherichia coli* с применением кислотного гидролиза показало, что только бактериальные РНК содержат 6-метиламинопурин, хотя при щелочном гидролизе некоторое количество соответствующего нуклеотида образуется из всех препаратов [255]. Все животные и растительные нуклеиновые кислоты содержат 1-метиладенин, но вследствие кислотного расщепления (с образованием 5-аминоимидазол-4-N-метилкарбоксамида [254]) количество его в гидролизатах приблизительно на 50% ниже значения, соответствующего количеству 6-метиламинопуриннуклеозид-2'(3')-фосфата, получающегося при щелочном гидролизе РНК. Интересно, что дезоксирибонуклеиновые кислоты из *E. coli* (и коли-фагов) также содержат 6-метиламинопурин, но не содержат 1-метил-аденина.

Механизм «миграции» метильной группы с N¹-атома на соседнюю аминогруппу кольца, происходящей в щелочных условиях, по-видимому, сходен с механизмом, имеющим место в случае пиримидиновых производных. Показано, что последний включает гидролитическое расщепление кольца и последующую циклизацию с участием аминогруппы [256]. Так, перегруппировка N¹-метильного производного 2-аминопиримидина (меченного N¹⁵ по аминогруппе) в горячем растворе щелочи дает 2-метиламинопиримидин, из которого при кислотном гидролизе получается 2-оксипиримидин, обогащенный N¹⁵, и не содержащий метки метиламин. Подобный механизм был выдвинут для перегруппировки 4-амино-5-нитрозо-6-оксипиримидинов в циан-симм-триазины под действием ангидридов кислот [257]. Аналогия с этими реакциями, а также данные о действии щелочи на N¹-алкилинозин и N³,5'-циклоаденозин позволяют предположить, что происходящая под действием щелочи перегруппировка N¹-метиладениловой кислоты в 6-метиламинопурининовый нуклеотид протекает через промежуточное образование 5-формиламиноимидазол-4-(N-метил)карбоксамида.

Необходимо отметить, что все упомянутые до сих пор минорные нуклеотиды представляют собой метилированные производные четырех главных оснований. В большинстве случаев соответствующие нуклеозиды и нуклеотиды, а также и свободные основания были

* См. также обзор: Венкстерн Т. В., сб. «Успехи биол. химии», т. 6, Изд. «Наука», М., 1964, стр. 3—45.— Прим. ред.



идентифицированы после соответствующей деградации [258]; выделение 5'-фосфата после гидролиза нуклеиновой кислоты диэстеразой змеиного яда (или нуклеозида под действием неочищенного змеиного яда), а также смеси 2'- и 3'-фосфатов после щелочного гидролиза указывает на то, что минорные нуклеотиды представляют собой неотъемлемую составную часть полинуклеотида и участвуют в образовании нормальной 3'—5'-фосфодиэфирной связи [259]. Во всех нуклеозидах, которые подверглись тщательному изучению, сахар

представлен рибозой, а гликозидная связь находится в нормальном положении.

Другой тип нуклеотидной компоненты был идентифицирован как 5-β-D-рибофуранозилурацилфосфат (псевдоуридиловая кислота) [260—263]; так как некоторые рибонуклеиновые кислоты содержат около 25 молей этого нуклеотида на 100 молей уридина, то его можно рассматривать скорее как главный, чем как минорный нуклеотид.

Все исследованные рибонуклеиновые кислоты из бактериальных, растительных и животных тканей содержат несколько минорных оснований. Однако количественное распределение их в рибонуклеиновых кислотах из различных источников неодинаково, и во фракциях нуклеиновых кислот из данного типа клеток (табл. 6-3) действительно имеются значительные вариации. Так, например, дрожжевые рибонуклеиновые кислоты, растворимые в молярном растворе хлористого натрия, содержат значительно больше псевдоуридина, чем те рибонуклеиновые кислоты, которые нерастворимы в таком растворе [261]. Точнее, этот компонент концентрируется в так называемой «растворимой», или «транспортной», рибонуклеиновой кислоте клетки (хотя он в значительных количествах присутствует, вероятно, и в высокомолекулярной рибосомальной РНК), и его содержание, по-видимому, прямо пропорционально способности рибонуклеиновой кислоты акцептировать аминокислоты; наиболее активная (по включению лейцина) из выделенных до сих пор рибонуклеиновых кислот содержит около 5,6 мол. % псевдоуридина [250, 264—267]. По сравнению с высокомолекулярной рибосомальной РНК «растворимые» цитоплазматические фракции клеточной рибонуклеиновой кислоты содержат метилированные основания также в значительно больших количествах [251, 268, 269]. В «растворимых» рибонуклеиновых кислотах из опухолевой ткани по сравнению с таковыми из клеток печени тоже было обнаружено заметное увеличение содержания метилированных пуринов (особенно 2-метиламино-6-оксипурина) [269].

Так как транспортная рибонуклеиновая кислота имеет длину цепи 50—100 нуклеотидов, то ясно, что некоторые из минорных нуклеотидов присутствуют не во всех молекулах рибонуклеиновой кислоты, содержащихся в данном неочищенном препарате (это потребовало бы минимального количества оснований приблизительно 4—8 молей на 100 молей урацила), а входят в состав особых полинуклеотидных цепей, содержащихся в препарате. Значение этих нуклеотидов пока точно неизвестно; можно полагать, что они оказывают некоторое влияние на макромолекулярную конформацию нуклеиновой кислоты.

Ни один из минорных нуклеотидов (как и псевдоуридиловая кислота) не обнаружен в вирусе табачной мозаики или желтой мозаики турнепса.

Таблица 6-3

А. МИНОРНЫЕ НУКЛЕОТИДЫ

Соединение	Количество, моли/100 молей урацила			
	микро- сомы печени крысы [268]	«растворимые» РНК		
		США [268]	Новая Зеландия [269]	аденокар- цинома млекопи- тающих [269]
Псевдоуридин	7,5	25		
5-Метилцитозин	0,4	10		
{ 1-Метиладенин	0,5	8,1	0,78	4,20
6-Метиламинопури				
6-Диметиламинопури	0,1	0,1	0,55	1,16
1-Метилгуанин	0,1	3,3	0,86	1,03
2-Метиламино-6-оксипури	0,1	2,3	5,2	12,40
2-Диметиламино-6-оксипури	0,1	3,0	1,36	3,20

Б. НУКЛЕОТИДНЫЙ СОСТАВ «РАСТВОРИМОЙ» РНК ИЗ *ESCHERICHIA COLI* [253] ПЕЧЕНИ КРЫСЫ [270] И ДРОЖЖЕЙ [267]

Основание	Количество нуклеотида, моли/100 молей уридиловой кислоты					
	<i>E. coli</i>	печень крысы	дрож- жи	<i>E. coli</i>	печень крысы	дрож- жи
Аденин	135	120	99	Пурины Пиримидины = 1,12	0,99	0,95
Гуанин	214	222	134			
Цитозин	193	220	118	6-Амино 6-Кето = 0,98	0,98	0,83
Урацил	100	100	100			
Псевдоуридин	14	24	27			
5-Метилурацил	7,3					
2-Метиладенин	2,0					
6-Метиламинопу- рин	0,7					
1-Метилгуанин	0,7					

КОМПЛЕКСЫ РИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты представляют собой полиэлектролиты, и как таковые они легко образуют комплексы с другими полиэлектролитами. Так, например, смешивание водных растворов рибонук-

леиновых кислот [271] (или полинуклеотидов [272]) и основных белков — протаминов и гистонов вызывает осаждение комплекса, который можно рассматривать как агрегат, получившийся в результате солеобразной комбинации кислоты и основания. Растворением в крепком солевом растворе обычно можно достичь диссоциации этого комплекса, по-видимому, в результате действия большого количества ионов натрия и хлора; разбавление вызывает повторное выпадение комплекса в осадок. Подобные комплексы кислоты — основание образуются также между нуклеиновыми кислотами (или олигонуклеотидами) и синтетическими лизиновыми полипептидами [273, 274] или такими полиоснованиями, как спермин [274, 275], спермидин [274] и путресцин [275]. Так как спермидин тормозит ферментативный гидролиз рибонуклеиновой кислоты рибонуклеазой [276], то вполне возможны изменения во вторичной структуре РНК. Полифосфат, встречающийся в ряде организмов, также образует комплексы с рибонуклеиновыми кислотами [277]. Свойства комплексов полифосфат — рибонуклеиновая кислота, выделенных из *Aspergillus niger*, указывают на то, что эти комплексы действительно существуют как таковые и не являются вторичными продуктами, образовавшимися при осаждении [278]. Такие комплексы могут быть очищены электрофорезом — методом, который позволяет легко разделять простые механические смеси компонентов [279].

С биологической точки зрения наиболее важными комплексами являются рибонуклеопротеиды. Мало известно о природе химической связи между нуклеиновой кислотой и белком, хотя во многих нуклеопротеидах, таких, как кристаллические вирусы растений, компоненты расположены определенным образом, когда нуклеиновая кислота окружена «защитной» белковой оболочкой. Рентгенографические исследования рибонуклеопротеидных частиц клеточного происхождения и полученных из них рибонуклеиновых кислот позволяет предположить, что конформация рибонуклеиновой части комплекса определяется белковой матрицей [280]. Обратимая диссоциация высокомолекулярных рибонуклеопротеидных субъединиц происходит легко [281]; образование связей обусловлено, по-видимому, действием ряда сил. Последние включают кулоновское притяжение противоположно заряженных ионов, притяжение диполей и водородные связи. Убедительное доказательство наличия иных связей, кроме электростатических, было получено путем электрофоретического изучения рибонуклеопротеида, рибонуклеиновой кислоты и белка и изучения влияния обработки мочевиной на электрофоретическое поведение рибонуклеопротеида — прием, обычно используемый для ослабления водородных связей [282]. Соотношение рибонуклеиновой кислоты и белка в выделенных рибонуклеопротеидах значительно варьирует; в случае наиболее строго

охарактеризованных клеточных комплексов, таких, как растительные вирусы, существуют, по-видимому, специфические отношения. В *Escherichia coli* около 80—90% общей РНК клетки присутствует в виде рибонуклеопротеидных частиц [283]. Эти частицы центрифугированием были разделены на четыре основных фракции [283]. Все четыре компонента имеют приблизительно сферическую или эллипсоидную форму [284] и содержат около 63% рибонуклеиновых кислот. Рибонуклеиновая кислота в рибонуклеопротеидах имеет очень высокий молекулярный вес в отличие от фракции «растворимой» рибонуклеиновой кислоты (молекулярный вес приблизительно $3 \cdot 10^4$). Из животных и растительных тканей [32, 285] выделены два основных компонента с молекулярным весом около $0,6 \cdot 10^6$ и $1,8 \cdot 10^6$; по-видимому, на одну рибонуклеопротеидную частицу приходится одна молекула РНК [285, 286]. В отличие от свободной нуклеиновой кислоты рибонуклеопротеид во многих случаях устойчив к действию нуклеаз [287], и постепенная диссоциация комплекса служит одной из предпосылок для ферментативного расщепления [288]; белковая оболочка вируса табачной мозаики защищает также вирус от действия ультрафиолетового излучения [289]. Из свободной нуклеиновой кислоты и цитоплазматических белков могут быть получены искусственные «нуклеопротеиды» [290].

Устойчивые комплексы нуклеиновых кислот образуются также при взаимодействии с ионами металлов, особенно многовалентными ионами. Например, рибонуклеиновая кислота с ионами бериллия дает устойчивый к диализу комплекс [291]. Связывание ионов других двухвалентных металлов, таких, как магний и кальций, может происходить главным образом за счет образования ионной пары с близлежащими первичными фосфатными группами [292]. Взаимодействие с другими металлами, такими, как ионы меди, возможно, заключается в образовании комплексов с основаниями, особенно с пуриновыми остатками [293]. Добавлением ионов двухвалентного никеля можно достичь значительной стабилизации инфекционности РНК растительных и животных вирусов, причем оптимальное соотношение равно одному иону никеля на нуклеотид [25, 294]. В рибонуклеиновых кислотах из различных биологических источников обнаружены значительные количества хрома, марганца, никеля, железа, алюминия, меди, цинка, кадмия, свинца и других металлов с общим молярным отношением 1/50 фосфатных остатков [295, 296]. Такие комплексы чрезвычайно устойчивы и отделение металлов диализом или с помощью комплексообразующих агентов представляет большие трудности; действительно, между рибонуклеиновой кислотой из печени быка, ионом двухвалентного железа и 1,10-фенантролином легко образуются устойчивые смешанные комплексы [296]. Хотя присутствие в рибонуклеиновых кислотах некоторого количества этих металлов может быть,

по-видимому, следствием загрязнения, было высказано предположение, что металлы могут иметь функциональное отношение к синтезу белка и передаче генетической информации. Возможная их роль может заключаться в поддержании конформации молекулы рибонуклеиновой кислоты посредством образования хелатов с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями или поперечных связей в спиральных участках молекулы [297], а также в образовании связи между нуклеиновой кислотой и белком в рибонуклеопротеидах [296]. Взаимодействие ионов металлов (и аминокислот) с рибонуклеиновыми кислотами вызывает довольно сложные изменения в скорости седиментации [298], какие можно ожидать при изменениях в конформации молекулы или при образовании агрегатов. Отмечено расщепление бактериального рибонуклеопротеида при обработке версеном [299], так же как и ассоциация и диссоциация различных рибонуклеопротеидов в ответ на изменение концентрации магния [300—303]. Удаление ионов магния путем диализа из антивирусного агента хеланина (рибонуклеопротеида из *Penicillium funiculosum*) вызывает потерю его активности [304].

В рибосомальных фракциях из *Escherichia coli* обнаружены спермидин и путресцин. Спермидин оказывает стабилизирующее действие (усиливаемое добавлением ионов магния) на эти нуклеопротеиды, которые в противном случае имеют тенденцию к распаду [305]. Кроме того, после расщепления рибонуклеопротеидных частиц посредством удаления ионов магния с помощью этилендиаминтетрауксусной кислоты обнаружены полипептиды, аминокислоты и 1,3-диаминопропан. Диамины присутствуют в количествах, достаточных для нейтрализации по меньшей мере трети всех диссоциирующих фосфатных групп рибонуклеиновой кислоты [306].

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

ВЫДЕЛЕНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Живые клетки, за исключением сперматозоидов, в норме содержат значительно больше рибонуклеиновой, чем дезоксирибонуклеиновой кислоты. На методы выделения дезоксирибонуклеиновых кислот оказало большое влияние то обстоятельство, что, тогда как рибонуклеопротеиды и рибонуклеиновые кислоты растворимы в разбавленном (0,15 М) растворе хлористого натрия, дезоксирибонуклеопротеидные комплексы фактически в нем нерастворимы. Поэтому гомогенизированный орган или организм тщательно промывают разбавленным солевым раствором, из остатка с помощью крепкого солевого раствора экстрагируют дезоксирибонуклеиновую кислоту, которую осаждают затем добавлением этанола [307, 308]. С другой стороны, элюирование того же остатка водой дает

раствор, из которого при добавлении соли выпадает дезоксирибонуклеопротеид [309—312]. Расщепление нуклеопротеида, который в основном представляет собой солеподобный комплекс между полиосновными и поликислотными электролитами, легко достигается растворением в крепком солевом растворе [313, 314] или обработкой тиоцианатом калия [315]. Большую часть белка можно удалить либо добавлением этанола (протамины и гистоны остаются в растворе [316]), либо эмульгированием с помощью хлороформа и амилового или октилового спирта (белок образует с хлороформом гель) [4, 317]. Широко применялась также обработка детергентами [318]. Позднее дезоксирибонуклеиновые кислоты выделяли с помощью экстракции водными *n*-аминосалицилат — фенольными растворами [319]. При использовании этого метода были получены препараты дезоксирибонуклеиновой кислоты, из которых одни содержали остаточный белок, тогда как другие были фактически свободны от белка, что указывает на то, что характер связи белок — нуклеиновая кислота различен в различных тканях [320]. Удобная модификация состоит в гомогенизировании животной ткани в 0,15 *M* растворе фенолфталеиндифосфата с последующим добавлением фенола для осаждения ДНК (свободной от РНК) с хорошим выходом [321, 322]. В случае бактерий, чувствительных к лизоциму, полезна предварительная обработка этим ферментом (для разрушения клеточной стенки) [323]. С другой стороны, часто успешно применялся лизис лаурилсульфатом натрия; так получена биологически активная высокополимерная ДНК (молекулярный вес от 8 до $12 \cdot 10^6$) из различных видов бактерий [324]. Перед экстракцией дезоксирибонуклеиновой кислоты из сперматозоидов млекопитающих необходимо переваривание трипсином (или эквивалентная обработка) [325]. В случае спермиев быка или человека особенно полезна предварительная обработка 2-меркаптоэтанолом (с последующим перевариванием трипсином) для разрушения непроницаемой кератиноподобной мембраны, окружающей головку сперматозоида [326]. Необходимость в восстанавливающем агенте (окисляющие или образующие меркаптиды агенты не эффективны) позволяет предположить наличие какой-то серосодержащей связи между ДНК и белковой оболочкой. Кислотный гидролиз ДНК, выделенной из сперматозоидов быка, обнаруживает присутствие около 0,1% аминокислот (или белка) с высоким содержанием серина [326].

Дезоксирибонуклеиновые кислоты, каким бы способом они не выделялись, представляют собой смеси полимеров различного молекулярного веса, за исключением образцов, полученных из некоторых видов бактериофагов. Большинство препаратов, кроме того, что они состоят из полимеров с различной последовательностью нуклеотидов, оказываются полидисперсными в отношении молекулярного веса вследствие гидродинамических разрушений в про-

цессе выделения, а также вследствие сопутствующего выделению распада, ферментативного или неферментативного, и процессов макромолекулярной агрегации. Поэтому, как и в случае рибонуклеиновых кислот, большое значение имеет фракционирование выделенных дезоксирибонуклеиновых кислот на однородные по молекулярному весу (или по составу агрегатов) образцы.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ

Ранний метод разделения заключался в фракционной диссоциации гелей дезоксирибонуклеопротеида (например, нуклеогистона) посредством экстракции водными растворами хлористого натрия увеличивающейся молярности. Таким путем препараты дезоксирибонуклеиновой кислоты были разделены на ряд фракций, характеризующихся различным отношением содержания аденина с тиминном к сумме гуанина с цитозином, причем более легко выделялись фракции, обогащенные гуанином и цитозином [327—331]. Сходные результаты были получены при хроматографическом отделении дезоксирибонуклеиновой кислоты от гистона, адсорбированного на кизельгуре, с применением градиентного элюирования растворами хлористого натрия [332]. В улучшенном варианте этого метода очищенные фракции гистона сочетались с *n*-аминобензилцеллюлозой с образованием диазомостиков от тирозиновых и гистидиновых групп белка [333]. Описано также фракционирование нуклеиновых кислот на метилированном сыровоточном альбумине (с кизельгуром в качестве носителя) [551, 552, 558]. Скорость элюирования с колонки солевыми растворами увеличивающейся концентрации зависит от молекулярного веса, состава (нуклеиновые кислоты с высоким содержанием гуанина с цитозином элюируются легче) и вторичной структуры (денатурированная ДНК прочнее удерживается колонкой, чем нативная). Таким способом из ДНК морского краба *Cancer borealis* выделен природный компонент — полидезоксидениловая-тимидиловая кислота [558]. Фракционирование дезоксирибонуклеиновых кислот проводилось также посредством градиентного элюирования с колонки, наполненной фосфатом кальция [334, 335], но самое ценное, возможно, в разработанных до сих пор методах хроматографии на колонках заключается в применении целлюлозных анионообменных препаратов.

Применение для фракционирования дезоксирибонуклеиновых кислот целлюлозного анионообменного препарата ЭКТЕОЛА оказалось очень успешным. Метод хорошо воспроизводим, обеспечивает количественные выходы и применим к материалу с молекулярным весом от нескольких сотен до нескольких миллионов [336—341]. Размер и форма молекул — важные факторы во фракционирова-

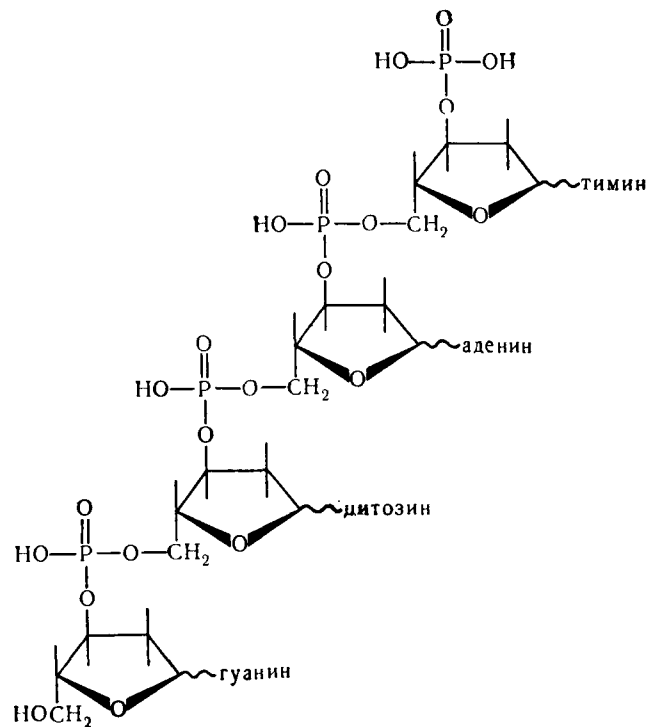
нии, но возможно некоторое влияние оказывает природа и распределение оснований. Хотя полученные индивидуальные фракции нельзя считать полностью гомогенными (ввиду природы дезоксирибонуклеиновых кислот маловероятно, что этого можно достичь применением какого-либо одного метода), метод является высокоэффективным. Кроме фракционирования полидезоксирибонуклеотидов по молекулярному весу, получено эффективное отделение дезоксирибонуклеиновой кислоты от полиадениловой кислоты или рибонуклеиновой кислоты от дезоксирибонуклеиновой кислоты из того же источника (*E. coli*), но в которой тимин частично заменен 5-бромурацилом. Значительной деструкции биологически активных дезоксирибонуклеиновых кислот при адсорбции и элюировании с ЭКТЕОЛА не наблюдается; так, была достигнута значительная степень фракционирования трансформирующей ДНК из пневмококка. Представляет интерес то наблюдение, что многие различные фракции обнаруживают один и тот же характер биологической активности, хотя количественно они различаются. Достигнуто также частичное разделение различных трансформирующих активностей. Как и следовало ожидать, на хроматографические профили элюирования сильное влияние оказывает метод выделения. Исследование относительного содержания пуринов и пиримидинов в различных фракциях препаратов дезоксинуклеиновой кислоты из тимуса телят обнаружило широкие вариации в соотношении оснований. В частности, хотя отношение пуринов к пиримидинам всегда было близко к единице, отношения аденина к тимину и гуанина к цитозину значительно отличались от часто получаемого значения 1,0, которое вытекает из комплементарности специфических оснований в двуспиральной вторичной структуре дезоксирибонуклеиновой кислоты. Это указывает на то, что либо в смеси присутствуют одиночные цепи полидезоксирибонуклеотидов (артефакты или подлинные *in vivo*-компоненты), либо абсолютная система спаривания оснований, обычно приписываемая дезоксирибонуклеиновой кислоте с двуспиральной структурой, не так уж абсолютна, т. е. в некоторых фракциях двухцепочечной ДНК может наблюдаться некоторая некомплементарность (приводящая, возможно, к образованию петель в не соответствующих друг другу участках цепей).

ОСНОВНЫЕ ЧЕРТЫ СТРОЕНИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Как и в случае рибонуклеиновых кислот, в ранних работах по определению характера связи между низкомолекулярными компонентами дезоксинуклеиновой кислоты был предложен ряд структур, которые теперь показали бы весьма нелепыми и многие

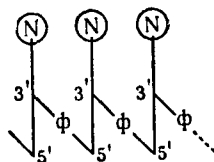
из которых могли быть отброшены как по эстетическим, так и по научным соображениям. В своих тщательных исследованиях Мишер впервые выделил полимеры со сравнительно высоким молекулярным весом, однако более поздние исследования выполнялись на сильно деградированных образцах. На технические трудности, связанные с изучением дезоксинуклеиновых кислот, указывали еще Левин и Лондон (1929 г.) при получении дезоксинуклеозидов биохимическим путем [342]. В этом методе раствор дезоксинуклеиновой кислоты пропускали через отрезок желудочно-кишечного тракта живой собаки при использовании фистулы желудка для обеспечения чистоты отрезка. После соответствующей инкубации элюата (собранного из фистулы в кишечнике) дезоксинуклеозиды были выделены с помощью трудоемкой процедуры, обеспечившей максимальный выход 1,5 г дезоксигуанозина из 200 г нуклеиновой кислоты, причем другие дезоксинуклеозиды получались в значительно меньших количествах. Последующее усовершенствование метода (применение ферментов из кишки телят и подавления фосфомоноэстеразной активности арсенатом) позволило получить дезоксимононуклеотиды; полагали, что они представляют собой 3'- или 5'-фосфаты, но точно установить структуру тогда не удалось [343]. Из смеси, полученной в результате кислотного гидролиза дезоксинуклеиновой кислоты в мягких условиях, были выделены дифосфаты тимидина и дезоксицитидина; обоим соединениям была приписана структура 3',5'-дифосфатов [344]. Гидролиз кислотой в более жестких условиях вызывал полное расщепление гликозидных связей с выделением пуриновых и пиримидиновых оснований. Обнаружено, что дезоксинуклеиновая кислота, в противоположность рибонуклеиновой кислоте, устойчива к обработке щелочью в мягких условиях. Дезаминирование олигодезоксинуклеотидов под действием азотистой кислоты может быть осуществлено без существенного дальнейшего распада [345].

На основании весьма ненадежных методов анализа (титрование с последующим тозилрованием и обработкой иодистым натрием) предположили, что тимидин имеет фуранозную структуру [346, 347]. В 1935 г. Левин и Типсон предложили для так называемой тетрануклеотидной единицы дезоксинуклеиновой кислоты структуру с 3'—5'-фосфодиэфирными связями, в которой пиримидиновые дезоксинуклеотиды чередовались с пуриновыми дезоксинуклеотидами [347]. Хотя, как теперь известно, эта структура и была в основном правильной, она базировалась исключительно на предположениях и аналогиях, более или менее приемлемых. В частности, выделение 2-дезоксирибозы из дезоксигуанозина и установление фуранозной структуры тимидина (что до некоторой степени подтверждается отсутствием реакции нуклеозида с боратом) явились слабым подтверждением той концепции, что углеводная



часть во всех дезоксинуклеозидах представлена 2-дезоксид-рибофуранозой.

К 1939 г. стало ясно, что молекулярный вес дезоксинуклеиновой кислоты сильно зависит от различий в методах выделения, поэтому тетра-нуклеотидная теория была соответствующим образом модифицирована. Однако ошибочная концепция минимальной повторяющейся тетра-нуклеотидной единицы, содержащей четыре основания в определенном порядке, продолжала существовать, и лишь с появлением достаточно точных и простых аналитических методов термин тетра-нуклеотид полностью потерял свое прежнее значение.



С установлением для дезоксинуклеотидов, полученных из дезоксинуклеиновой кислоты под действием кишечной диэстеразы, структуры 5'-фосфатов [348] становится ясным, что основной межнуклеотидной связью является 3'—5'-фосфодиэфирная группировка. На основании этого Браун и Тодд предложили для дезоксинуклеиновых кислот ту же структуру, что и для рибонуклеиновых кислот, одновременно объяснив различия в устойчивости этих двух типов полимеров по отношению к кислоте и щелочи [81]. Как упоминалось выше, дезоксинуклеиновая кислота проявляет нормальную устойчивость к щелочному гидролизу, характерную для диалкилфосфатов, в то время как рибонуклеиновая кислота в этих же условиях легко расщепляется благодаря присутствию смежных *цис*-гидроксильных групп.

Впоследствии для дезоксинуклеозидов была полностью установлена β -D-2-деоксирибофуранозная структура [91], и сравнением свойств синтетического тиминового динуклеотида, содержащего 3'—5'-межнуклеотидную связь, со свойствами олигонуклеотидов, полученных в результате ферментативного гидролиза дезоксинуклеиновой кислоты [349], было дано подтверждение основной структуры ДНК.

СТРУКТУРА ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ

Окончательное установление первичной структуры дезоксинуклеиновых кислот связано с рядом проблем, еще труднее разрешимых, чем в случае рибонуклеиновых кислот, и достижений в этой области пока еще мало. Тем не менее достигнут некоторый успех в определении последовательности оснований в одиночной цепи олигодезоксинуклеотидов. Такие продукты распада легко получают в результате обработки дезоксирибонуклеиновых кислот дезоксирибонуклеазами. Панкреатическая дезоксирибонуклеаза [350] (дезоксирибонуклеаза I) активна в нейтральном растворе, требует присутствия магния или некоторых других двухвалентных катионов и имеет минимальный молекулярный вес 61566 [351]. Этот фермент катализирует гидролиз ДНК до сложной смеси, из которой с помощью хроматографии на бумаге, электрофореза [352] и ионообменных методов [353] были выделены дезоксинуклеозид-5'-фосфаты (~1%), ряд динуклеотидов (~16%), тринуклеотиды и более высокомолекулярные олигодезоксинуклеотиды с 5'-фосфатной группой на конце. Хотя специфичность действия дезоксирибонуклеазы I не установлена полностью, ясно, что расщепление происходит по связи —3'-O—P. Изучение динуклеотидов, содержащих как пуриновые, так и пиримидиновые основания, указало на то, что такие соединения являются почти исключительно 5'ф—Пир—3'ф—5'Пур, изомерная же последовательность 5'ф—Пур—3'ф—5'Пир фактически отсутствует. Предположение, что ферментом атакуются преимуще-

существенно связи пурин-3'-ф-5'-пиримидин [354], получило существенное подтверждение на основании гидролиза дезоксирибонуклеазой I тринуклеотида (д)-А3'ф5'А 3'ф5'Т3'ф до (д)-А3'ф5'А и тимидин-3',5'-дифосфата. Поскольку соответствующие динуклеотиды не подвергаются действию фермента, то для расщепления связи пурин — пиримидин в олигодезоксинуклеотидах, содержащих конечный 3'-фосфат [355], необходима, по-видимому, минимальная длина цепи в три нуклеотида. Предварительные исследования, с использованием в качестве субстратов синтетических олигодезоксинуклеотидов, показывают, что гомополимеры дезоксиадениловой, дезоксцитидиловой и тимидиловой кислот с длиной цепи большей, чем тринуклеотид, полностью расщепляются ферментом, но олигодезоксиадениловая кислота атакуется значительно быстрее, чем пиримидиновые соединения [356].

Дезоксирибонуклеаза стрептококка (стрептодорназа) также расщепляет межнуклеотидные связи, образуя фрагменты различной длины, несущие на конце 5'-фосфатную группу. При этом получают главным образом олигодезоксинуклеотиды с длиной цепи более двух нуклеотидов, а также небольшое количество динуклеотидов и следы моонуклеотидов [357]. Анализ этих продуктов указывает на преимущественное расщепление связей ф5'-пиримидин-3'-ф5'-пурин, т. е. действие этого фермента комплементарно действию панкреатической дезоксирибонуклеазы I. Оба эти фермента действуют при одних и тех же условиях pH, требуют присутствия одинаковых ионов металлов и оба являются эндонуклеазами (расщепляют цепь не постепенно, а сразу по всей ее длине) [357]. Присутствующие в каждом случае в гидролизатах следы моонуклеотидов могут представлять собой концевые нуклеотиды цепи ДНК. Не вполне ясно, заключается ли действие всех таких ферментов на нативную двуспиральную дезоксирибонуклеиновую кислоту в расщеплении межнуклеотидных связей с последующим разделением олигонуклеотидных тяжей [358] или, наоборот, в разрыве водородных связей и разделении цепей ДНК, за которым следует гидролиз ковалентных связей. Существуют некоторые данные, показывающие, что на начальных этапах действия дезоксирибонуклеазы гидролизу предшествуют структурные изменения [359].

Из млекопитающих [360—363] и бактерий [364] выделены дезоксирибонуклеазы, которые обладают оптимальным действием при кислом pH, не требуют присутствия ионов магния и объединены под общим названием дезоксирибонуклеаза II. Кроме того, они отличаются от дезоксирибонуклеазы I тем, что расщепление межнуклеотидной связи происходит между фосфатом и кислородом при C₅-атоме с образованием олигодезоксинуклеотидов, содержащих концевую 3'-моноэтерифицированную фосфатную группу [365, 366]. Гидролиз ДНК дезоксирибонуклеазой II селезенки

происходит быстро и дает полидезоксинуклеотиды со средней длиной цепи десять нуклеотидов. Последующий гидролиз протекает значительно медленнее [367].

Аналогичная специфичность, находящая отражение в получении продуктов с концевой 3'-фосфатной группой, проявляется нуклеазой, выделенной из культуральной среды *Micrococcus pyogenes* [368—371]. Из рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот и из синтезированной ферментативным путем полиАЦГУ [372] получаются нуклеозид-3'-фосфаты и ди- и тринуклеотиды, несущие 3'-моноэтерифицированный фосфат, но при использовании в качестве субстратов полученных биохимическим путем полиадениловой, полиуридиловой или полицитидиловой кислот или двухцепочечного сополимера (дезоксиадениловой — тимидиловой) кислоты в конечном гидролизате обнаруживаются лишь моно- и динуклеотиды. Синтезированная химическим путем полигуаниловая кислота (содержащая 2'—5'- и 3'—5'-фосфодиэфирные связи) устойчива к гидролизу, хотя аналогичная полиадениловая кислота частично гидролизует. Это является, вероятно, результатом исключительно легкой агрегации олигогуаниловой кислоты по сравнению с другими олигонуклеотидами. На устойчивость связей-3'ф5'- указывает тот факт, что основными моонуклеотидными компонентами в гидролизатах ДНК являются дезоксиаденозин-3'-фосфат, тимидин-3'-фосфат и, в меньшей степени, дезоксцитидин-3'-фосфат, а дезоксигуанозин-3'-фосфат образуется лишь в незначительных количествах. Изучение скорости освобождения различных фрагментов из нативных и денатурированных нагреванием дезоксинуклеиновых кислот показало сильное преобладание первоначальной атаки фермента на нуклеотидные участки, содержащие основания аденин и тимин, как следствие «конформационной специфичности», возникающей в двойной спирали в результате более слабого водородного связывания пар оснований аденин — тимин по сравнению с более устойчивыми парами гуанин — цитозин. В присутствии больших количеств одноцепочечных полинуклеотидов специфичность фермента расширяется и начинают накапливаться фрагменты, содержащие гуанин и цитозин. Преимущественное воздействие этого фермента на «денатурированные участки» дезоксинуклеиновой кислоты предполагает возможное его использование для изучения структуры в местах расщепления, содержащих специфическую последовательность трех или четырех нуклеотидов [372].

Изучено также действие диэстеразы микрококка на РНК из вируса табачной мозаики [373]. И снова наблюдалось как эндо-, так и экзорасщепление полимера, причем последнее, по-видимому, происходит постепенно с 3'-фосфатного конца олигонуклеотидов, получившихся в результате эндорасщепления, но конечные продукты были (при использовании большого избытка фермента)

Вопреки имеющимся сообщениям, контролируемое выделение нуклеотидов из полимеров, содержащих несколько различных оснований, было бы более убедительной демонстрацией полезности метода, особенно потому, что помехи, возникающие в результате различных скоростей гидролиза участков с различной пурин-пиримидиновой последовательностью, искажают, как следовало ожидать, точную интерпретацию. Недостаток действия диэстеразы селезенки заключается в способности фермента катализировать трансферазные реакции, приводящие к синтезу высших гомологов, а недостаток диэстеразы змеиного яда — в том, что расщепление олигонуклеотидов, содержащих концевой 3'-фосфат, происходит постепенно, начиная с 3'-фосфатного конца молекулы, поскольку выделению нуклеозид-3',5'-дифосфатов предшествует выделение нуклеозидов и нуклеотидов [382]. Даже высокоочищенные препараты диэстеразы змеиного яда сохраняют, по-видимому, некоторую эндонуклеазную активность. Тем не менее постепенное освобождение концевых нуклеотидов оказалось полезным для того, чтобы отличить концевое наращивание от истинного синтеза, когда меченые дезоксинуклеотиды включаются в цепи ДНК [383, 384].

Полезное усовершенствование методов определения концевых групп заключается, по-видимому, в метилировании концевой моноэтерифицированной фосфатной группы в олигонуклеотидах под действием дициклогексилкарбодиимида и метанола. Последующий гидролиз при использовании соответствующих гидролитических методов дает метиловый эфир концевого нуклеотида или концевого олигонуклеотида. Чувствительность, вероятно, можно было бы значительно увеличить применением C^{14} -метанола [385]. Этот метод пока не удалось применить к полирибонуклеотидам (или к дезоксинуклеиновым кислотам). Концевую фосфатную группу в олигодезоксинуклеотидах удобнее пометить при помощи обработки олигомера этилхлорформинатом и три-*n*-бутиламином в водном растворе. В таких мягких условиях реакция, по-видимому, ограничивается тем, что образуются ангидриды с участием лишь концевых фосфатных групп. Последующая обработка диэстеразой дает мононуклеотиды и концевой ангидрид — нуклеотидэтилкарбонат. Можно также использовать неочищенный змеиный яд, поскольку концевой ангидрид устойчив к гидролизу, тогда как мононуклеотиды распадаются далее до нуклеозидов [18]. Предварительное исследование показало, что этот метод также применим к полирибонуклеотидам, содержащим концевую 5'-фосфатную группу.

Разработан метод ступенчатого расщепления олигодезоксинуклеотидов. Он включает каталитическое окисление концевой группы 5'- CH_2OH до карбоксильной группы с последующим элиминированием фосфата из 3'-положения (см. стр. 50).

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДОВ В ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТАХ

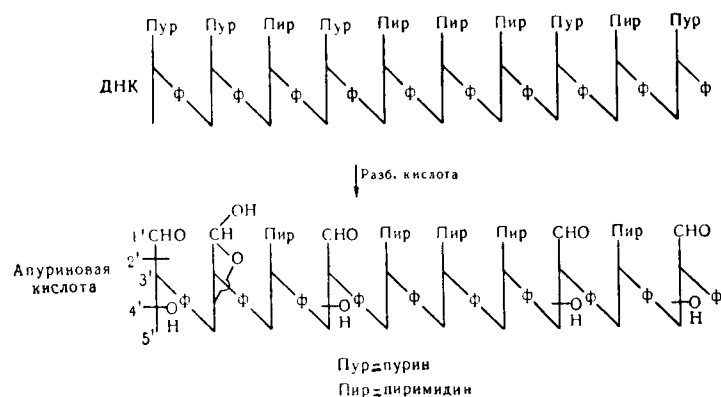
Исчерпывающее определение последовательности нуклеотидов в дезоксирибонуклеиновых кислотах ограничено рядом факторов, таких, как трудность получения гомогенных образцов с длиной цепи от 10000 до 200000 мононуклеотидов, малым разнообразием мононуклеотидов, составляющих полимер, и полимолекулярной природой агрегатов ДНК. Поэтому в настоящее время мало известно о фактической последовательности оснований в цепи дезоксирибонуклеиновой кислоты. Тем не менее ясно, что, как и в случае рибонуклеиновых кислот, в дезоксинуклеиновых кислотах присутствуют все возможные бинарные комбинации нуклеотидов, поскольку все они обнаружены в продуктах химического и ферментативного гидролиза. Поэтому простое повторение определенной последовательности основных нуклеотидов не имеет места*, хотя, конечно, это не строго доказано для всех видов молекул в данном препарате. Существенные различия в структуре дезоксинуклеиновых кислот из различных источников были установлены простым анализом состава оснований и количественным сравнением олигонуклеотидов и недиагностических, устойчивых к ферментам полидезоксинуклеотидных обломков, полученных в результате действия дезоксирибонуклеаз [386, 387]. Эти различия обнаруживаются также путем измерения удельной активности разделенных хроматографически полидезоксинуклеотидных фракций из термически обработанной смеси меченой P^{32} ДНК и немеченой ДНК различного происхождения [388]. Хотя некоторый распад, наблюдаемый при нагревании водных растворов дезоксинуклеиновых кислот, может быть результатом простого гидролиза фосфодиэфирных связей, более вероятное объяснение заключается в расщеплении пуриновых (особенно гуаниновых) гликозидных связей [389] при pH 7 с последующим элиминированием фосфата из остатков дезоксирибозы и разрывом полинуклеотидной цепи.

Прямое сравнение дезоксинуклеиновых кислот различного происхождения удалось провести после химической обработки, в результате которой были предпочтительно удалены все или почти все пуриновые остатки. Эти исследования также указывают на то, что в изученных гетерогенных образцах количественное распределение различных оснований и их последовательность не беспорядочны.

* Исключение составляет сополимер дезоксиадениловой — тимидиловой кислоты из краба, упомянутый на стр. 417. Показано [573], что по крайней мере 93% адениновых и тиминового нуклеотидов располагается в определенной чередующейся последовательности.

АПУРИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Освобожденные от пуринов продукты, полученные путем обработки дезоксинуклеиновой кислоты разбавленной минеральной кислотой, впервые описаны около 70 лет назад и названы «тиминовой кислотой» [390]. Впоследствии было обнаружено присутствие наряду с тиминном цитозина [391], но, несмотря на это, неправильное название продолжало существовать до тех пор, пока не было заменено термином апуриновая кислота [392]. Образование подобных продуктов является результатом исключительной неустойчивости в кислом растворе пурин-дезоксигликозидных связей по сравнению с пиримидин-гликозидными и фосфодиэфирными связями.



Хотя в настоящее время применяются достаточно мягкие условия получения апуриновых кислот (такие, как гидролиз [392] при 37° и pH 1,6 или обработка [393] ионообменными смолами), все же при этом имеет место также расщепление фосфодиэфирных связей, продукты получают с гораздо меньшей длиной цепи и имеют молекулярный вес [394, 395] от 3500 до 15000 по сравнению с молекулярным весом в несколько миллионов, характерным для исходных полимеров. Как и при гидролизе в нейтральных растворах, главной причиной расщепления цепи является легкое отщепление фосфата из негликозидных звеньев дезоксирибозы.

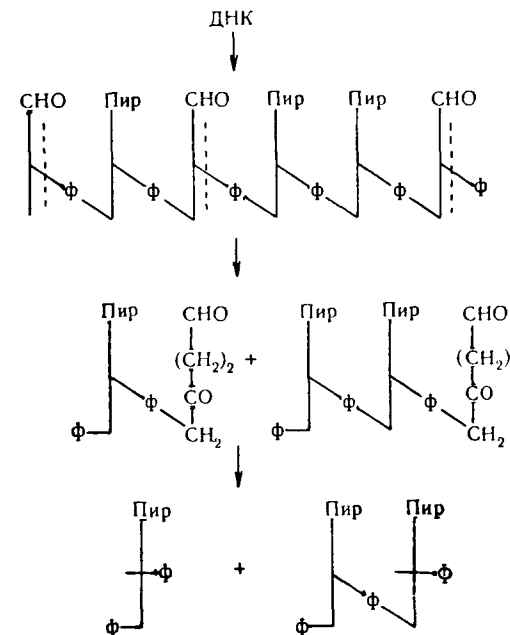
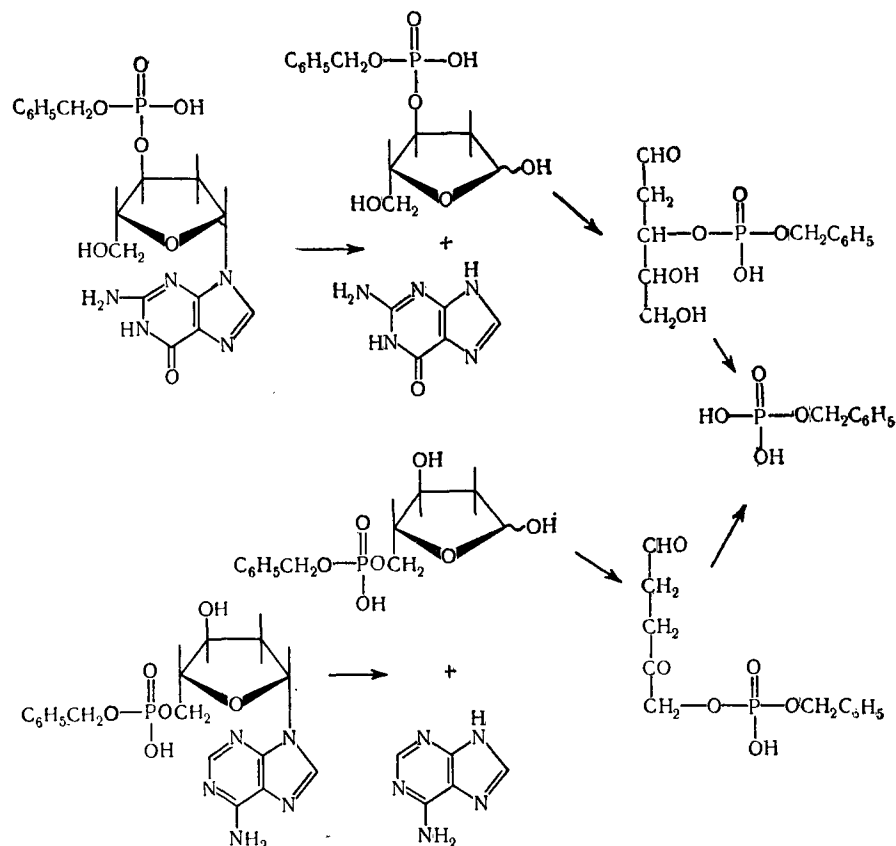
Апуриновые кислоты проявляют восстанавливающие свойства, характерные для негликозидных углеводов, а также реагируют с такими типичными реагентами, как гидроксилламин, 2,4-динитрофенилгидразин, меркаптаны и реактив Шиффа [395]. Полярографический анализ показал присутствие некоторого количества свободных альдегидных групп [396], как можно было ожидать на основании общих свойств 2-деоксирибозы. Восстановление боргидридом натрия превращает остатки дезоксирибозофосфата в эфиры

2-деоксирибита [394] и сопровождается, возможно, частичным разрывом цепи.

Как упоминалось выше, кислотный гидролиз ДНК в более жестких условиях дает 3',5'-дифосфаты тимидина и дезоксицитидина [397—400]. Эти нуклеотиды, описанные первоначально как производные гексозы, имели некоторое значение при установлении структуры дезоксинуклеиновых кислот. Впоследствии углевод был идентифицирован как 2-деоксирибоза [401], но образование значительных количеств дифосфатов при кислотном расщеплении ДНК подверглось несколько необоснованному сомнению [402]. Повторное исследование с применением современных методов полностью подтвердило первоначальные наблюдения относительно того, что из кислотных гидролизатов ДНК можно выделить большое количество пиримидиновых дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфатов [403] и гораздо меньшее количество 3'- и 5'-монофосфатов тимидина и дезоксицитидина [91]. Показано было также присутствие более сложных пиримидиндезоксинуклеотидных продуктов (главным образом ди- и тринуклеотидов, содержащих дополнительный концевой фосфат). Принимая во внимание относительные количества дезоксинуклеозидмоно- и дезоксинуклеозиддифосфатов, предположили, что кислотный гидролиз ДНК не протекает исключительно путем хаотического расщепления межнуклеотидных связей, но что вслед за первоначальным удалением пуриновых остатков происходит предпочтительное отщепление фосфата от образовавшихся негликозидных звеньев дезоксирибозы, что приводит к образованию пиримидиновых дезоксинуклеотид-3',5'-дифосфатов из каждого участка полинуклеотидной цепи, где пиримидиновое звено окружено пуриновыми [403].

Изучение продуктов, полученных в результате кислотного гидролиза бензиловых эфиров различных дезоксинуклеотидов, подтвердило такой механизм гидролиза. Так, например, как дезоксигуанозин-3'-бензилфосфат, так и дезоксиаденозин-3'-бензилфосфат быстро гидролизуются до соответствующего пурина и 2-деоксирибозо-3'-бензилфосфата. При дальнейшем распаде углеводного производного получается бензилфосфорная кислота. Аналогично от 2-деоксирибозо-5-бензилфосфата, получающегося при действии кислоты на дезоксиаденозин-5'-бензилфосфат, быстро отщепляется бензилфосфорная кислота. Однако бензиловые эфиры пиримидиновых дезоксинуклеотидов сравнительно устойчивы, и в тех же условиях конечными продуктами гидролиза являются, кроме неизмененных бензиловых эфиров, свободные нуклеотиды и другие продукты расщепления в небольших (но существенных) количествах [91]. Возможное объяснение такого преимущественного расщепления одних нуклеотидов по сравнению с другими заключается в свойствах фосфорных эфиров β-альдегидоспиртов [404, 405], предполагающих

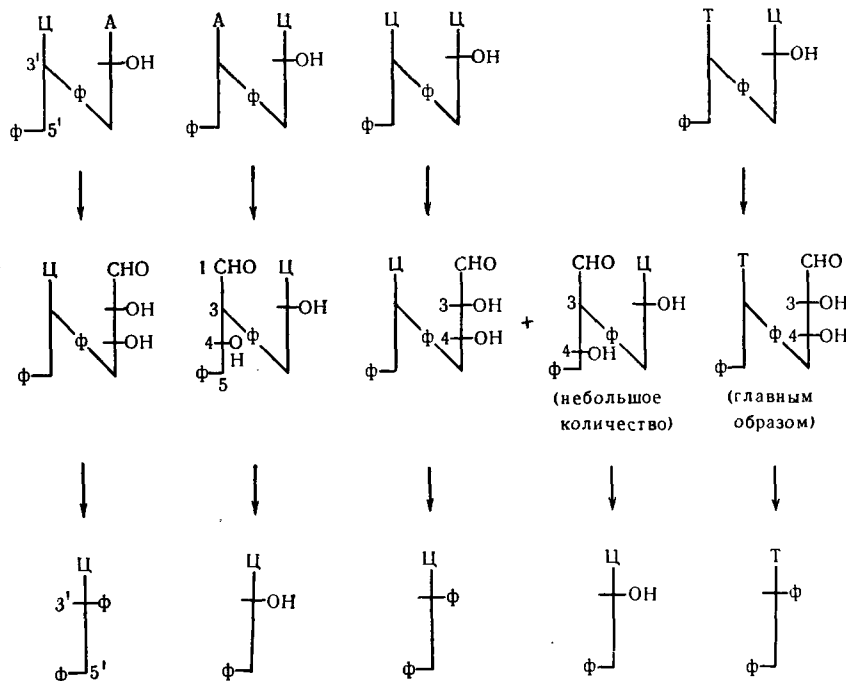
исключительно легкое отщепление фосфатной группы при атоме C_3 звена дезоксирибозы (находящейся в β -положении по отношению к свободной или скрытой альдегидной группе углевода) [406]. Далее, поскольку кислотная обработка 2-дезоксирибозы в мягких условиях дает, как известно, ω -оксилевулиновый альдегид [407], можно также ожидать легкого отщепления фосфата от атомов C_5 измененных звеньев дезоксирибозы [91] вследствие неустойчивости α -кетофосфатных эфиров [408]. Поэтому кислотный гидролиз дезоксинуклеиновых кислот представляет собой гидролиз пуриновых гликозидных связей с последующим расщеплением фосфодиэфирных связей между атомами C_3 и C_5 дезоксирибозных звеньев, окруженных пиримидиновыми дезоксинуклеозидными звеньями или участками из двух и более пиримидиновых нуклеотидов, с образованием продуктов, содержащих как 3'-, так и 5'-концевую моноэтерифицированную фосфатную группу.



Другой механизм гидролиза, рассматривающий образование 3,4- или 4,5-циклофосфатов при участии C_4 -гидроксильной группы ациклической формы апуриновых звеньев дезоксирибозы, является, по-видимому, менее вероятным, поскольку промежуточные продукты такого рода могли бы дать пиримидиновые дезоксинуклеозиды или пиримидиновые полидезоксинуклеотиды, которые лишены концевой моноэтерифицированной фосфатной группы. Небольшие количества дезоксинуклеозид-3'- и дезоксинуклеозид-5'-фосфатов возможно образуются в результате такого механизма гидролиза или в результате вторичного гидролиза образовавшихся ранее дезоксинуклеотидов или олигодезоксинуклеотидов, имеющих две концевые фосфатные группы.

Детальное исследование кислотного гидролиза ряда дидезоксинуклеотидов (выделенных из ферментативных гидролизатов ДНК) полностью подтвердило описанный выше основной механизм гидролиза и позволило распространить его также на гидролиз полипиримидиновых фрагментов [409]. Так, (д)- $\phi 5'$ Ц $\phi 3'$ $\phi 5'$ А быстро и количественно распадается на дезоксицитидин-3',5'-дифосфат (и аденин), тогда как изомерный динуклеотид (д)- $\phi 5'$ А $\phi 3'$ $\phi 5'$ Ц дает дезоксицитидин-5'-фосфат. Продолжительный гидролиз приводит к расщеплению цитозиновых гликозидных связей и, в меньшей степени, тиминовых связей, причем его скорость сильно зависит

от количества фосфатных остатков, связанных с углеводом. (Дезоксицитидин и тимидин значительно менее устойчивы, чем их фосфатные эфиры, особенно 3',5'-дифосфаты.) В типичных условиях гидролиза динуклеотид (д)-ф5'Ц3'ф5'Ц медленно распадается на цитозин



(происходящий главным образом из моноэтерифицированного дезоксинуклеозидного звена), дезоксицитидин-3',5'-дифосфат и дезоксицитидин-5'-фосфат (небольшое количество). Подобным же образом при обработке кислотой смеси изомерных динуклеотидов, содержащих как тимидин, так и дезоксицитидин, получают соответствующие дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфаты, причем большая устойчивость тиминовых гликозидных связей по сравнению с цитозиновыми оказывает значительное влияние на соотношение продуктов [409].

Дальнейшее изучение кислотных гидролизатов дезоксинуклеиновых кислот показало, что, кроме простых дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфатов, в гидролизатах действительно присутствуют пиримидиновые олигодезоксинуклеотиды ряда (пиримидиндезоксинуклеозид)_n (фосфат)_{n+1} и что они образуют в соответствии с описанным механизмом элиминирования основную массу пиримидиннуклеотидных продуктов деградации [410, 411]. С помощью ионообменной

хроматографии было осуществлено разделение ряда динуклеозидтрифосфатов, тринуклеозидтетрафосфатов и высших олигодезоксинуклеотидов и показано, последовательность цитозина и тимина что может быть самой разнообразной.

Количественное определение пиримидиновых дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфатов и низкомолекулярных олигонуклеотидов, освобождающихся из дезоксинуклеиновых кислот при кислотном гидролизе в стандартных условиях (так называемый метод дифференциального распределительного анализа [411]) с применением поправки на вторичные гидролитические реакции привело к установлению распределения тимина и цитозина. Сравнение результатов для дезоксинуклеиновых кислот из различных источников показало, что распределение пиримидинов (а отсюда, возможно, и пуринов) варьирует в препаратах различного происхождения (и в различных фракциях одного и того же препарата). В общем по сравнению с цитозином значительно большая пропорция тимина встречается в виде одиночных звеньев, ограниченных пуриновыми, и около 70% всех пиримидиновых звеньев присутствует в виде олигонуклеотидных участков из трех и более рядом стоящих пиримидинов. Полученные результаты показывают, что распределение компонентов далеко не беспорядочно (хотя гетерогенность исследованных дезоксинуклеиновых кислот могла бы привести к появлению полной беспорядочности), причем выходы продуктов с низким молекулярным весом значительно ниже, чем предсказано математическими расчетами [411].

Применение того же метода к дезоксирибонуклеиновой кислоте из зародышей ржи, содержащей сравнительно высокие количества минорного компонента 5-метилцитозина, дает аналогичные результаты в отношении распределения тимина и цитозина [412]. Кроме того, установлено присутствие 5-метил-2'-дезоксцитидин-3',5'-дифосфата и смеси изомерных динуклеозидтрифосфатов, производных 5-метилцитозина, и цитозина или тимина соответственно [413]. О небеспорядочном распределении минорного основания можно также заключить из того факта, что в виде дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфата, соответствующего одиночным звеньям, окруженным в исходной цепи пуриновыми нуклеотидами, выделяется 5-метилцитозина меньше, чем теоретические 25% (для случая беспорядочного распределения основания) от общего его содержания. Более того, распределение этого основания, как видно из относительных его количеств, образующихся в результате гидролиза либо в виде нуклеозид-3',5'-дифосфата, либо в составе пиримидиновых дидезоксинуклеозидтрифосфатов (из участков цепи ДНК, в которых два пиримидиновых звена ограничены пуриновыми), значительно отличается от распределения цитозина [412]. Изучение различных фракций дезоксирибонуклеиновой кислоты из зародышей ржи, полу-

ченных путем фракционной диссоциации нуклеопротеида, еще раз подтверждает, что в структурном отношении 5-метилцитозин не эквивалентен цитозину и не «заменяет» цитозин беспорядочным образом. Тем не менее отношение, равное единице, вытекающее из комплементарной природы двуспиральной структуры ДНК, сохраняется [412]. (Таким образом, общее содержание гуанина в каждой фракции равно суммарному количеству цитозина и 5-метилцитозина.)

Аналогичное расщепление дезоксинуклеиновой кислоты в очень мягких условиях происходит при обработке муравьиной кислотой, содержащей небольшое количество первичных или вторичных ароматических аминов, в частности дифениламина [414]. Механизм реакции или роль основания (присутствие которого необходимо) все еще не ясны, но, возможно, включают образование енамина с получающимися при гидролизе апуриновыми кислотами с последующим отщеплением фосфата. Как и в случае прямого кислотного гидролиза, образуется очень небольшое количество дезоксинуклеозидмонофосфатов, соответствующее количеству фосфатных остатков выделяется в виде неорганического фосфата, а основная часть нуклеотидных продуктов имеет общее строение (пиримидиндезоксинуклеозид)_n(фосфат)_{n+1}. Чтобы облегчить разделение и количественное определение, сложная смесь продуктов подвергалась обработке фосфомоноэстеразой (относительно свободной от диэстеразной активности) для удаления концевых фосфатных групп, а полученная в результате этого смесь дезоксинуклеозидов (из 3',5'-дифосфатов), динуклеозидфосфатов и высших гомологов анализировалась методами хроматографии на бумаге. При таком подходе в дезоксинуклеиновой кислоте из зубной железы телят обнаружено значительно больше моно- и дипиримидиновых звеньев, чем при применении ранее описанного метода деградации, но все же отмечено некоторое отклонение в пользу присутствия в цепи ДНК участков из трех или более последовательных пиримидиновых звеньев (61% по сравнению с 50% рассчитанными для случая беспорядочного распределения). Значительная разница в количествах двух изомерных по последовательности нуклеотидов (д)-ф5'Ц3'ф5'Т3'ф и (д)-ф5'Т3'ф5'Ц3'ф служит строгим доказательством того, что расположение нуклеотидов не беспорядочно [415]. Отношение этих двух динуклеозидфосфатных звеньев (ограниченных в исходной цепи пуриновыми звеньями) широко варьирует в дезоксинуклеиновых кислотах различного происхождения, как показано в табл. 6-4 [416].

Детальное изучение продуктов распада, образовавшихся из ДНК четырех видов бактерий и четырех видов животных под действием муравьиной кислоты и дифениламина, показало, что все ДНК отличаются друг от друга и от полинуклеотида с беспорядочным чере-

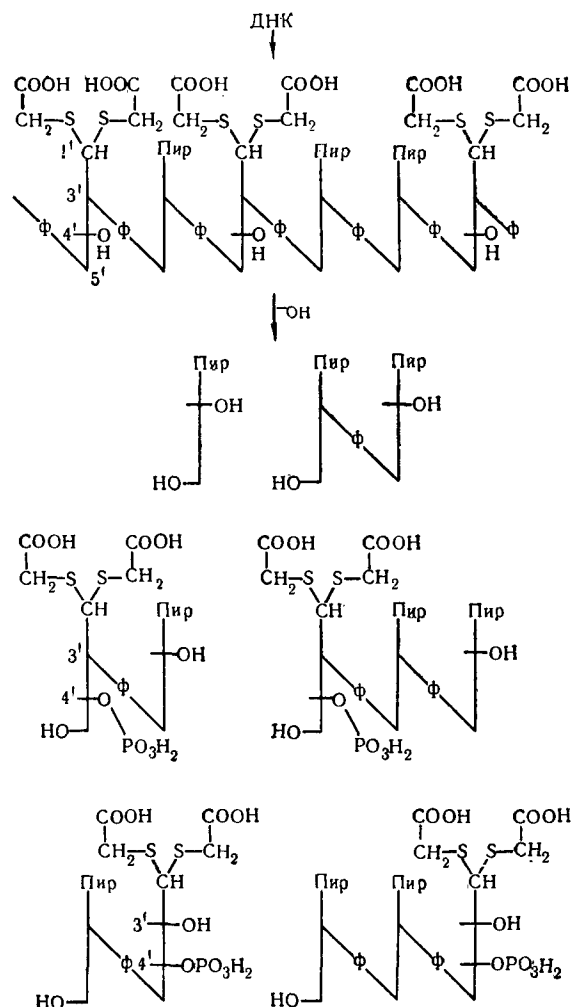
дованием оснований. Однако нельзя было отметить никакой четкой закономерности и никакой общей тенденции пиримидиновых звеньев группироваться упорядоченно [417] в противоположность данным, полученным в результате прямого кислотного гидролиза дезоксинуклеиновых кислот. Причиной расхождения между двумя методами может являться присутствие в используемой фосфомоноэстеразе диэстеразной активности; обоим методам присущ ряд экспериментальных неточностей.

Таблица 6-4

Источник ДНК	Молярное отношение (д)-Ц3'ф5'Т к (д)-Т3'ф5'Ц
Морской еж	0,8
<i>E. coli</i>	0,9
Зубная железа телят	1,4
Сельдь	1,6
Лосось	1,7

При еще одной попытке определить распределение пиримидинов в дезоксинуклеиновых кислотах исследовалось меркаптилирование остатков дезоксирибозы, связанных в исходной цепи с пуриновыми звеньями, с последующим расщеплением цепи щелочью. При обработке ДНК из икры сельди этилмеркаптаном в присутствии соляной кислоты получается с низким выходом меркаптилированный полимер, при щелочном гидролизе которого образуется ряд более низкомолекулярных продуктов [418]. Применение меркаптоуксусной кислоты в присутствии безводного хлорида цинка и сульфата натрия позволяет достичь более количественных результатов [419, 420]. При щелочном гидролизе ди(карбоксиметил)дитиоацетата альдегидоапуриновой кислоты, полученной из дезоксинуклеиновой кислоты зубной железы телят, образуется большое количество компонентов, в том числе олигонуклеотидов, содержащих по меньшей мере три последовательных пиримидиновых звена. Вследствие доступности гидроксильной группы при атоме С₄ в ациклической форме дезоксирибозных звеньев механизм щелочного гидролиза аналогичен механизму гидролиза рибонуклеиновых кислот, так что получается ряд продуктов с общим строением (пиримидин)_n(фосфат)_{n-1}, т. е. из пиримидиновых звеньев цепи, граничащих с пуриновыми, образуются дезоксинуклеозиды, тогда как участки с двумя или более последовательными пиримидиновыми звеньями превращаются в аналогичные олигонуклеотиды, лишенные кон-

цевого моноэтерифицированного фосфата. Однако при беспорядочном гидролизе промежуточных циклофосфатов получают две другие серии продуктов, содержащих в качестве конечного звена



2-дезоксинальдегид-D-рибозид(карбоксиметил)дитиоацеталь-4-фосфат, присоединенный к конечному 5'-или 3'-фосфату олигонуклеотида. Защита гидроксильной группы при атоме C_4 сахара фосфатной группой препятствует дальнейшей циклизации с участием соседней фосфодиэфирной связи, и такие продукты устойчивы поэтому

к обработке щелочью, проводимой в мягких условиях. Можно также ожидать образования небольших количеств продуктов четвертого типа — пиримидиновых дезоксинуклеотидных звеньев, несущих остатки дезоксирибозомеркаптал-4-фосфата как с 3', так и с 5'-фосфатного конца. Следует отметить, что защита атома C_4 (меркаптированием) дезоксирибозного компонента предотвращает гидролиз щелочью, который привел бы к отщеплению фосфата.

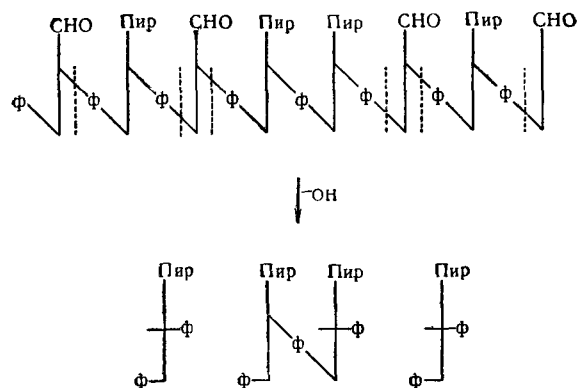
Несмотря на очевидные ограничения этого метода, сравнение дезоксинуклеиновых кислот из зубной железы телят и *Mycobacterium phlei* позволило обнаружить различный характер распределения нуклеотидов (или различия в путях распада), и в каждом случае распределение нуклеотидов не было беспорядочным [421].

Вследствие присущих аналитическим методам ошибок, немалая часть которых является результатом пренебрежения гипохромическим эффектом в олигонуклеотидах, немногие из обсужденных выше результатов имеют точность более $\pm 10\%$. Другим важным фактором, маскирующим наличие упорядоченности в структуре ДНК, является хаотическое появление в результате гидролиза большого количества разнообразных осколков, присутствовавших в исходном полимере в определенном порядке. Этот фактор будет оставаться существенным, пока не станут доступными достаточно гомогенные препараты дезоксинуклеиновых кислот. Тем не менее специфическое распределение пуриновых и пиримидиновых оснований действительно, по-видимому, имеет место. (Значительно более строгое доказательство наличия специфической последовательности обеспечивается физическими методами, см. гл. 8.)

ЩЕЛОЧНОЙ ГИДРОЛИЗ АПУРИНОВЫХ КИСЛОТ

Хотя при поверхностном рассмотрении щелочного гидролиза апуриновых кислот в качестве основного механизма гидролиза можно предположить промежуточное образование циклического фосфата при участии C_4 -гидроксильной группы в ациклической форме дезоксирибозных звеньев [422, 423], распад в значительной степени аналогичен распаду, происходящему при кислотном гидролизе [18, 424]. В соответствии с известными свойствами эфиров 2-дезоксисахаров, не имеющих гликозидной, ацетальной или меркапталльной защиты при атоме C_1 , в результате элиминирования фосфата (либо гидролиза) из дезоксирибозных звеньев (или продуктов деградации) образуются пиримидиновые дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфаты и ряд олигонуклеотидов с общим строением (пиримидин)_n(фосфат)_{n+1}. (Сравни щелочной гидролиз никотинамидадениндинуклеотида до АДФ, стр. 193.) Более детальные исследования [425] показали, что при pH 10 апуриновая кислота значительно менее

устойчива, чем рибонуклеиновая кислота и что при щелочном гидролизе образуется, кроме олигонуклеотидов, α, β -ненасыщенный альдегидфосфат (вероятно, в результате β -элиминирования фосфата из 3'-положения смежного апуринового звена дезоксирибозы). По количеству этого продукта можно предположить, что распад по меньшей мере на 45% происходит по механизму β -элиминирования; для оставшейся части не исключены иные пути гидролиза, и в некоторой степени распад может происходить путем циклофосфатообразования (хотя количество образовавшихся свободных пиримидиновых дезоксинуклеозидов чрезвычайно мало). Тем не менее кислотная обработка ДНК в мягких условиях (для удаления пуринов) с последующим щелочным гидролизом представляет собой другой подход к установлению распределения пиримидиновых звеньев. Поправки на расщепление пиримидиновых гликозидных связей, наблюдающееся при кислотной обработке в более жестких условиях, были бы излишни, а разделение и количественная оценка продуктов была бы облегчена предварительной обработкой фосфомоноэстеразой для удаления концевых моноэтерифицированных фосфатных остатков.



Апуриновая кислота распадается также при нагревании нейтральных незабуференных растворов ее натриевой соли [426]. При этом происходит быстрая потеря свободных альдегидных групп (но не потеря восстанавливающих свойств), за которой следует более медленное освобождение неорганического фосфата и свободного основания — цитозина (через 20 час при 100° до 95% от общего содержания цитозина). Образуются также тимидиловая кислота и тимидиновые олигонуклеотиды с эквимолекулярным отношением тимина к фосфату; они содержат, по-видимому, исключительно концевой 5'-фосфат (отщепление фосфата от атома C_3 смежного дезоксири-

бозного звена и при отсутствии щелочного распада сахара образование 4,5-циклофосфата в звене дезоксирибозы, ближайшем к тимидин-3'-фосфату).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В ДЕЗОКСИНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЕ

Поскольку в большинстве дезоксинуклеиновых кислот молярное отношение пуринов к пиримидинам равно единице, то распределение пуриновых звеньев можно в значительной степени охарактеризовать с помощью распределения пиримидиновых. Признание строго комплементарной природы полинуклеотидных цепей двуспиральной ДНК означает, кроме того, что, к примеру, распределение последовательности Г3'ф5'А идентично распределению последовательности Т3'ф5'Ц (или Ц5'ф3'Т). Тем не менее даже для случая сильно гетерогенных смесей, с которыми обычно имеют дело, желательно независимое определение распределения пуринов.

В результате избирательного окисления тимининовых, цитозининовых и гуаниновых остатков в ДНК перманганатом калия получается продукт, из которого путем элиминирования фосфата от уреидоуглеводных звеньев при щелочном гидролизе образуется ряд адениновых соединений [424]. Около 62% всего аденина выделяется в виде три(дезоксиаденозин)тетрафосфата, другие 22% участвуют в образовании димера (дезоксиаденозин)₂(фосфат)₃.

Изучение ферментативного (стрептодорназой) гидролиза дезоксирибонуклеиновых кислот показывает, что большая часть нуклеотидов присутствует в виде пиримидиновых звеньев длиной до 10 нуклеотидных единиц, чередующихся с соответствующими участками пуринов [357].

Для определения распределения пуриновых звеньев может иметь значение гидролиз ДНК с последующим щелочным гидролизом апиримидиновых кислот*. Процесс, по-видимому, аналогичен щелочному гидролизу апурининовых кислот.

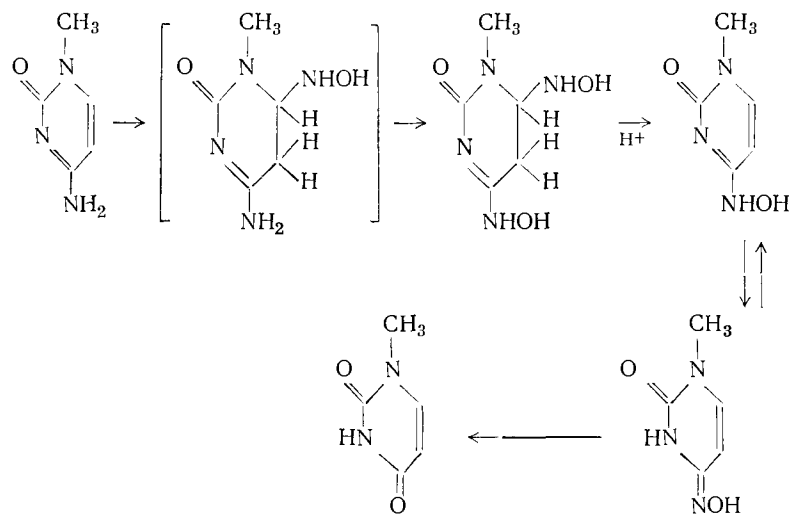
ДРУГИЕ МЕТОДЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Обработка пиримидиновых нуклеотидов гидразином дает ациклические производные, легко распадающиеся до фосфосахаров [427]. Хотя, возможно, и происходит некоторый разрыв фосфодиэфирных связей, полимерные продукты, получающиеся при гидразинолизе дезоксирибонуклеиновой кислоты, почти свободны от пири-

* Этот метод в настоящее время разработан [574]. Разделение продуктов позволяет обнаружить присутствие последовательности пуриновых звеньев длиной до 8 (возможно, и больше) нуклеотидных единиц.

мидинов, но сохраняют пуриновые дезоксинуклеотиды, присутствовавшие в исходной нуклеиновой кислоте. Дальнейшая обработка этой «апириимидиновой кислоты» разбавленной кислотой приводит к образованию продукта типа поли(дезоксирибозофосфата), который, как утверждают, можно также получить путем гидразинолиза апуриновой кислоты [428].

Гидроксилламин в мягких условиях быстро реагирует с цитозиновыми и 5-оксиметилцитозиновыми (или 5-бром урациловыми) остатками в ДНК, в то время как тимин или 5-метилцитозин не затрагивается [429]. Этот реагент проявляет сильные мутагенные свойства; действие его заключается, по-видимому, в атаке атома C₆ пиримидинового кольца с образованием промежуточных продуктов, превращающихся в урацил. Однако исследования с использованием 3-метилцитозина и цитидина как модельных соединений позволяют предположить, что первоначальное воздействие направлено на двойную связь в положении 4,5 и что последовательность реакций представляется такой, как показано на приведенной ниже схеме [221,430]:



Хотя реакция рибонуклеиновых кислот с формальдегидом в мягких условиях протекает, вероятно, через образование шиффовых оснований или оксиметильных производных по аминогруппам, денатурированные полиспиральные молекулы дезоксинуклеиновой кислоты не реагируют с формальдегидом (при этом не наблюдается никаких спектральных изменений), по-видимому, благодаря защитному действию системы водородных связей между основаниями в двуспиральной структуре ДНК. Нативная одноцепочечная, а так-

же денатурированная дезоксирибонуклеиновая кислота чувствительна к формальдегиду [217, 218, 431].

Алкилирующие агенты, такие, как диметилсульфат и «азотистый иприт», реагируют с дезоксирибонуклеиновыми кислотами [432] в очень мягких условиях (рН, температуры) [433, 436, 437]. Происходит алкилирование пуриновых и пиримидиновых оснований; исследования на отдельных дезоксинуклеотидах и анализ продуктов кислотного гидролиза ДНК, обработанной вышеупомянутыми реагентами, показывает, что реакционная способность оснований находится в следующей зависимости: гуанин > аденин > цитозин > тимин и что в случае гуаниновых остатков основной реакцией [433, 436, 437] является алкилирование при N⁷. Метилирование адениловой кислоты в водном растворе при рН 7 дает N¹- и N³-производные; дальнейшая обработка щелочью вызывает «миграцию» N¹-метильной группы на 6-аминогруппу [438]. Таким образом, адениновые остатки в ДНК алкилируются, по-видимому, по их пиримидиновой части в противоположность гуаниновым остаткам, которые реагируют по имидазольному кольцу. При обработке ДНК «азотистым ипритом» [439] или диметилсульфатом [433] в соответствующих условиях этерифицируется заметное число фосфатных групп, причем образующиеся триэтерифицированные фосфатные производные сравнительно неустойчивы. При применении бифункциональных алкилирующих агентов может происходить образование поперечных связей между различными цепями ДНК или между различными частями одной и той же цепи. Расщепление ДНК, обработанной монофункциональными реагентами, дает 7-алкилгуанины; аналогично при использовании бифункциональных алкилирующих агентов получают ди(гуанин-7-ильные) производные [440]. Следует отметить, что РНК, содержащая 7-алкилгуанозиновые звенья, устойчива в нейтральном водном растворе, но алкилированная ДНК самопроизвольно распадается с потерей алкилированного гуанина (вследствие неустойчивости дезоксигликозидных связей); становится возможным последующий распад углеводофосфатной цепи. В случае бифункциональных реагентов расщепление двойной цепи может происходить довольно быстро благодаря сравнительно высокой степени (около 25%) алкилирования одной молекулой реагента сразу обеих противоположных цепей. При использовании монофункциональных алкилирующих агентов разрывы в обеих цепях на расстоянии от 2 до 6 нуклеотидов один от другого (и, следовательно, уменьшение молекулярного веса) были редки [440]. Химическое действие этих агентов (радиомиметических веществ) во многих отношениях параллельно биологическому действию излучения с большой энергией, такого, как рентгеновское, в том, что касается мутагенного действия, повреждения хромосом и подавления развития опухолей [441].

Обработка ДНК бромной водой вызывает сильное разрушение гуаниновых и цитозиновых остатков. Тимин подвергается такому действию в меньшей степени, а аденин фактически не затрагивается [442—445].

Дезоксирибонуклеиновые кислоты устойчивы в мягких щелочных условиях, но обработка в более жестких условиях, горячей щелочью, дает сложную смесь олигодезоксинуклеотидов [446—448]. Кроме дезаминирования цитозина до урацила, происходит значительное разрушение цитозиновых и адениновых остатков [449, 450].

СОСТАВ ОСНОВАНИЙ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Относительные количества различных мононуклеотидов в препаратах дезоксинуклеиновой кислоты обычно получают путем количественного кислотного гидролиза до свободных оснований (лучше всего муравьиной кислотой) с последующим разделением хроматографиями на бумаге и спектрофотометрической оценкой [451—455]. Кроме давно известных компонентов (аденина, цитозина, гуанина и тимина), в гидролизатах ДНК были обнаружены другие основания и выделены соответствующие нуклеотиды. 5-Метилцитозин встречается в небольших количествах в дезоксирибонуклеиновых кислотах ряда млекопитающих, рыб и насекомых; сравнительно много его находится в дезоксирибонуклеиновой кислоте из зародышей пшеницы [456, 457]. Из соответствующих гидролизатов дезоксирибонуклеиновой кислоты были выделены производные 5-метилцитозина: дезоксинуклеозид [458], дезоксинуклеозид-5'-фосфат [459] и дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфат [403, 413]. Другое метилированное основание — 6-метиламинопурин — обнаружено в качестве минорного компонента дезоксирибонуклеиновых кислот различных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Pneumococcus*) и вирусов (бактериофага T2 *E. coli* и бактериофага *Salmonella C*) [460]. Выделение дезоксинуклеозидов и его фосфата указывает на то, что это основание является истинным компонентом нуклеиновой кислоты. При росте организма в условиях тиминового голодания или в присутствии аналогов тимина, таких, как 5-аминоурацил или 2-тиотимин [460], количество 6-метиламинопурина, присутствующего в дезоксинуклеиновых кислотах из *Escherichia coli* 15T⁻ (штамм, требующий тимина) увеличивается от 2% (по отношению к содержанию аденина) до приблизительно 15%.

Утверждение, что эти минорные основания замещают другие специфические основания, т. е. соответствующее количество цитозина в дезоксинуклеиновой кислоте заменено 5-метилцитозином [461], может иметь значение несмотря на гетерогенную природу

анализируемых препаратов нуклеиновых кислот, хотя дальнейшие утверждения в отношении распределения едва ли могут быть рассмотрены, пока, наконец, не будут исследованы относительно гомогенные фракции дезоксинуклеиновой кислоты.

Основные исключения* касаются состава дезоксинуклеиновых кислот из бактериофагов T2, T4 и T6 *Escherichia coli*. Для этих нуклеиновых кислот характерно полное отсутствие (в пределах чувствительности используемых аналитических методов) цитозина и присутствие больших количеств 5-оксиметилцитозина [462]. Значительная часть этого компонента имеет при 5-оксиметильной группе глюкозидные остатки [463—465], и из ДНК бактериофага при обработке дезоксирибонуклеазой, а затем диэстеразой змеиного яда были выделены и моноглюкозил- [463—467], и диглюкозил-5-оксиметил-2'-дезоксидитидин-5'-фосфат [466, 468] (наряду с 5-оксиметил-2'-дезоксидитидин-5'-фосфатом) [463—465, 467, 469]. Хотя дезоксинуклеиновые кислоты из всех трех бактериофагов содержат почти одинаковые количества 5-оксиметилцитозина, отношение глюкозы к пиримидиновому основанию существенно отличается [468], будучи равным 0,81 для бактериофага T2, 1,08 для бактериофага T4 и 1,71 для бактериофага T6.

Присутствие связанной глюкозы придает устойчивость к воздействию ряда ферментов, включающих фосфомоноэстеразу [470], диэстеразу змеиного яда и дезоксирибонуклеазу [463—465, 471]. Так, дезоксинуклеиновая кислота из бактериофага T2 легче распадается под действием панкреатической дезоксирибонуклеазы, чем ДНК из бактериофага T6. Кроме того, последовательное действие дезоксирибонуклеазы и диэстеразы змеиного яда на дезоксинуклеиновые кислоты из всех трех бактериофагов (T2, T4 и T6) приводит к получению дезоксинуклеозид-5'-фосфатов наряду с большим количеством устойчивых к диэстеразе олигодезоксинуклеотидных фрагментов [466]. Большая часть вирусного 5-оксиметилцитозина присутствует в этих олигодезоксинуклеотидах, но 5-оксиметил-2'-дезоксидитидин-5'-фосфат и моноглюкозил были выделены из мононуклеотидной фракции гидролизатов T2-ДНК. Аналогично из T6-ДНК были получены диглюкозил, свободный нуклеотид и небольшое количество моноглюкозида. В ферментативных гидролизатах T6-ДНК обнаружен также динуклеотид, содержащий аденин и диглюкозил 5-оксиметилцитозина [466]. Поскольку диэстераза змеиного яда высоко специфична для алкиловых эфиров нуклеозид-5'-фосфатов независимо от природы алкильной или арильной группы (бензил, фенил, нуклеозид-2', нуклеозид-3', нуклеозид-5'),

* Дезоксинуклеиновые кислоты из бактериофагов SP2 и 8 (хозяин *Bacillus subtilis*) также представляют собой исключение. В первой тимин заменен урацилом, в последней — 5-оксиметилурацилом [575].

можно ожидать, что упомянутый выше динуклеотид представляет собой скорее 5-диглюкозидо-5-оксиметил-2'-дезоксцитидилил-5': 3'-дезоксиденозин-5'-фосфат, а не изомерный дезоксиаденилил-5': 3'-5-диглюкозидо-5-оксиметил-2'-дезоксцитидин-5'-фосфат. Что это в самом деле так, было легко показано расщеплением динуклеотида муравьиной кислотой и дифениламином, при котором образуется монофосфат 5-оксиметилдезоксцитидинового диглюкозида, а не 3',5'-дифосфат [466]. По-видимому, упомянутые ранее устойчивые к диэстеразе олигонуклеотидные фрагменты состоят главным образом из цепочек глюкозидо-5-оксиметил-2'-дезоксцитидиловой кислоты, несущих концевой дезоксинуклеозид-5'-фосфат, помимо глюкозидных пиримидиновых нуклеотидов. Подобным же образом освобождение глюкозидных мононуклеотидов из ДНК при совместном действии панкреатической дезоксирибонуклеазы и диэстеразы змеиного яда может происходить в результате первоначального расщепления нуклеазой, что дает олигодезоксинуклеотиды, несущие концевой глюкозидо-5-оксиметил-2'-дезоксцитидин-5'-фосфат (присоединенный к неглюкозидному нуклеотиду), и дальнейшего расщепления этих олигодезоксинуклеотидов диэстеразой.

Дезоксинуклеиновые кислоты из Т-четных бактериофагов полностью гидролизуются до дезоксинуклеозид-5'-фосфатов фосфодиэстеразой из *Escherichia coli*. Хроматографический анализ продуктов показал, что в случае бактериофага Т2 25% общего содержания 5-оксиметилцитозина не глюкозилировано, 70% моноглюкозилировано (α -глюкозидная связь, как показано изучением действия α - и β -глюкозидаз) и 5% содержат β -диглюкозид с α -глюкозидной связью с оксиметильной группой. В ДНК из бактериофага Т4 все пиримидиновые звенья моноглюкозилированы, но 70% остатков связаны в α -конфигурации, а 30% содержат β -глюкозидные связи. В Т6-ДНК 25% оксиметилцитозина свободно, 3% моноглюкозилировано (α -связь) и 72% содержатся в виде β -диглюкозида, соединенного α -связью [472]. Дисахарид идентифицирован как 6-О- β -D-глюкопиранозил-D-глюкоза (гентиобиоза) [560].

Введение простых и достаточно точных хроматографических методов исследования способствовало анализу большого количества препаратов ДНК. В ходе этого были изучены дезоксинуклеиновые кислоты млекопитающих [473] (включая человека [473, 474]), птиц [475], рыб [476], растений [477], микробов [478] и вирусов [479], и только наиболее экзотические и необыкновенные формы жизни ускользнули от внимания. Некоторые результаты представлены в табл. 6-5. Несмотря на тот факт, что большинство материала было далеко не однородным, можно сделать ряд обобщений, касающихся пуринового и пиримидинового состава дезоксинуклеиновых кислот. Наиболее существенной из замеченных закономерностей

Таблица 6-5
СОСТАВ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Источник нуклеиновой кислоты	Молярное отношение					А + Т		Лите- рату- ра
	А	Т	Г	Ц	5-CH ₃ Ц	Г + Ц (+ 5-CH ₃ Ц)		
Зобная железа быка . .	10	9,8	7,3	7,3		1,36	473	
Печень быка	10	10,1	7,3	7,3		1,37	473	
Зобная железа овцы . .	10	9,7	7,3	7,2		1,36	473	
Печень овцы	10	10,0	7,1	7,1		1,41	473	
Зобная железа свиньи	10	9,6	6,8	6,9		1,43	473	
Печень свиньи	10	10,1	6,7	6,7		1,44	473	
Зобная железа человека	10	9,5	6,4	6,4		1,52	473	
Печень человека	10	10,0	6,4	6,6		1,54	473	
Селезенка человека . . .	10	10,1	7,2	6,7		1,42	475	
Сперма человека	10	10,2	6,2	6,0		1,67	483	
Сперма человека	10	9,8	7,5	7,5		1,47	326	
Эритроциты курицы . .	10	10,1	7,9	7,7		1,29	475	
Сперма сельди	10	9,9	8,0	7,4	0,7	1,23	484	
Сперма лосося	10	9,8	7,0	6,9		1,43	476	
Сперма морского ежа .	10	9,5	6,3	6,0	0,6	1,52	484	
<i>Drosophila</i>	10	10,1	8,9	5,9	2,9	1,13	485	
<i>Pinus sibirica</i>	10	10,4	7,1	5,0	1,7	1,48	477	
<i>Papaver somniferum</i> (мак)	10	10,1	7,0	5,0	1,8	1,46	477	
<i>Allium cepa</i> (лук) . . .	10	9,8	5,8	4,0	1,7	1,72	477	
Зародыши пшеницы (СССР)	10	10,2	9,3	7,1	2,5	1,07	477	
Зародыши пшеницы (США)	10	9,9	8,3	6,2	2,2	1,19	457	
Дрожжи	10	10,5	6,0	5,5		1,79	486	
<i>Clostridium perfringens</i>	10	10,3	4,6	4,4		2,22	487	
<i>Proteus vulgaris</i>	10	9,8	6,6	6,9		1,47	487	
<i>Escherichia coli</i>	10	10,0	10,9	11,0		0,92	487	
<i>Salmonella typhosa</i> . . .	10	10,0	11,4	11,2		0,88	487	
<i>Aerobacter aerogenes</i> . .	10	10,3	13,5	13,1		0,76	487	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	9,6	19,6	20,2		0,49	487	
<i>Sarcina lutea</i>	10	10,6	26,8	26,2		0,39	487	
<i>Actinomyces viridochro-</i> <i>mogenes</i>	10	9,7	27,5	28,0		0,36	487	
<i>Aspergillus niger</i>	10	10,0	10,0	10,0		1,00	488	
<i>Sclerotinia libertiana</i> . .	10	10,0	8,3	8,4		1,20	488	
Бактериофаг Т5 <i>E. coli</i>	10	10,2	6,4	6,4		1,57	479	
Бактериофаг Т7 <i>E. coli</i>	10	10,0	9,2	9,2		1,09	489	
Бактериофаг ϕ X-174 . .	10	13,1	10,6	8,2		1,23	490	
<i>Drosophila</i> (яйца)	10	9,7	8,1	6,3		1,37	550	

Таблица 6-5 (продолжение)

Бактериофаг <i>E. coli</i>	Молярное отношение				A + T	Литература
	A	T	Г	5-НОСН ₂ Ц	Г+5-НОСН ₂ Ц	
T2r	10	10,0	5,6	5,2	1,84	479
T4r + ...	10	10,2	5,7	5,0	1,89	479
T6r + ...	10	10,0	5,6	5,1	1,86	479

стей является то, что молярное отношение аденина к тимину и гуанина к цитозину равно (или очень близко) единице [480]. Отсюда следует, что общее содержание пуринов (аденина и гуанина) равно общему содержанию пиримидинов (тимина и цитозина) и что количество 6-аминогрупп (аденина и цитозина) то же, что и количество 6-кетогрупп (тимина и гуанина). Объяснение молярного равенства аденина и тимина и гуанина и цитозина (включая 5-метилцитозин или 5-оксиметилцитозин) было впоследствии дано Уотсоном и Криком [481], которые постулировали (на основании данных рентгеноструктурного анализа) двуспиральную вторичную структуру дезокси-нуклеиновой кислоты, в которой основания одной полинуклеотидной цепи специфически спариваются водородными связями с основаниями другой цепи, причем специфическими парами являются аденин — тимин или гуанин — цитозин. Это не только устанавливает единство описанных выше взаимоотношений, но также вскрывает аналитическую трудность, состоящую в том, что молярные отношения мононуклеотидов, или частота специфической повторяемости, в большинстве дезокси-нуклеиновых кислот (как бы ни были они гомогенны) по отношению к одной и той же цепи не могут быть определены без предварительной денатурации (отделения) и фракционирования комплементарных полинуклеотидов. Исключение составляют природные одноцепочечные дезокси-нуклеиновые кислоты [482], такие, как ДНК из бактериофага ϕ X-174, и нет ничего невозможного в том, что по крайней мере некоторые из клеточных дезокси-нуклеиновых кислот также неспарены.

Другой подход при изучении количественного состава дезокси-нуклеиновых кислот был развит на основании определения отношения аденин плюс тимин к цитозин плюс гуанин (или аденина или тимина к гуанину или цитозину). Как в случае рибонуклеиновых кислот, наличие эквимольных пропорций оснований довольно редко, и большинство дезокси-нуклеиновых кислот распадается на две группы, характеризующиеся избытком или недостатком аденина и тимина относительно гуанина и цитозина [491—493]. Зна-

чительные различия в этом отношении имеют место среди дезокси-нуклеиновых кислот, выделенных из различных объектов, причем для млекопитающих до некоторой степени характерно преобладание аденина и тимина. В составе дезокси-нуклеиновой кислоты из различных органов одного и того же животного существенных различий не обнаружено, но показано, что ДНК быка и человека существенно отличаются друг от друга [473].

Хотя очевидно, что все дезокси-нуклеиновые кислоты должны распадаться на три группы (сумма аденина с тиминем больше, равна или меньше суммы гуанина с цитозином), биологическое значение этого отношения остается неясным, особенно ввиду того, что фракционирование всех выделенных из одного и того же источника дезоксирибонуклеиновых кислот может дать дезоксирибонуклеиновые кислоты каждого из трех типов. Изменения в составе нуклеиновой кислоты экспериментально выведенных форм кишечных бактерий представляют некоторый интерес. Переход *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa* и *Shigella dysenteria* в «щелочепродуцирующие формы» сопровождается заметным изменением в отношении цитозин + гуанин к аденин + тимин от 1,1 до приблизительно 2,0. В «нейтральных формах» это отношение уменьшается до 0,7—0,8. При этом отмечаются лишь небольшие изменения в составе рибонуклеиновых кислот [494]. Хотя полного соответствия в таксономии никоим образом не наблюдалось, специфический состав дезоксирибонуклеиновых кислот отражает определенную филогенетическую и таксономическую взаимосвязь между видами, особенно у микроорганизмов [495, 496]. Значительно меньшие изменения в составе ДНК обнаружены как у высших растений, так и у животных.

Высокая гомогенность бактериальной ДНК обнаружена при центрифугировании в градиенте плотности (хлорид цезия) [497, 498]. По-видимому, эта однородность плотности отражает однородность состава (ввиду того что состав определяет характеристики плотности), которая является значительной в том отношении, что среди ряда видов микробов (с широкими вариациями в содержании гуанина и цитозина), по-видимому, имеется мало примеров ДНК общего состава, если они вообще существуют.

КОМПЛЕКСЫ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Как упоминалось выше, дезоксирибонуклеиновые кислоты часто получают расщеплением соответствующего комплекса нуклеиновая кислота — белок. Белковая часть имеет обычно сильно основные свойства и сравнительно низкий молекулярный вес. Нуклеопротамины [499] содержатся в зрелых сперматозоидах многих видов рыб, а нуклеогистоны [500, 501] выделены из клеточных ядер млекопитающих. Было отмечено поразительное сходство нуклеогисто-

нов ряда позвоночных по содержанию в них аргинина, лизина и гистидина [502]. Эти комплексы, в состав которых входят относительно простые белки основного характера, отличаются от дезоксинуклеопротеида другого типа, выделенного из туберкулезных бактерий птиц [503]. В отличие от нуклеогистонов и нуклеопротаминов он растворим в изотоническом солевом растворе и содержит белок, который не является сильно основным. В качестве другого примера приведем «авидин», выделенный из куриных яиц [547, 548].

Хотя многие препараты нуклеогистонов представляли собой артефакты, возникающие в результате происходящих при выделении этих препаратов процессов диссоциации и повторной ассоциации, естественное сочетание гистонов и дезоксирибонуклеиновой кислоты *in vivo*, несомненно, является специфичным, по крайней мере частично, и нуклеопротеид представляет собой не свободное объединение двух компонентов, а определенный структурный комплекс [504—506]. При использовании соответствующим образом усовершенствованных методов выделения из зобной железы телят с высоким выходом выделен дезоксирибонуклеогистон [507], хорошо охарактеризованный физическими методами, хотя отсутствие гелеобразования является, возможно, результатом гидродинамических разрушений и протеазной активности в процессе выделения [508, 509, 549]. Исследование с помощью ряда макромолекулярных методов показало, что препарат целиком состоит из полностью диспергированных дезоксинуклеопротеидных частиц, сильно асимметричных, содержащих почти равные количества дезоксирибонуклеиновой кислоты и белка и имеющих молекулярный вес $18,5 \cdot 10^6$. После диссоциации получается дезоксирибонуклеиновая кислота с молекулярным весом $8 \cdot 10^6$, что позволяет предположить присутствие в нуклеопротеиде одной-единственной молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты. По-видимому, белковые единицы распределены вдоль цепи ДНК довольно равномерно, имея, возможно, конформацию α -спирали, располагающейся в большом желобке двойной спирали ДНК. Гистон оказывает стабилизирующее действие [507] на структуру ДНК, поскольку изолированная ДНК подвергается термической денатурации при температуре $60-70^\circ$, тогда как денатурация нуклеопротеида (при той же ионной силе) происходит при $80-90^\circ$. Как «нативные» нуклеогистоны, так и искусственно полученные комплексы [510—512] весьма устойчивы к ферментативному распаду под действием дезоксирибонуклеазы и защищены от повреждений лучами высокой энергии [513, 514]. Хотя белки в связанном состоянии имеют определенную структуру, которая сохраняется в растворах с очень низкой ионной силой, высокие концентрации солей вызывают расщепление (частичное или полное) солеподобных в основной своей массе связей с освобождением фосфатных

и аминогрупп, которые при повторном воссоединении образуют неспецифичные поперечные связи между цепями ДНК и гистона (или с добавленным белком или нуклеиновой кислотой), давая комплексы переменного состава и неопределенной структуры [505]. Агрегация может также происходить в результате объединения гистонов из различных нуклеопротеидных частиц, что приводит к образованию геля [507]. Изучение метахроматизма, возникающего в окраске толудинового голубого под действием нуклеогистона из зобной железы телят, имеющего общий отрицательный заряд, равный приблизительно $1/7$ заряда ДНК, показало, что в цепи полимера встречаются несвязанные фосфатные группы [504], по-видимому из-за отсутствия в линейной частице целой субъединицы гистона.

Описаны [518—520] искусственные комплексы дезоксинуклеиновых кислот с протаминами [515], гистонами [516], полилизинном, поливиниламином [517] и разнообразными белками. Образование комплекса с альбумином сыворотки крови быка, вызванное нагреванием, происходит в результате термической денатурации обеих компонентов, причем связывание осуществляется главным образом водородными связями [521]. Одна молекула ДНК может связать до 1800 альбуминовых молекул [521, 522], и защитное действие дезоксирибонуклеиновой кислоты из зобной железы на тепловую коагуляцию растворов альбумина [520] может быть приписано этому связыванию, которое предотвращает самоагрегацию. Подобным образом можно объяснить тормозящее действие ДНК на расщепление белков трипсином, т. е. действие направлено на субстрат, а не на фермент [523]. Однако изучение подавления ДНК активности химотрипсина с применением синтетических субстратов позволяет предположить, что между ферментом и нуклеиновой кислотой также образуются стехиометрические комплексы. Максимальное торможение происходит при отношении белка к ДНК, равном $20 : 1$, соответствующем приблизительно четырем нуклеотидным звеньям на молекулу химотрипсина [524]. Для трипсина это отношение равно $7 : 1$.

Хотя нуклеопротеиды в основном являются нуклеогистонами, хромосомы млекопитающих содержат также небольшие количества дезоксирибонуклеопротеидов, состоящих из белков, отличающихся от гистонов. Эти комплексы имеют, по-видимому, ковалентные связи между компонентами, так как утверждается, что ферментативный распад дает олигодезоксинуклеотидные фрагменты, связанные с короткими пептидами [525].

Путресцин и спермидин обнаружены в составе некоторых бактериальных вирусов (бактериофагов Т2, Т3 и Т4) [526, 527] и они действительно могут подавлять диссоциацию фосфатных остатков дезоксинуклеиновой кислоты почти на 50% [526]. Такие поли-

амины образуют устойчивые комплексы с ДНК, и, возможно, их функцией (как неспецифических катионов) [528] является сохранение ДНК бактериофага в конформации, вызывающей инфекцию [529]. Так, кадаверин защищает выделенный из бактериофага T2 [529] агент, способный инфицировать протопласты, а спермин ответственен за повышение устойчивости трансформирующей ДНК (из *Bacillus subtilis*) к тепловой инаktivации [530]. Как спермин [531], так и кадаверин [532] подавляют расщепление ДНК дезоксирибонуклеазой благодаря, по-видимому, чисто физическому эффекту «обволакивания» полинуклеотидной цепи или же путем увеличения конформационной устойчивости. Дальнейшее изучение действия диаминов [435] на температурные изменения ДНК из зобной железы телят и из коли-фага T2 показало, что стабилизация (проявляющаяся в повышении температуры денатурации) является функцией концентрации и длины цепи диамина [533]. В ряду диаминов $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, где $n = 2-8$, максимальный эффект (приблизительно 5°) наблюдается в случае кадаверина ($n = 5$), что отражает, по-видимому, стехиометрические факторы, важные при образовании любых мостиковых структур. Чтобы уменьшить влияние других ионов, измерения были проведены при высокой ионной силе. При этих условиях взаимодействие с ионами магния повышает температуру тепловой денатурации ДНК из бактериофага T2 с 83,4° лишь до 84,2°. В присутствии же кадаверина температура повышается до 88,6°. Найдено, что защитное действие, обусловленное этим амином, прямо пропорционально содержанию аденина — тимина в дезоксирибонуклеиновой кислоте [534].

Дезоксирибонуклеиновые кислоты, как «нативные», так и денатурированные, сильно связывают ионы многовалентных металлов. Четырехвалентные катионы [535, 536] и соли двухвалентной меди [537] образуют нерастворимые комплексы с дезоксинуклеиновыми кислотами, по-видимому, вследствие вторичной агрегации молекул ДНК между собой за счет образования хелатов с фосфатными группами (и, возможно, с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями) соседних цепей ДНК. Усиленно изучалось взаимодействие ионов магния с дезоксирибонуклеиновой кислотой [537—541]. Методы прямого титрования (использующие в качестве индикатора эриохром черный Т) показывают, что при низкой концентрации хлористого натрия магний сильно связывается как неденатурированной, так и денатурированной дезоксирибонуклеиновой кислотой, причем в первом случае связывание оказывается сильнее [540]. Связывание магния значительно уменьшается в присутствии высоких концентраций ионов натрия, и можно предположить, что основными местами взаимодействия являются заряженные фосфатные группы. В соответствующих условиях образование хелатов с пуриновыми кольцами может также происходить в однотяжных или денату-

рированных полинуклеотидах [538, 539]. При реакции с хлоридом ртути(II) наблюдались существенные изменения в дисперсии оптического вращения ДНК. Происходят обратимые изменения конформации, и процесс, вероятно, включает прямое взаимодействие недиссоциированного хлорида ртути(II) с гетероциклическими основаниями [542]. Спектральные изменения указывают на образование двух типов комплексов: в одном из них один атом ртути приходится на два основания, а для другого, по-видимому, это отношение равно 1 : 1. Обращение этого взаимодействия (получение ДНК, которая полностью сохраняет трансформирующую активность) происходит при обработке комплексообразующими агентами, такими, как цианид или цистеин [543]. Исследования с помощью ядерного магнитного резонанса увеличения релаксации протонов под влиянием парамагнитного ионного связывания в растворах ДНК показывают, что ионы трехвалентного железа связываются на внутренних сторонах [544]. Термически денатурированные дезоксирибонуклеиновые кислоты осаждаются ионами свинца; но никакого осаждения не происходит в случае двуспиральных нуклеиновых кислот, не подвергнутых нагреванию [545].

Ионы металлов могут играть существенную роль в связывании и структурных взаимоотношениях белка и нуклеиновой кислоты в дезоксирибонуклеопротеидах. Представляет интерес освобождение ДНК из нуклеопротеида в результате одновременного воздействия комплексообразующего агента и взаимодействия с белком [546].

Литература

1. Levene P. A., Biochem. Z., **17**, 120 (1909).
2. Kerr S. E., Seraidarian K., J. Biol. Chem., **180**, 1203 (1949).
3. Beale R. N., Harris R. J. C., Roe E. M. F., J. Chem. Soc., **1950**, 1397.
4. Sevag M. G., Lackman D. B., Smolens J., J. Biol. Chem., **124**, 425 (1938).
5. Kay E. R. M., Dounce A. L., J. Am. Chem. Soc., **75**, 4041 (1953).
6. Pirie N. W., Biochem. J., **56**, 83 (1954).
7. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **49**, 401 (1951).
8. Beale R. N., Harris R. J. C., Roe E. M. F., J. Chem. Soc., **1950**, 1397.
9. Volkin E., Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1516 (1951).
10. Brownhill T. J., Jones A. S., Stacey M., Biochem. J., **73**, 434 (1959).
11. Westphal O., Luderitz O., Bister F., Z. Naturforsch., **7b**, 148 (1952).
12. Kirby K. S., Biochem. J., **64**, 405 (1956).
13. Colter J. S., Brown R. A., Science, **124**, 1077 (1956).
14. Gierer A., Schramm G., Z. Naturforsch., **11b**, 138 (1956).
15. Monier R., Stephenson M. L., Zamecnik P. C., Biochim. et Biophys. Acta, **43**, 1 (1960).
16. Osawa S., Biochim. et Biophys. Acta, **43**, 110 (1960).

17. Holley R. W., Apgar J., Doctor B. P., Farrow J., Marini M. A., Merrill S. H., J. Biol. Chem., **236**, 200 (1961).
18. Michelson A. M., неопубликованные данные.
19. Crestfield A. M., Smith K. C., Allen F. W., J. Biol. Chem., **216**, 185 (1955).
20. Miura K., Kitamura T., Kawade Y., Biochim. et Biophys. Acta, **27**, 420 (1958).
21. Littauer U. Z., Eisenberg H., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 320 (1959).
22. Hakim A. A., J. Biol. Chem., **225**, 689 (1957).
23. Bloemendal H., Bosch L., Biochim. et Biophys. Acta, **35**, 244 (1959).
24. Main R. K., Wilkins M. J., Cole L. J., J. Am. Chem. Soc., **81**, 6490 (1959).
25. Burness A. T. H., Vizoso A. D., Biochim. et Biophys. Acta, **49**, 225 (1961).
26. Bernardi G., Timasheff S. N., Biochim. Biophys. Research. Commun., **6**, 58 (1961).
27. Matoba K., Osaka Shiritsu Daigaku Igaku Zasshi, **7**, 344 (1958).
28. Lipshitz R., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **42**, 544 (1960).
29. Shibata A., Yamana K., Kimura K., Okagaki H., Biochim. et Biophys. Acta, **33**, 590 (1959).
30. Yamana K., Shibata A., Biochim. et Biophys. Acta, **41**, 295 (1960).
31. Kimura K., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 22 (1962).
32. Gierer A., Z. Naturforsch., **13b**, 788 (1958).
33. Bradley D. F., Rich A., J. Am. Chem. Soc., **78**, 5898 (1956).
34. Goldthwait D. A., J. Biol. Chem., **234**, 3245 (1959).
35. Nishiyama K., Okamoto T., Watanabe I., Takami M., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 193 (1961).
36. Taussig A., Creaser E. H., Arch. Biochem. Biophys., **83**, 436 (1959).
37. Brown F., Cartwright B., Biochim. et Biophys. Acta, **33**, 343 (1959).
38. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 3655.
39. Staehelin M., Peterson E. A., Sober H. A., Arch. Biochem. Biophys., **85**, 289 (1959).
40. Korn E. D., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 554 (1959).
41. Tanaka K., Bull. Chem. Soc. (Tokyo), **31**, 393 (1958).
42. Staehelin M., Biochim. et Biophys. Acta, **49**, 11 (1961).
43. Stephenson M. L., Zamecnik P. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **47**, 1627 (1961).
44. Bosch L., Wende G., Bloemendal H., Nature, **191**, 349 (1961).
45. Smith K. C., Cordes E., Schweet R. S., Biochim. et Biophys. Acta, **33**, 286 (1959).
46. Smith K. C., Rebhun S., Kaplan H. S., Analyt. Biochem., **1**, 202 (1960).
47. Hartmann G., Coy U., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 612 (1961).
48. Kirby K. S., Biochem. J., **68**, 13P (1958); Biochim. et Biophys. Acta, **40**, 193; **41**, 338 (1960).
49. Holley R. W., Doctor B. P., Merrill S. H., Saad F. M., Biochim. et Biophys. Acta, **35**, 272 (1959).
50. Holley R. W., Merrill S. H., J. Am. Chem. Soc., **81**, 753 (1959).

51. Doctor B. P., Apgar J., Holley R. W., J. Biol. Chem., **236**, 1117 (1961).
52. Zachau H. G., Tada M., Lawson W. B., Schweiger M., Biochim. et Biophys. Acta, **53**, 221 (1961).
53. Apgar J., Holley R. W., Merrill S. H., Biochim. et Biophys. Acta, **53**, 220 (1961).
54. Doctor B. P., Connelly C. M., Biochem. Biophys. Research Commun., **6**, 201 (1961).
55. Holley R. W., Apgar J., Merrill S. H., Zubkoff P. L., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4861 (1961).
56. Everett G. A., Merrill S. H., Holley R. W., J. Am. Chem. Soc., **82**, 5757 (1960).
57. Everett G. A., Merrill S. H., Holley R. W., Federation Proc., **20**, 388 (1961).
58. Cantoni G. L., Nature, **188**, 300 (1960).
59. Huang S. L., Felsenfeld G., Nature, **188**, 301 (1960).
60. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Scott J. F., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **46**, 811 (1960).
61. Saponara A., Bock R. M., Federation Proc., **20**, 356 (1961).
62. Portatius H., Doty P., Stephenson M. L., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3351 (1961).
63. Brown G. L., 10th Symp. of the Soc. for Gen. Microbiol. Microbial Genetics, ed. Hayes W., Clowes R. C., p. 208 (Cambridge University Press, 1960).
64. Jones A. S., Parsons D. G., Proc. Chem. Soc., **1961**, 78.
65. Levene P. A., J. Biol. Chem., **48**, 119 (1921).
66. Levene P. A., Simms H. S., J. Biol. Chem., **70**, 327 (1926).
67. Steudel H., Peiser E., Z. physiol. Chem., **108**, 42 (1919).
68. Jones W., Perkins M. E., J. Biol. Chem., **62**, 557 (1925).
69. Levene P. A., Bass L. W., Nucleic Acids, p. 289 (The Chemical Catalog Company, New York, 1931).
70. Gulland J. M., Barker G. R., Jordan D. O., Ann. Rev. Biochem., **14**, 175 (1945).
71. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **109**, 623 (1935).
72. Gulland J. M., Jackson E. M., J. Chem. Soc., **1938**, 1492; Biochem. J., **32**, 590 (1938).
73. Gulland J. M., J. Chem. Soc., **1938**, 1722.
74. Astbury W. T., Symposia Soc. Exptl. Biol., **1**, 66 (1947).
75. Schmidt G., Cubiles R., Thannhauser S. J., J. Cellular Comp. Physiol., **38**, S1, 61 (1951).
76. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **168**, 781 (1947); **176**, 703 (1948).
77. Hotchkiss R. D., J. Biol. Chem., **175**, 315 (1948).
78. Cohn W. E., J. Cellular Comp. Physiol., **38**, S1, 21 (1951).
79. Cohn W. E., Volkin E., Nature, **167**, 483 (1951).
80. Cohn W. E., Volkin E., J. Biol. Chem., **20**, 319 (1953).
81. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **52** (1952).
82. Chargaff E., J. Biol. Chem., **144**, 455 (1942).
83. Baer E., Kates M., J. Biol. Chem., **175**, 79 (1948); **185**, 615 (1950).
84. Fono A., Arkiv. Kemi Mineral Geol., **24A**, № 33, 14, 15 (1947).
85. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 44.
86. Brown D. M., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 2708.
87. Brown D. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1953**, 2040.
88. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 552 (1952).
89. Elmore D. T., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 3681.

90. Cohn W. E., Volkin E., Arch. Biochem. & Biophys., **35**, 465 (1952).
91. Michelson A. M., Tetrahedron, **2**, 333 (1958).
92. Crestfield A. M., Allen F. W., J. Biol. Chem., **219**, 103 (1956).
93. Kunitz M., J. Gen. Physiol., **24**, 15 (1940).
94. Bacher J. E., Allen F. W., J. Biol. Chem., **183**, 633 (1950).
95. Carter C. E., Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., **72**, 2604 (1950).
96. Magasanik B., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **7**, 396 (1951).
97. Schmidt G., Cubiles R., Zöllner N., Hecht L., Strickler N., Seraidarian K., Seraidarian M., Thannhauser S. J., J. Biol. Chem., **192**, 715 (1951).
98. Volkin E., Cohn W. E., J. Biol. Chem., **205**, 767 (1953).
99. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 565 (1952).
100. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **52**, 558 (1952).
101. Brown D. M., Dekker C. A., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1952**, 2715.
102. Heppel L. A., Markham R., Hilmoe R. J., Nature, **171**, 1152 (1953).
103. Heppel L. A., Whitfield P. R., Biochem. J., **60**, 1 (1955).
104. Whitfield P. R., Heppel L. A., Markham R., Biochem. J., **60**, 15 (1955).
105. Brown D. M., Heppel L. A., Hilmoe R. J., J. Chem. Soc., **1954**, 40.
106. Gierer A., Nature, **179**, 1297 (1957); Z. Naturforsch., **13b**, 485 (1958).
107. Rogers W. I., Kalnitsky G., Biochim. et Biophys. Acta, **23**, 525 (1957).
108. Ginsburg A., Schachman H. K., J. Biol. Chem., **235**, 115 (1960).
109. Gundlach H. G., Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem., **234**, 1754 (1959).
110. Barnard E. A., Stein W. D., Biochem. J., **71**, 19P (1959).
111. Stein W. D., Barnard E. A., J. Mol. Biol., **1**, 350 (1959).
112. Anfinsen C. B., Aqvist S. E. G., Cooke J. P., Jönsson B., J. Biol. Chem., **234**, 1118 (1959).
113. Hirs C. H. W., J. Biol. Chem., **235**, 635 (1960).
114. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., **235**, 633 (1960).
115. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem., **235**, 648 (1960).
116. Stein W. H., Stark G. R., Science, **133**, 1369 (1961).
117. Shapiro R., Parker S., Biochem. Biophys. Research Commun., **3**, 200 (1960).
118. Beers R. F., J. Biol. Chem., **235**, 2393 (1960).
119. Lane B. G., Butler G. C., Can. J. Biochem. & Physiol., **37**, 1329 (1959).
120. Barker G. R., Parsons M. A., Chem. and Ind., **1955**, 1009.
121. Ukita T., Irie M., Chem. and Pharm. Bull. (Tokyo), **6**, 445 (1958).
122. Egami F., Takagi M., Hayashi I., Takemura S., Seikagaku, **31**, 120 (1959).
123. Michelson A. M., Chem. and Ind., **1958**, 1147.
124. Witzel H., Ann., **620**, 126 (1959).
125. Witzel H., Abstracts 4th Intern. Congr. Biochem. Vienna, **1958**, 33.
126. Michelson A. M., Biochim. et Biophys. Acta, **50**, 605 (1961).
127. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1962**, 979.

128. Mandel H. G., Markham R., Matthews R. E. F., Biochim. et Biophys. Acta, **24**, 205 (1957).
129. Davis F. F., Carlucci A. F., Rouben I. F., J. Biol. Chem., **234**, 1525 (1959).
130. Ukita C., Irie M., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **8**, 81 (1960).
131. Griffin B. E., Todd A. R., Rich A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **44**, 1123 (1958).
132. Letters R., Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1962**, 71.
133. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **7**, 309 (1960).
134. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 3655.
135. Brown G. B., Magrath D. I., неопубликованные данные.
136. Lipkin D., неопубликованные данные.
137. Cohn W. E., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 569 (1959).
138. Michelson A. M., Acta Biochim. Polon., **6**, 335 (1959).
139. Dekker C. A., Ann. Rev. Biochem., **29**, 454 (1960).
140. Findlay D., Herries D. G., Mathias A. P., Rabin B. R., Ross C. A., Nature, **190**, 781 (1961).
141. Kalnitsky G., Hummel J. P., Dierks C., J. Biol. Chem., **234**, 1512 (1959).
142. Sela M., Anfinsen C. B., Harrington W. F., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 502 (1957).
143. Vandreliessche L., Arch. Biochem. Biophys., **65**, 347 (1956).
144. Hummel J. P., Flores M., Nelson G., J. Biol. Chem., **233**, 717 (1958).
145. Hilmoe R. J., Heppel L. A., Springhorn S. S., Koshland D. E., Biochim. et Biophys. Acta, **53**, 214 (1961).
146. Markham R., Matthews R. E. F., Smith J. D., Nature, **173**, 537 (1954).
147. Singer M. F., Cantoni G. L., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 182 (1960).
148. Herbert E., Canellakis E. S., Biochim. et Biophys. Acta, **42**, 363 (1960).
149. Zillig W., Schachtschabel D., Krone W., Z. physiol. Chem., **318**, 100 (1960).
150. Lane B. G., Allen F. W., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 36 (1961).
151. Reddi K. K., Knight C. A., Nature, **180**, 374 (1957).
152. Matthews R. E. F., Smith J. D., Nature, **180**, 375 (1957).
153. Delbecco R., Smith J. D., Biochem. et Biophys. Acta, **39**, 358 (1960).
154. Gordon M. P., Singer B., Fraenkel-Conrat H., J. Biol. Chem., **235**, 1014 (1960).
155. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Vth International Congress of Biochemistry Moscow, 1961.
156. Sugiyama T., Fraenkel-Conrat H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 1393 (1961).
157. Lipkin D., Dixon J. S., Talbert P. T., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4772 (1961).
158. Crestfield A. M., Allen F. W., Arch. Biochem. Biophys., **78**, 334 (1958).
159. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **50**, 38P (1952).
160. Hopkins J. W., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 194 (1961).
161. Davis F. F., Carlucci A. F., Rouben I. F., J. Biol. Chem., **234**, 1525 (1959).
162. Reddi K. K., Biochim. et Biophys. Acta, **25**, 528 (1947).

163. Rushizky G. W., Knight C. A., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **2**, 66 (1960).
164. Reddi K. K., *Biochim. et Biophys. Acta*, **32**, 386 (1959).
165. Rushizky G. W., Knight C. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **46**, 945 (1960).
166. Sato-Asano K., Egami F., *J. Biochem. (Tokyo)*, **44**, 753 (1959); *Nature*, **185**, 462 (1960).
167. Sato-Asano K., Egami F., *Comp. rend. soc. biol.*, **151**, 1792 (1957).
168. Sato-Asano K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **46**, 31 (1959).
169. Sato-Asano K., Egami F., *Biochim. et Biophys. Acta*, **29**, 655 (1958).
170. Sato-Asano K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **48**, 284 (1960).
171. McCully K. S., Cantoni G. L., *Biochim. et Biophys. Acta*, **51**, 190 (1961).
172. Naoi-Tada M., Sato-Asano K., Egami F., *J. Biochem. (Tokyo)*, **46**, 757 (1959).
173. Reddi K. K., *Nature*, **188**, 60 (1960).
174. Miura K., Egami F., *Biochim. et Biophys. Acta*, **44**, 378 (1960).
175. Tanaka K., *Bull. Chem. Soc. (Tokyo)*, **31**, 393 (1958).
176. Reddi K. K., *Biochim. et Biophys. Acta*, **42**, 365 (1960).
177. Nishimura S., *Biochim. et Biophys. Acta*, **45**, 15 (1960).
178. Holden M., Pirie N. W., *Biochem. J.*, **60**, 39 (1955).
179. Markham R., Strominger J. L., *Biochem. J.*, **64**, 46P (1956).
180. Reddi K. K., *Biochim. et Biophys. Acta*, **28**, 386 (1958); **30**, 638 (1958).
181. Shuster L., Khorana H. G., Heppel L. A., *Biochim. et Biophys. Acta*, **33**, 452 (1959).
182. Holley R. W., Apgar J., Merrill S. H., *J. Biol. Chem.*, **236**, PC42 (1961).
183. Commoner B., Shearer G. B., Strode C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, 1117 (1958).
184. Volkin E., Cohn W. E., *J. Biol. Chem.*, **205**, 767 (1953).
185. Brown D. M., Fried M., Todd A. R., *Chem. and Ind.*, **1953**, 352.
186. Whitfield P. R., Markham R., *Nature*, **171**, 1151 (1953).
187. Brown D. M., Fried M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, **1955**, 2206.
188. Whitfield P. R., *Biochem. J.*, **58**, 390 (1954).
189. Yu C.-T., Zamecnik P. C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **45**, 148 (1960).
190. Khyr J. X., Cohn W. E., *J. Biol. Chem.*, **236**, PC9 (1961).
191. Ogur M., Small J. D., *J. Biol. Chem.*, **235**, PC60 (1960).
192. Długajczyk A., Allen F. W., *Biochim. et Biophys. Acta*, **51**, 215 (1961).
193. Lane B. G., Butler G. C., *Biochim. et Biophys. Acta*, **33**, 281 (1959).
194. Michelson A. M., *Acta Biochim. Polon.*, **6**, 335 (1959).
195. Dimroth K., Witzel H., Hülsen W., Mirbach H., *Ann.*, **620**, 94 (1959).
196. Miyazaki M., *Bull. Chem. Soc. (Tokyo)*, **30**, 912 (1957).
197. Dimroth K., Witzel H., *Angew. Chem.*, **68**, 579 (1956); *Ann.*, **620**, 109 (1959).
198. Dimroth K., Matthaeus W., *Angew. Chem.*, **68**, 579 (1956).
199. Finamore F. J., Volkin E., *J. Biol. Chem.*, **236**, 443 (1961).
200. Smith J. D., Dunn D. B., *Biochim. et Biophys. Acta*, **31**, 573 (1959).

201. Biswas B. B., Myers J., *Nature*, **186**, 238 (1960).
202. Egami F., Ishihara H., Shimomura M., *Z. physiol. Chem.*, **295**, 349 (1953).
203. Lipkin D., Talbert P. T., *Chem. and Ind.*, **1955**, 143.
204. Markham R., Smith J. D., *Biochem. J.*, **52**, 552 (1952).
205. Tanaka K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **47**, 398 (1960).
206. Vischer E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **176**, 715 (1948).
207. Hayes D. H., *J. Chem. Soc.*, **1960**, 1184.
208. Merrifield R. B., Woolley D. W., *J. Biol. Chem.*, **197**, 521 (1952).
209. Cohn W. E., Markham R., *Biochem. J.*, **62**, 17P (1956).
210. Witzel H., *Ann.*, **620**, 126 (1959).
211. Takemura S., *J. Biochem. (Tokyo)*, **44**, 321 (1957).
212. Takemura S., Miyazaki M., *Bull. Chem. Soc. (Tokyo)*, **32**, 926 (1959).
213. Takemura S., Takagi M., Miyazaki M., Egami F., *J. Biochem. (Tokyo)*, **46**, 1149 (1959).
214. Fletcher W. E., Gulland J. M., Jordan D. O., Dibben H. E., *J. Chem. Soc.*, **1944**, 30.
215. Gierer A., Mundry K.-W., *Nature*, **182**, 1457 (1958).
216. Schuster H., Schramm G., *Z. Naturforsch.*, **13b**, 697 (1958).
217. Fraenkel-Conrat H., *Biochim. et Biophys. Acta*, **15**, 307 (1954).
218. Staehelin M., *Biochim. et Biophys. Acta*, **29**, 410 (1958).
219. Schuster H., *J. Mol. Biol.*, **3**, 447 (1961).
220. Zillig W., Verwoerd D. W., Kohlhage H., *Strasbourg meeting on RNA and Polyphosphates*, July, 1961.
221. Verwoerd D. W., Kohlhage H., Zillig W., *Nature*, **192**, 1038 (1961).
222. Magasanik B., Vischer E., Doniger R., Elson D., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **186**, 37 (1950).
223. Davidson J. N., Smellie R. M. S., *Biochem. J.*, **52**, 594 (1952).
224. Elson D., Chargaff E., *Nature*, **173**, 1037 (1954); *Biochim. et Biophys. Acta*, **17**, 367 (1955).
225. Белозерский А. Н., «Нуклеопротеиды и нуклеиновые кислоты растений и их биологическое значение», Изд. АН СССР, Москва, 1959.
226. Спирин А. С., Белозерский А. Н., Шугаева Н. В., Ванюшин Б. Ф., *Биохимия*, **22**, 744 (1957).
227. Белозерский А. Н., Спирин А. С., *Nature*, **182**, 111 (1958).
228. Yčas M., Vincent W. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **46**, 804 (1960).
229. Santer M., Teller D. C., Andrews W., *J. Mol. Biol.*, **2**, 273 (1960).
230. Santer M., Teller D. C., Skilna L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 1384 (1961).
231. Crosbie G. W., Smellie R. M. S., Davidson J. N., *Biochem. J.*, **54**, 287 (1953).
232. Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green C., Doniger R., Elson D., *J. Biol. Chem.*, **186**, 51 (1950).
233. Deluca H. A., Rossiter R. J., Strickland K. B., *Biochem. J.*, **55**, 193 (1953).
234. Elson D., Gustafson T., Chargaff E., *J. Biol. Chem.*, **209**, 285 (1954).
235. Vincent W. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **38**, 139 (1952).
236. Elson D., Chargaff E., *Phosphorus Metabolism*, **2**, 329 (1952), ed. by McElroy W. E., Glass B., The Johns Hopkins Press.

237. Khouvine Y., Robichon-Szulmajster H., Bull. soc. chim. biol., **34**, 1056 (1952).
238. Loring H. S., Fairley J. L., Seagran H. L., J. Biol. Chem., **197**, 823 (1952).
239. Knight C. A., J. Biol. Chem., **197**, 241 (1952).
240. Yamazaki H., Kaesberg P., Nature, **191**, 96 (1961).
241. Markham R., Smith J. D., Biochem. J., **49**, 401 (1951).
242. Schaffer F. L., Moore H. F., Schwerdt C. E., Virology, **10**, 530 (1960).
243. Faulkner P., Martin E. M., Sved S., Valentine R. C., Work T. S., Biochem. J., **80**, 597 (1961).
244. Урисон С. О., Белозерский А. Н., ДАН СССР, **132**, 708 (1960).
245. Урисон С. О., Белозерский А. Н., ДАН СССР, **125**, 1144 (1959).
246. Ванюшин Б. Ф., Белозерский А. Н., ДАН СССР, **127**, 455 (1959).
247. Littlefield J. W., Dunn D. B., Nature, **181**, 254 (1958); Biochem. J., **70**, 642 (1958).
248. Smith J. D., Dunn D. B., Biochem. J., **72**, 294 (1959).
249. Amos H., Korn M., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 444 (1958).
250. Kemp J. W., Allen F. W., Biochim. et Biophys. Acta, **28**, 51 (1958).
251. Davis F. F., Carlucci A. F., Rouben I. F., J. Biol. Chem., **234**, 1525 (1959).
252. Adler M., Weissmann B., Gutman A. B., J. Biol. Chem., **230**, 717 (1958).
253. Dunn D. B., Smith J. D., Spahr P. F., J. Mol. Biol., **2**, 113 (1960).
254. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1960**, 539.
255. Dunn D. B., Biochim. et Biophys. Acta, **46**, 198 (1961).
256. Brown D. J., Nature, **189**, 828 (1961).
257. Taylor E. C., Jefford C. W., Cheng C. C., J. Am. Chem. Soc., **83**, 1261 (1961).
258. Dunn D. B., Biochim. et Biophys. Acta, **38**, 176 (1960).
259. Dunn D. B., Smith J. D., Proc. IVth Internat. Congr. Biochem., Vienna (1958) Symposium VII.
260. Cohn W. E., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 569 (1959).
261. Davis F. F., Allen F. W., J. Biol. Chem., **227**, 907 (1957).
262. Yu C. T., Allen F. W., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 393 (1959).
263. Scannell J. P., Crestfield A. M., Allen F. W., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 406 (1959).
264. Osawa S., Otake E., Biochim. et Biophys. Acta, **36**, 549 (1959).
265. Otake E., Osawa S., Nature, **185**, 921 (1960).
266. Otake E., Hotta Y., Osawa S., Biochim. et Biophys. Acta, **35**, 266 (1959).
267. Osawa S., Biochim. et Biophys. Acta, **42**, 244 (1960); **43**, 110 (1960).
268. Dunn D. B., Biochim. et Biophys. Acta, **34**, 286 (1959).
269. Bergquist P. L., Matthews R. E. F., Biochim. et Biophys. Acta, **34**, 567 (1959).
270. Herbert E., Canellakis E. S., Biochim. et Biophys. Acta, **42**, 363 (1960).
271. Steudel H., Peiser E., Z. physiol. Chem., **122**, 298 (1922).
272. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 1371.
273. Burger W. C., Stahmann M. A., J. Biol. Chem., **193**, 13 (1951).
274. Razin S., Rozansky R., Arch. Biochem. Biophys., **81**, 36 (1959).
275. Keister D. L., Federation Proc., **17**, 84 (1958).

276. Herbst E. J., Doctor B. P., J. Biol. Chem., **234**, 1497 (1959).
277. Chayen R., Chayen S., Roberts E. R., Biochim. et Biophys. Acta, **16**, 117 (1955).
278. Белозерский А. Н., Кулаев И. С., Биохимия, **22**, 79 (1957); Кулаев И. С., Белозерский А. Н., Биохимия, **22**, 587 (1957).
279. Кулаев И. С., Белозерский А. Н., ДАН СССР, **120**, 1080 (1958).
280. Franklin R. E., Klug A., Finch J. T., Holmes K. C., Discussions Faraday Soc., № 25, 197 (1958).
281. Chao F.-C., Arch. Biochem. Biophys., **70**, 426 (1957).
282. Elson D., Biochim. et Biophys. Acta, **27**, 207 (1958).
283. Tissières A., Watson J. D., Schlessinger D., Hollingworth B. R., J. Mol. Biol., **1**, 221 (1959).
284. Hall C. E., Slayter H. S., J. Mol. Biol., **1**, 329 (1959).
285. Cheng P.-Y., Biochim. et Biophys. Acta, **37**, 238 (1960).
286. Takanami M., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 152 (1960).
287. Markham R., Smith K. M., Parasitology, **39**, 330 (1949).
288. Shigeura H. T., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **37**, 347 (1960).
289. Bawden F. C., Kleczkowski A., Nature, **183**, 503 (1959).
290. Szafarz D., Biochim. et Biophys. Acta, **6**, 562 (1951).
291. Feldman I., Havill J. R., Neuman W. F., Arch. Biochem. Biophys., **46**, 443 (1953).
292. Wiberg J. S., Neuman W. F., Arch. Biochem. Biophys., **72**, 66 (1957).
293. Frieden E., Alles J., J. Biol. Chem., **230**, 797 (1958).
294. Chao F.-C., Friesen B. S., Sinheimer R. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 305 (1959).
295. Wacker W. E. C., Vallee B. L., Nature, **184**, 1399 (1959).
296. Wacker W. E. C., Vallee B. L., J. Biol. Chem., **234**, 3257 (1959).
297. Furva K., Wacker W. E. C., Druyan R., Bartholomay A. F., Vallee B. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **46**, 1298 (1960).
298. Brown R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 465 (1961).
299. Taussig A., Creaser E. H., Arch. Biochem. Biophys., **83**, 436 (1959).
300. Chao F.-C., Arch. Biochem. Biophys., **70**, 426 (1957).
301. Ts'O P. O. P., Bonner J., Vinograd J., Biochim. et Biophys. Acta, **30**, 570 (1958).
302. Edelman I. S., Ts'O P. O. P., Vinograd J., Biochim. et Biophys. Acta, **43**, 393 (1960).
303. Petermann M. L., J. Biol. Chem., **235**, 1998 (1960).
304. Lewis U. J., Rickes E. L., McClelland L., Brink N. G., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4115 (1959).
305. Cohen S. S., Lichtenstein J., J. Biol. Chem., **235**, 2112 (1960).
306. Zilling W., Krone W., Albers M., Z. physiol. Chem., **317**, 131 (1959).
307. Mirsky A. E., Pollister A. W., J. Gen. Physiol., **30**, 117 (1946).
308. Schwander H., Signer R., Helv. Chim. Acta, **33**, 1521 (1950).
309. Hammarsten E., Biochem. Z., **144**, 383 (1924).
310. Gulland J. M., Jordan D. O., Threlfall C. J., J. Chem. Soc., **1947**, 1129.
311. Crampton C. F., Lipshitz R., Chargaff E., J. Biol. Chem., **206**, 499 (1954).
312. Butler J. A. V., Davison P. F., James D. W. F., Shooter K. V., Biochim. et Biophys. Acta, **13**, 224 (1954).

313. Bang I., Beitr. chem. Physiol. u. Path., **4**, 331 (1904); **5**, 317 (1904).
314. Hammarsten E., Biochem. Z., **144**, 383 (1924).
315. Hurst R. O., Can. J. Biochem. and Physiol., **36**, 1115 (1958).
316. Cohen S. S., J. Biol. Chem., **158**, 255 (1945).
317. Bowden F. C., Pirie N. W., Biochem. J., **34**, 1278 (1940).
318. Marko A. M., Butler G. C., J. Biol. Chem., **190**, 165 (1951).
319. Kirby K. S., Biochem. J., **66**, 495 (1957); **70**, 260 (1958).
320. Kirby K. S., Biochim. et Biophys. Acta, **36**, 117 (1959).
321. Kirby K. S., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 18 (1961).
322. Colter J. S., Brown R. A., Ellem K. A. O., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 31 (1962).
323. Vendrely R., Palmade C., Vendrely C., Nature, **178**, 1044 (1956).
324. Marmur J., J. Mol. Biol., **3**, 208 (1961).
325. Zamenhof S., Shettles L. B., Chargaff E., Nature, **165**, 756 (1950).
326. Borenfreund E., Fitt E., Bendich A., Nature, **191**, 1375 (1961); см. также [565].
327. Chargaff E., Crampton C. F., Lipshitz R., Nature, **172**, 289 (1953).
328. Crampton C. F., Lipshitz R., Chargaff E., J. Biol. Chem., **211**, 125 (1954).
329. Lipshitz R., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **19**, 256 (1956).
330. Lucy J. A., Butler J. A. V., Nature, **174**, 32 (1954).
331. Lerman L. S., Biochim. et Biophys. Acta, **18**, 132 (1955).
332. Brown G. L., Watson M., Nature, **172**, 339 (1953).
333. Brown G. L., Martin A. V., Nature, **176**, 971 (1955).
334. Main R. K., Cole L. J., Arch. Biochem. Biophys., **68**, 186 (1957).
335. Bernardi G., Biochem. Biophys. Research Commun., **6**, 54 (1961).
336. Bendich A., Fresco J. R., Rosenkranz H. S., Beiser S. M., J. Am. Chem. Soc., **77**, 3671 (1955).
337. Bendich A., Pahl H. B., Korngold G. C., Rosenkranz H. S., Fresco J. R., J. Am. Chem. Soc., **80**, 3949 (1958).
338. Rosoff M., Di Mayorca G., Bendich A., Nature, **180**, 1355 (1957).
339. Kondo N., Osawa S. S., Nature, **183**, 1602 (1959).
340. Bendich A., Pahl H. B., Beiser S. M., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **21**, 31 (1956).
341. Bendich A., Pahl H. B., Rosenkranz H. S., Rosoff M., Symp. Soc. Exp. Biol., **12**, 31 (1958).
342. Levene P. A., London E. S., J. Biol. Chem., **81**, 711 (1929); **83**, 793 (1929).
343. Klein W., Thannhauser S. J., Z. physiol. Chem., **218**, 173 (1933); **224**, 252 (1934); **231**, 96 (1935).
344. Levene P. A., J. Biol. Chem., **48**, 119 (1921); **126**, 63 (1938).
345. Brederbeck H., Berger E., Richter F., Chem. Ber., **74**, 338 (1941).
346. Levene P. A., Tipson R. S., Science, **81**, 98 (1935).
347. Levene P. A., Tipson R. S., J. Biol. Chem., **109**, 623 (1935).
348. Carter C. E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 1537 (1951).
349. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 2632.
350. Kunitz M., J. Gen. Physiol., **33**, 349 (1950).
351. Gehrman G., Okada S., Biochim. et Biophys. Acta, **23**, 621 (1957).

352. Markham R., Smith J. D., Biochim. et Biophys. Acta, **8**, 350 (1952).
353. Sinsheimer R. L., J. Biol. Chem., **208**, 445 (1954); **215**, 579 (1955).
354. de Garilhe M. P., Cunningham L., Laurila U., Laskowski M., J. Biol. Chem., **224**, 751 (1957).
355. Potter J. L., Laurila U., Laskowski M., J. Biol. Chem., **233**, 915 (1958).
356. Ralph R. K., Smith R. A., Khorana H. G., Federation, Proc., **20**, 351 (1961).
357. Potter J. L., Laskowski M., J. Biol. Chem., **234**, 1263 (1959).
358. Schumaker V. N., Richards E. G., Schachman H. K., J. Am. Chem. Soc., **78**, 4230 (1956).
359. Davis R. L., MacIntyre S. B., Lawton A. H., Abstracts 138th Am. Chem. Soc. Meeting, 54C (1960).
360. Koerner J. F., Sinsheimer R. L., J. Biol. Chem., **228**, 1039 (1957).
361. Koszalka T. R., Falkenheim R., Altman K. I., Biochim. et Biophys. Acta, **23**, 647 (1957).
362. Shimomura M., Laskowski M., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 198 (1957).
363. Fredericq E., Oth A., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 281 (1958).
364. Cunningham L., Catlin B. W., de Garilhe M. P., J. Am. Chem. Soc., **78**, 4642 (1956).
365. Laurila U., Laskowski M., J. Biol. Chem., **228**, 49 (1957).
366. Doskočil J., Šorm F., Biochim. et Biophys. Acta, **48**, 211 (1961).
367. Koerner J. F., Sinsheimer R. L., J. Biol. Chem., **228**, 1049 (1957).
368. Cunningham L., J. Am. Chem. Soc., **80**, 2546 (1958).
369. de Garilhe M. P., Cunningham L., Laurila U., Laskowski M., J. Biol. Chem., **224**, 751 (1957).
370. Pochon F., Garilhe M. P., Bull. soc. chim. biol., **42**, 795 (1960).
371. Martin A., Heppel L. A., Hurwitz J., J. Biol. Chem., **236**, 3014 (1961).
372. Dekker C. A., Ann. Rev. Biochem., **29**, 458 (1960).
373. Reddi K. K., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 47 (1961).
374. Lehman I. R., J. Biol. Chem., **235**, 1479 (1960).
375. Sinsheimer R. L., Koerner J. F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 283 (1952).
376. Koerner J. F., Sinsheimer R. L., J. Biol. Chem., **228**, 1049 (1957).
377. Heppel L. A., Hilmo R. J., in Methods in Enzymology, II, 565 (Academic Press, Inc., New York, 1955).
378. Hilmo R. J., J. Biol. Chem., **235**, 2117 (1960).
379. Heppel L. A., Rabinowitz J. C., Ann. Rev. Biochem., **27**, 621 (1958).
380. Razzell W. E., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1770 (1958); J. Biol. Chem., **236**, 1144 (1961).
381. Razzell W. E., Khorana H. G., J. Biol. Chem., **234**, 2114 (1959).
382. Felix F., Potter J. L., Laskowski M., J. Biol. Chem., **235**, 1150 (1960).
383. Adler J., Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **44**, 641 (1958).
384. Smellie R. M. S., Gray E. D., Keir H. M., Richards J., Bell D., Davidson J. N., Biochim. et Biophys. Acta, **37**, 243 (1960).
385. Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **81**, 4657 (1959).

386. Zamenhof S., Chargaff E., J. Biol. Chem., **178**, 531 (1949); **187**, 1 (1950).
387. Brawerman G., Chargaff E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4052 (1951).
388. Astrachan L., Volkin E., J. Am. Chem. Soc., **79**, 130 (1957).
389. Greer S., Zamenhof S., Federation Proc., **18**, 238 (1959).
390. Kossel A., Neumann A., Chem. Ber., **26**, 2753 (1893).
391. Steudel H., Brigl P., Z. physiol. Chem., **70**, 398 (1910—1911).
392. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **195**, 49 (1952).
393. Laland S. G., Acta Chem. Scand., **8**, 449 (1954).
394. Hurlen E., Laland S. G., Cox R. A., Peacocke A. R., Acta Chem. Scand., **10**, 793 (1956).
395. Tamm C., Chargaff E., J. Biol. Chem., **203**, 689 (1953).
396. Lucy J. A., Kent P. W., Research., **6**, 49s (1953).
397. Levene P. A., Jacobs W. A., J. Biol. Chem., **12**, 411 (1912).
398. Thannhauser S. J., Offenstein B., Z. physiol. Chem., **114**, 39 (1921).
399. Thannhauser S. J., Bianco G. G., Z. physiol. Chem., **161**, 116 (1926).
400. Levene P. A., Biol. Chem., **126**, 63 (1938).
401. Levene P. A., London E. S., J. Biol. Chem., **83**, 793 (1929).
402. Brederick H., Caro G., Z. physiol. Chem., **253**, 170 (1938).
403. Dekker C. A., Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1953**, 947.
404. Meyerhof O., Lohmann K., Biochem. Z., **271**, 98 (1934).
405. Foster A. B., Overend W. G., Stacey M., J. Chem. Soc., **980**, 987 (1951).
406. Brown D. M., Todd A. R., in The Nucleic Acids, ed. Chargaff E., Davidson H. N., **1**, 409 (Academic Press, New York, 1955).
407. Deriaz R. E., Stacey M., Teece E. G., Wiggins L. F., J. Chem. Soc., **1949**, 1222.
408. Fleury P., Courtois J., Desjobert A., Bull. Soc. Chim. (France), **1948**, 694.
409. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 596 (1957).
410. Cohn W. E., Volkin E., Biochim. et Biophys. Acta, **24**, 359 (1957).
411. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 608 (1957).
412. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 68 (1960).
413. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **39**, 62 (1960).
414. Burton K., Petersen G. B., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 667 (1957).
415. Burton K., Petersen G. B., Biochem. J., **75**, 17 (1960).
416. Burton K., Biochem. J., **74**, 35P (1960).
417. Burton K., Biochem. J., **77**, 547 (1960).
418. Kent P. W., Lucy J. A., Ward P. F. V., Biochem. J., **61**, 529 (1955).
419. Jones A. S., Letham D. S., J. Chem. Soc., **1956**, 2573.
420. Jones A. S., Letham D. S., Stacey M., J. Chem. Soc., **1956**, 2579, 2584.
421. Jones A. S., Stacey M., Watson B. E., J. Chem. Soc., **1957**, 2454.

422. Tamm C., Shapiro H. S., Lipshitz R., Chargaff E., J. Biol. Chem., **203**, 673 (1953).
423. Hodes M. E., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 348 (1956).
424. Bayley C. R., Jones A. S., Trans. Faraday Soc., **55**, 492 (1959).
425. Bayley C. R., Brammer K. W., Jones A. S., J. Chem. Soc., **1961**, 1903.
426. Ademiec A., Shugar D., Naturwissenschaften, **46**, 356 (1959).
427. Caputto R., Leloir L. F., Cardini C. E., Paladini A. C., J. Biol. Chem., **184**, 333 (1950).
428. Takemura S., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 447 (1958); Bull. Chem. Soc. (Tokyo), **32**, 920 (1959).
429. Freese E., Bautz E. K. F., Freese E. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 845 (1961).
430. Brown D. M., Schell P., J. Mol. Biol., **3**, 709 (1961).
431. Sarkar N. K., Dounce A. L., Biochim. et Biophys. Acta, **49**, 160 (1961).
432. Brederick H., Muller G., Berger E., Chem. Ber., **73**, 1058 (1940).
433. Reiner B., Zamenhof S., J. Biol. Chem., **228**, 475 (1957).
434. Zachau H., Acs G., Lipmann F., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **44**, 885 (1958).
435. Tabor H., Biochemistry, **1**, 496 (1962).
436. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 450 (1957).
437. Lawley P. D., Wallick C. A., Chem. and Ind., **1957**, 633.
438. Brookes P., Lawley P. D., J. Chem. Soc., **1960**, 539.
439. Butler J. A. V., Gilbert L., James D. W. F., Ross W. C. J., Nature, **168**, 985 (1951).
440. Brookes P., Lawley P. D., Biochem. J., **80**, 496 (1961).
441. Alexander P., Scientific American, **202**, 99 (1960).
442. Cohn W. E., Biochem. J., **64**, 28P (1956).
443. Suzuki T., Ito E., J. Biochem. (Tokyo), **45**, 403 (1958).
444. Ishihara H., Suzuki N., Nature, **182**, 1302 (1958).
445. Jones A. S., Woodhouse D. L., Nature, **183**, 1603 (1959).
446. Brederick H., Jochmann I., Chem. Ber., **75**, 395 (1942).
447. Brederick H., Hoepfner E., Chem. Ber., **75**, 1086 (1942).
448. Fischer F. G., Naturwissenschaften, **30**, 377 (1942).
449. Hurst R. O., Can. J. Biochem. and Physiol., **34**, 265 (1956).
450. Hurst R. O., Kukis A., Can. J. Biochem. and Physiol., **36**, 919 (1958).
451. Vischer E., Chargaff E., J. Biol. Chem., **176**, 715 (1948).
452. Daly M. M., Allfrey V. G., Mirsky A. E., J. Gen. Physiol., **33**, 497 (1950).
453. Marshak A., Vogel H. J., J. Biol. Chem., **189**, 597 (1951).
454. Wyatt G. R., Cohen S. S., Biochem. J., **55**, 774 (1953).
455. Chargaff E., Lipshitz R., J. Am. Chem. Soc., **75**, 3658 (1953).
456. Wyatt G. R., Nature, **166**, 237 (1950); Biochem. J., **48**, 581, 584 (1951).
457. Brawerman G., Chargaff E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4052 (1951).
458. Dekker C. A., Elmore D. T., J. Chem. Soc., **1951**, 2864.
459. Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc., **72**, 2811 (1950); **73**, 1539 (1951).
460. Dunn D. B., Smith J. D., Biochem. J., **68**, 627 (1958).
461. Chargaff E., Federation Proc., **10**, 654 (1951).
462. Wyatt G. R., Cohen S. S., Nature, **170**, 1072 (1952); Biochem. J., **55**, 774 (1953).
463. Volkin E., J. Am. Chem. Soc., **76**, 5892 (1954).

464. Sinsheimer R., Science, **120**, 551 (1954).
465. Loeb M. R., Cohen S. S., J. Biol. Chem., **234**, 364 (1959).
466. Lichtenstein J., Cohen S. S., J. Biol. Chem., **235**, 1134 (1960).
467. Koerner J. F., Varadarajan S., J. Biol. Chem., **235**, 2688 (1960).
468. Jesaitis M. A., Nature, **178**, 637 (1956); J. Exptl. Med., **106**, 233 (1957).
469. Weed L. L., Courtenay T. A., J. Biol. Chem., **206**, 735 (1954).
470. Sinsheimer R. L., Science, **125**, 1123 (1957).
471. Sinsheimer R. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **42**, 502 (1956).
472. Lehman I. R., Pratt E. A., J. Biol. Chem., **235**, 3254 (1960).
473. Chargaff E., Lipshitz R., J. Am. Chem. Soc., **75**, 3658 (1953).
474. Uzman L. L., Desoer C., Arch. Biochem. Biophys., **48**, 63 (1954).
475. Hurst R. O., Marko A. M., Butler G. C., J. Biol. Chem., **204**, 847 (1953).
476. Chargaff E., Lipshitz R., Green C., Hodes M. E., J. Biol. Chem., **192**, 223 (1951).
477. Урисон С. О., Белозерский А. Н., ДАН СССР, **125**, 1144 (1958).
478. Zamenhof S., Brawerman G., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **9**, 402 (1952).
479. Wyatt G. R., Cohen S. S., Biochem. J., **55**, 774 (1953).
480. Chargaff E., Experientia, **6**, 201 (1950).
481. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, **171**, 737, 964 (1953).
482. Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., **1**, 43 (1959).
483. Chargaff E., Zamenhof S., Green C., Nature, **165**, 756 (1950).
484. Wyatt G. R., Biochem. J., **48**, 584 (1951).
485. Mead C. G., Fox A. S., Federation Proc., **20**, 353 (1961).
486. Zamenhof S., Chargaff E., J. Biol. Chem., **187**, 1 (1950).
487. Белозерский А. Н., «Нуклеопротенды и нуклеиновые кислоты растений и их биологическое значение», стр. 28, Изд. АН СССР, Москва, 1958.
488. Урисон С. О., Белозерский А. Н., ДАН СССР, **132**, 708 (1960).
489. Lunan K. D., Sinsheimer R. L., Virology, **2**, 455 (1956).
490. Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., **1**, 43 (1959).
491. Chargaff E., Zamenhof S., Brawerman G., Kerin L., J. Am. Chem. Soc., **72**, 3825 (1950).
492. Smith J. D., Wyatt G. R., Biochem. J., **49**, 144 (1951).
493. Gandelman B., Zamenhof S., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **9**, 399 (1952).
494. Спирин А. С., Белозерский А. Н., Кудлай Д. Б., Шавронская А. Г., Митерева В. Г., Биохимия, **23**, 154 (1958).
495. Lee K. Y., Wahl R., Warbu E., Ann. Inst. Pasteur, **91**, 212 (1956).
496. Белозерский А. Н., Спирин А. С., Изв. АН СССР, серия биол., **25**, 64 (1960).
497. Rolfe R., Meselson M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 1039 (1959).
498. Sueoka N., Marmur J., Doty P., Nature, **183**, 1429 (1959).
499. Miescher F., Hoppe-Seyler's Med.-chem. Untersuchungen, **4**, 441 (1871).
500. Kossel A., Z. physiol. Chem., **8**, 511 (1884).
501. Lilienfeld L., Z. physiol. Chem., **18**, 473 (1894).

502. Vendrely R., Knobloch Q., Matsudaira H., Nature, **181**, 343 (1958).
503. Chargaff E., Sidel H. F., J. Biol. Chem., **177**, 417 (1949).
504. Davison P. F., Butler J. A. V., Biochim. et Biophys. Acta, **21**, 568 (1956).
505. Crampton C. F., Chargaff E., J. Biol. Chem., **226**, 157 (1957).
506. Crampton C. F., Scheer J. F., J. Biol. Chem., **227**, 495 (1957).
507. Zubay G., Doty P., J. Mol. Biol., **1**, 1 (1959).
508. Emery A. J., Lesko S. A., Federation Proc., **19**, 305 (1960).
509. Sakar N. K., Dounce A. L., Arch. Biochem. Biophys., **92**, 321 (1961).
510. Немчинская В. Л., Биохимия, **15**, 478 (1950).
511. Klammerth O., Biochem. Z., **328**, 443 (1957).
512. Klammerth O., Z. Naturforsch., **12b**, 186 (1957).
513. Emmerson P., Scholes G., Thomson D. H., Ward J. F., Weiss J., Nature, **187**, 319 (1960).
514. Peacocke A. R., Preston B. N., Nature, **192**, 228 (1961).
515. Alexander P., Nature, **169**, 226 (1952); Biochim. et Biophys. Acta, **10**, 595 (1953).
516. Hammarsten E., Biochem. Z., **144**, 383 (1924).
517. Spitnik P., Lipshitz R., Chargaff E., J. Biol. Chem., **215**, 765 (1955).
518. Белозерский А. Н., Базилина Г. Д., Биохимия, **9**, 134 (1944).
519. Ohlmeyer P., Biochim. et Biophys. Acta, **4**, 229 (1950).
520. Greenstein J. P., Hoyer M. L., J. Biol. Chem., **182**, 457 (1950).
521. Zubay G., Doty P., Biochim. et Biophys. Acta, **23**, 213 (1957).
522. Дискаина Б. С., Спитковский Д. М., Биофизика, **3**, 633 (1958).
523. Опарин А. И., Деборин Г. А., Баранова В. З., ДАН СССР, **116**, 270 (1957).
524. Hofstee B. H. J., Biochim. et Biophys. Acta, **44**, 194 (1960).
525. Monty K. J., Dounce A. L., J. Gen. Physiol., **41**, 595 (1958).
526. Ames B. N., Dubin D. T., Rosenthal S. M., Science, **127**, 814 (1958).
527. Kay D., Biochem. J., **73**, 149 (1959).
528. Ames B. N., Dubin D. T., J. Biol. Chem., **235**, 769 (1960).
529. Fraser D., Mahler H. R., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6456 (1958).
530. Tabor H., Biochem. Biophys. Research Commun., **4**, 228 (1961).
531. Keister D. L., Federation Proc., **17**, 84 (1958).
532. Фриш-Ниггемейер В., Гофман-Остенхоф О., Биохимия, **22**, 404 (1957).
533. Mahler H. R., Mehrotra B. D., Sharp C. W., Biochem. Biophys. Research Commun., **4**, 79 (1961).
534. Mahler H. R., Mehrotra B. D., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 252 (1962).
535. Hammarsten E., Biochem. Z., **144**, 383 (1924).
536. Stern K. G., Steinberg M. A., Biochim. et Biophys. Acta, **11**, 553 (1953).
537. Zubay G., Doty P., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 47 (1958).
538. Cavalieri L. F., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1242 (1952).
539. Zubay G., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 233 (1959).
540. Shack J., Wynum B. S., Nature, **184**, 535 (1959).
541. Shack J., Jenkins R. J., Thompson J. M., J. Biol. Chem., **193**, 85 (1952); **203**, 373 (1953).

СИНТЕЗЫ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

542. Pour-El A., Dekker C. A., Abstracts 137th Am. Chem. Soc. Meeting 13C (1960).
543. Dove W. F., Yamane T., Biochem. Biophys. Research Commun., **3**, 608 (1960).
544. Eissinger J., Shulman R. G., Blumberg W. E., Nature, **192**, 963 (1961).
545. Stevens V. L., Duggan E. L., J. Am. Chem. Soc., **79**, 5703 (1957).
546. Kirby K. S., Biochem. J., **66**, 495 (1957); **70**, 260 (1958).
547. Fraenkel-Conrat H., Ward W. H., Snell N. S., Ducay E. D., J. Am. Chem. Soc., **72**, 3826 (1950).
548. Fraenkel-Conrat H., Snell N. S., Ducay E. D., Arch. Biochem. Biophys., **39**, 80 (1952).
549. Fredericq E., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 300 (1962).
550. Kirby K. S., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 382 (1962).
551. Mandell J. D., Hershey A. D., Anal. Biochem., **1**, 66 (1960).
552. Philipson L., J. Gen. Physiol., **44**, 899 (1961).
553. Takai M., Kondo N., Osawa S., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 416 (1962).
554. Gilham P. T., J. Am. Chem. Soc., **84**, 687 (1962).
555. Kaltreider H. B., Scott J. F., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 379 (1962).
556. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Biochemistry, **1**, 120 (1962).
557. Apgar J., Holley R. W., Merrill S. H., J. Biol. Chem., **237**, 796 (1962).
558. Sueoka N., Cheng T. Y., J. Mol. Biol., **4**, 161 (1962).
559. Rushizky G. W., Sober H. A., J. Biol. Chem., **237**, 834 (1962).
560. Kuno S., Lehman I. R., J. Biol. Chem., **237**, 1266 (1962).
561. Witzel H., Barnard E. A., Biochem. Biophys. Research Commun., **7**, 289, 295 (1962).
562. Bautz E. K. F., Hall B. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **48**, 400 (1962).
563. Gilham P. T., J. Am. Chem. Soc., **84**, 1311 (1962).
564. Ralph R. K., Young R. J., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 1490 (1962).
565. Pfau C. J., McCrea J. F., Nature, **194**, 894 (1962).
566. Zubay G., J. Mol. Biol., **4**, 347 (1962).
567. Rushizky G. W., Sober H. A., Knight C. A., Biochim. et Biophys. Acta, **61**, 56 (1962).
568. Sueoka N., Yamane T., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **48**, 1454 (1962).
569. Tomlinson E. V., Tener G. M., J. Am. Chem. Soc., **84**, 2644 (1962).
570. Bolton E. T., McCarthy B. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **48**, 1390 (1962).
571. Levin D. H., Biochim. et Biophys. Acta, **61**, 75 (1962).
572. Whitfeld P. R., J. Biol. Chem., **237**, 2865 (1962).
573. Radding C. M., Kornberg A., J. Biol. Chem., **237**, 2877 (1962).
574. Habermann V., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 999 (1962).
575. Marmur J., Cordes S., Symposium on Informational Macromolecules, Rutgers University, Sept., 1962.

Химический синтез нуклеиновых кислот (в биологическом смысле этого слова) пока еще не осуществлен, однако в конечном счете это будет достигнуто при условии, что будет определена точная структура природных полимеров. Методы полимеризации мононуклеотидов оказались уже сейчас пригодными для синтеза* олигонуклеотидов и низших полинуклеотидов при контроле последовательности нуклеотидов.

КЛАССИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

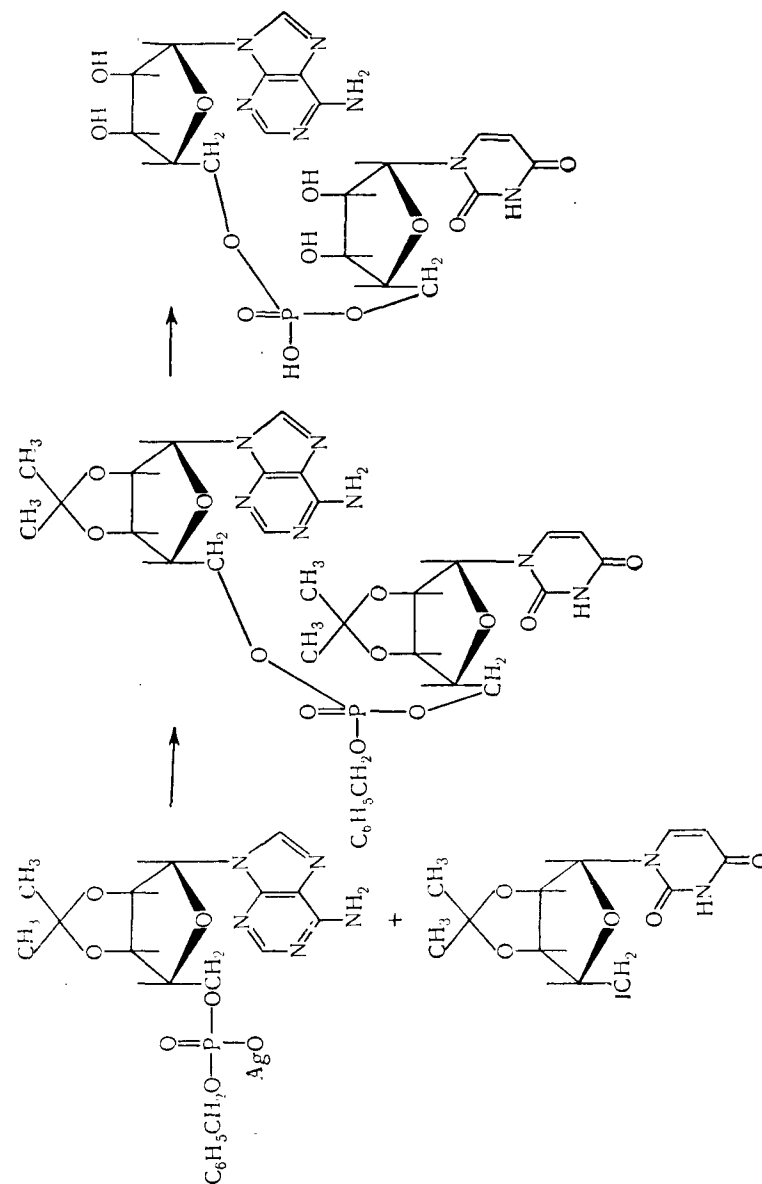
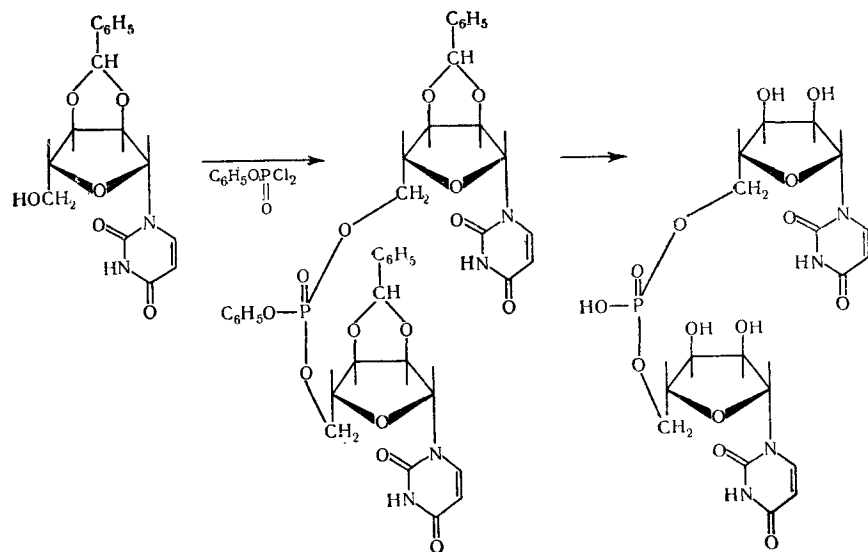
Первые синтетические динуклеозидные эфиры фосфорной кислоты были получены при помощи более или менее классических методов органической химии. В результате обработки 2',3'-О-бензилиденуридина (которому в то время приписывалась структура 3',5'-О-бензилиденуридина) фенилдихлорфосфатом с последующим удалением защитных групп образуется ди(уридин-5')-фосфат [1]. Аналогичное нуклеотидное производное, аденозин-5'-уридин-5'-фосфат (аденилил-5':5'-уридин**), получается при реакции серебряной соли 2',3'-О-изопропилиденаденозин-5'-бензилфосфата с 2',3'-О-изопропилиден-5'-иод-5'-дезоксинуридином, причем защитные группы удаляются из промежуточного нейтрального триэфира кислотным гидролизом в мягких условиях [2]. Оба диэфира оказались устойчивыми при щелочном гидролизе.

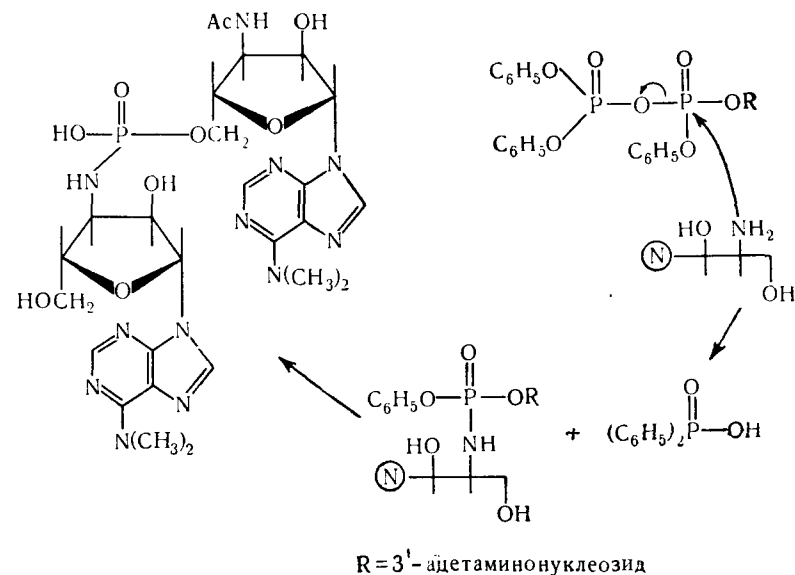
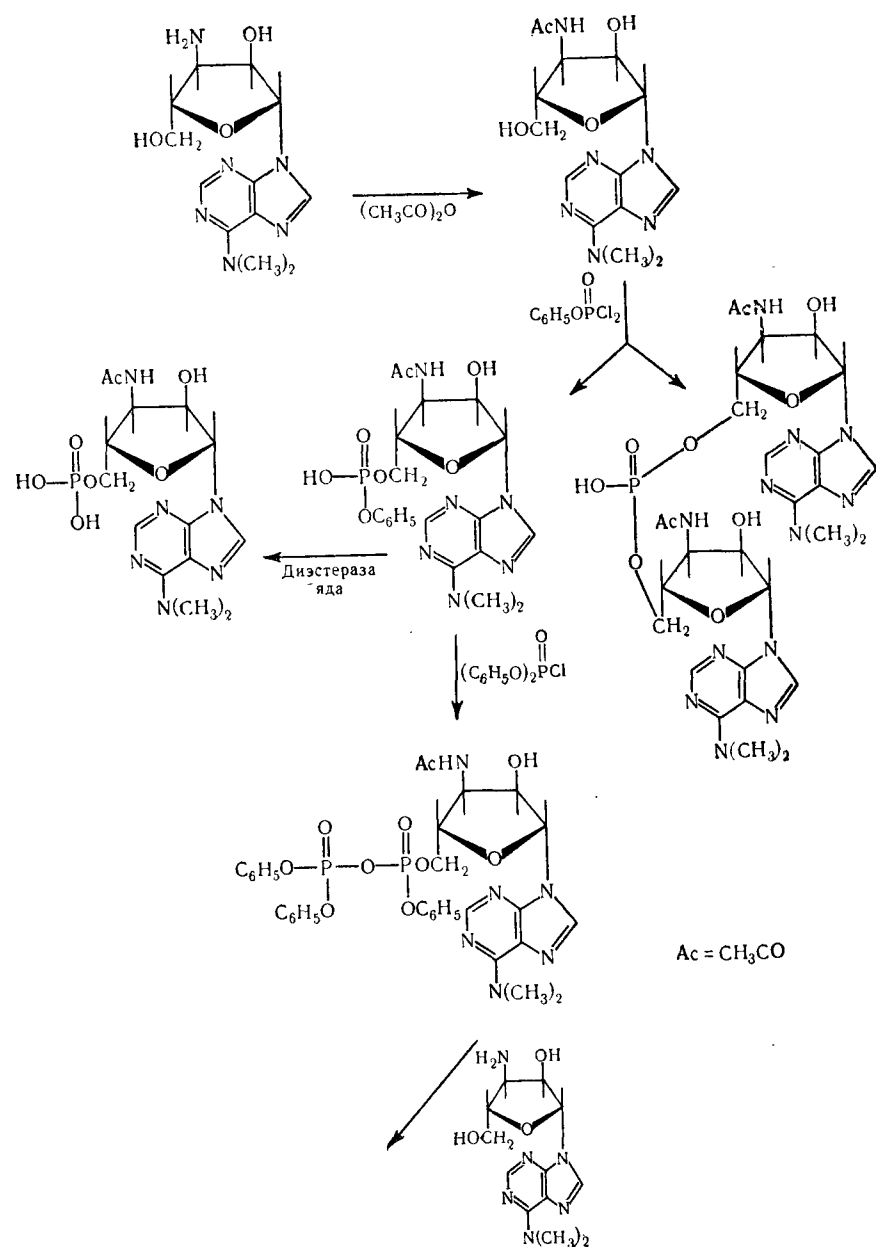
Фенилдихлорфосфат использовался также для синтеза динуклеозидфосфатов, производных входящего в состав пурамицина аминокислоты, 6-диметиламино-9-β-D-3'-амино-3'-дезоксирибозуридина. Избирательное ацетилирование 3'-аминогруппы приводит к ацетаминонуклеозиду, при обработке которого фенилдихлорфосфатом с последующим щелочным гидролизом в мягких условиях образовывалась смесь ди(ацетаминонуклеозид-5')-фосфата и 6-димер-

* См. также обзоры: Женодарова С. М., Усп. химии, **34**, 82 (1965) и Корана Г., Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты, изд. «Мир», М., 1964, стр. 110.— Прим. ред.

** Используемая в книге номенклатура олигонуклеотидов несколько отличается от принятой в настоящее время американской номенклатуры (см. приведенное выше примечание редактора).— Прим. ред.

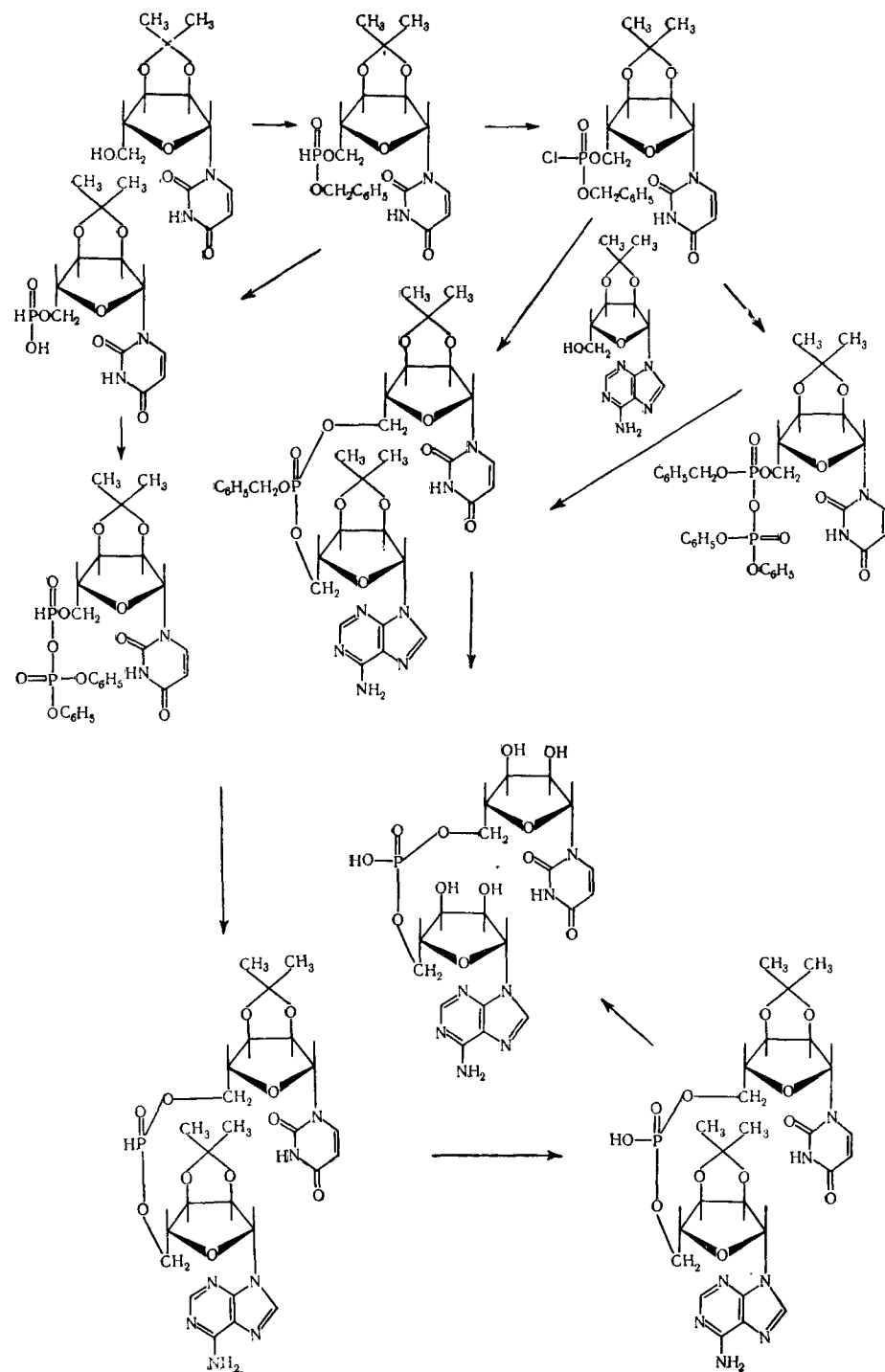
тиламино-9-β-D-3'-ацетамин-3'-дезоксирибофураноз и лпурин-5'-фенилфосфата. Компоненты этой смеси легко разделяются с помощью ионообменной хроматографии. Дальнейшая обработка второго соединения дифенилхлорфосфатом дает тетраэтерифицированный промежуточный пирофосфат, который при реакции со свободным аминокнуклеозидом в присутствии основания образует с хорошим выходом 3'—5'-связанный динуклеозидфосфат, причем самопроизвольное отщепление фенильной группы в полностью этерифицированном фосфоамидном производном происходит при pH 9. Защита свободной 5'-гидроксильной группы не обязательна, так как можно ожидать значительную избирательность нуклеофильной атаки аминокнуклеотидного атома фосфора с выделением дифенилфосфата [3]. Успешное применение полностью этерифицированных промежуточных пирофосфатов можно объяснить использованием диоксана (в качестве растворителя) и три *n*-бутиламина (в качестве пространственно затрудненного третичного основания); при таких условиях не наблюдается диспропорционирования (образования симметричных пирофосфатных производных). Кроме того, важное значение имеет легкость фосфорилирования аминокнуклеотидных групп по сравнению с гидроксильными группами. Далее, можно отметить, что благодаря несоизмеримости реакционной способности вторичной и первичной гидроксильных групп при используемых условиях отсутствовала необходимость в защите 2'-гидроксильной группы при фосфорилировании (в 5'-положение) ацетаминонуклеозидов.





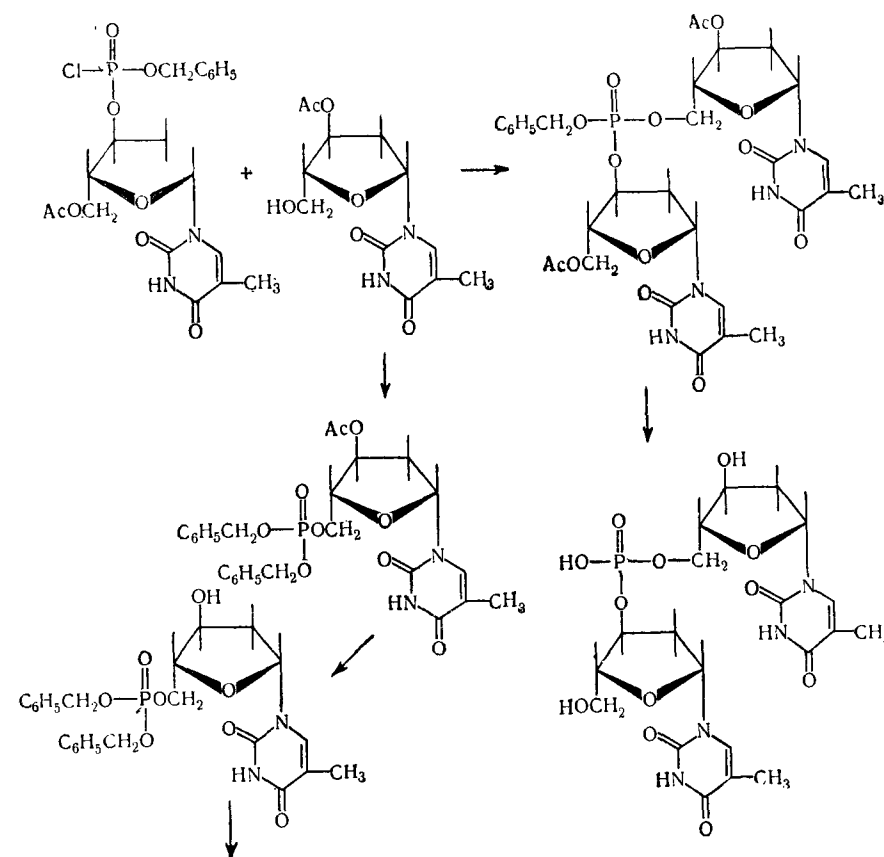
Помимо большого гипохромного эффекта, проявляемого обоими динуклеозидфосфатами, большой интерес представляют и другие свойства. Так, например, ацетаминонуклеозид-5'-фенилфосфат легко превращается в 5'-фосфат при действии диэстеразы яда гремучей змеи (полученный нуклеотид был устойчив к моноэстеразе, присутствовавшей в неочищенном яде), а ди(ацетаминонуклеозид-5')-фосфат не изменяется при действии диэстеразы, так же как и динуклеозидфосфат с 3'—5'-связью [3]. Как и следовало ожидать, 5'—5'-диэфир устойчив к кислотному или щелочному гидролизу в мягких условиях, в то время как другой диэфир легко разлагается разбавленной кислотой до аминонуклеозида и нуклеотида (по-видимому, 5'-фосфата), оставаясь, однако, устойчивым к действию щелочи в противоположность обычным 3'—5'-связанным дирибонуклеозидфосфатам (ср. также свойства эфиров этаноламинфосфата) [4,5]. При взаимодействии свободного аминонуклеозида с дифенилхлорфосфатом или тетрабензилпирофосфатом получают промежуточные соединения с подобными свойствами.

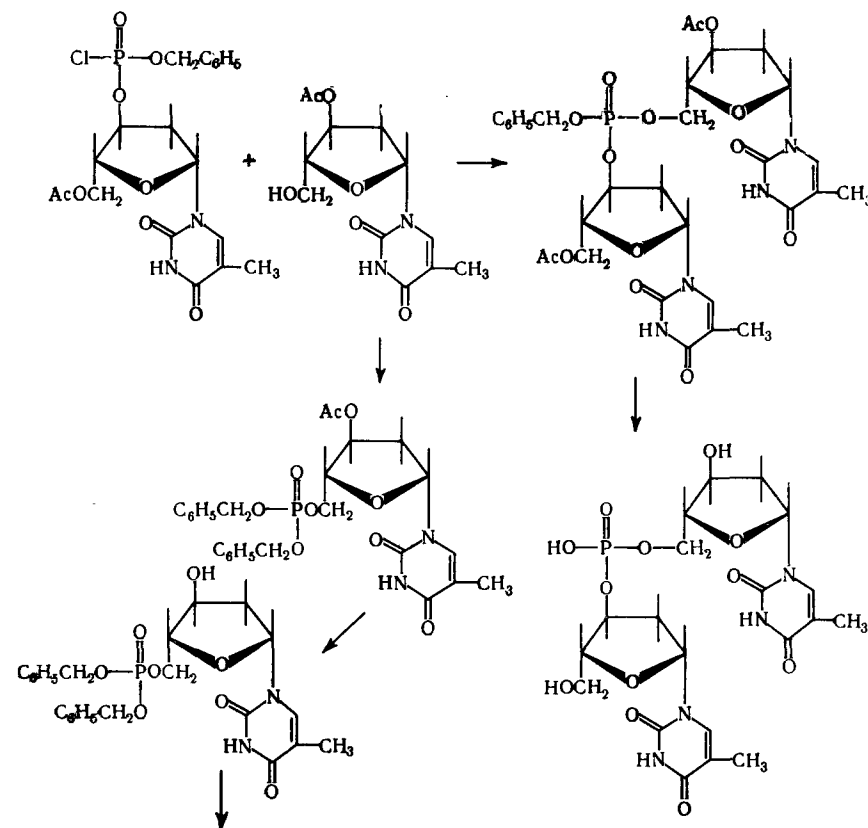
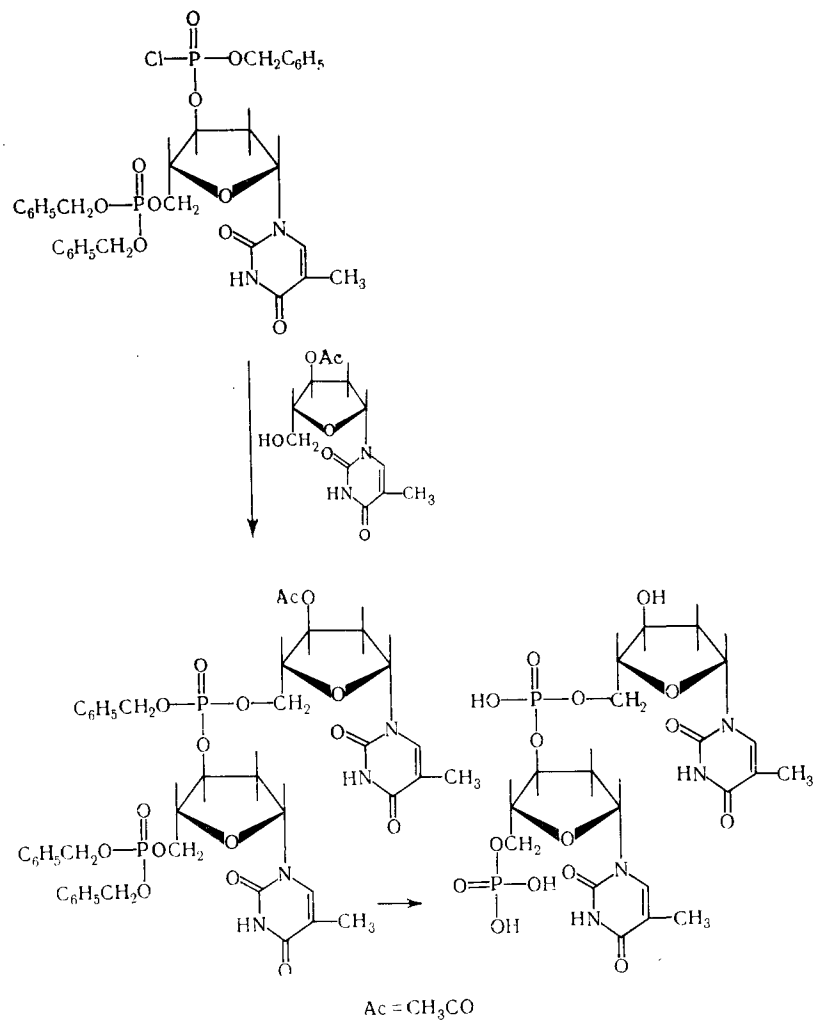
Удобными промежуточными соединениями при синтезе относительно простых эфиров нуклеотидов являются нуклеозид-5'-бензилфосфиты [6]. После превращения их в нуклеозид-5'-бензилхлорфосфат и последующей обработки подходящим образом защищенным нуклеозидом в присутствии основания образуется ди(нуклеозид-5')-фосфат. Аденилил-5':5'-уридин был получен с высоким выходом при использовании смешанных ангидридов, приготовленных из



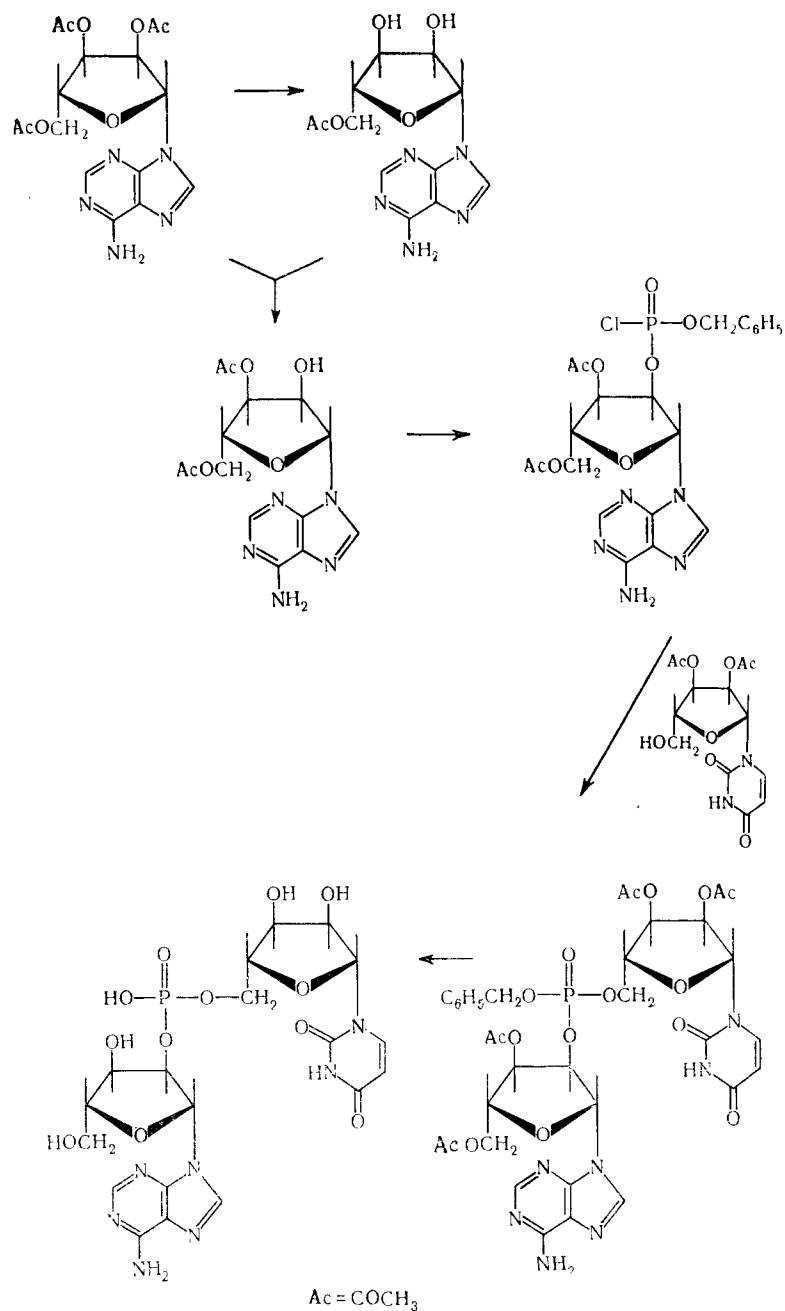
защищенных нуклеозид-5'-бензилхлорфосфата и дифенилфосфорной или трифторуксусной кислоты. Дальнейшей модификацией этого метода было использование в реакции с 2',3'-ди-О-ацетил- или 2',3'-О-изопропилиденнуклеозидами смешанных ангидридов, образующихся из дифенилхлорфосфата и нуклеозид-5'-фосфита (полученного анионным дебензилированием защищенного нуклеозид-5'-бензилфосфита). В результате этих реакций образуются ди(нуклеозид-5')-фосфиты. Окисление динуклеозидфосфита N-хлорсукцинимидом (с образованием хлорфосфата) с последующим гидролизом и удалением защитных групп приводит к ди(нуклеозид-5')-фосфату.

Однако лишь в 1955 г. был осуществлен первый синтез динуклеотида, содержащего 3'—5'-межнуклеотидную связь, идентичную межнуклеотидной связи в нуклеиновых кислотах [7]. В результате





частичного дезацетилирования 3',5'-ди-О-ацетилтимидина была получена смесь 3'-О-ацетилтимидина (идентифицированного сравнением с ацетатом, полученным через 5'-О-тритилтимидин) и 5'-О-ацетилтимидина. При реакции 3'-О-ацетилтимидина с 5'-О-ацетилтимидин-3'-бензилхлорфосфатом (из нуклеозидбензилфосфита) образуется полностью защищенный динуклеозидфосфат, бензильная группа которого удалялась гидрогенолизом. Продуктом последующего дезацетилирования щелочью является тимидилил-5': 3'-тимидин (тимидин-3'-тимидин-5'-фосфат). Аналогичным способом получается динуклеотид — тимидилил-5': 3'-тимидин-5'-фосфат, который был выделен в виде кристаллической кальциевой соли. Фосфорилирование 3'-О-ацетилтимидина дибензилхлорфосфатом с последующим дезацетилированием приводит к тимидин-5'-добен-



зилфосфату, который был превращен затем в тимидин-3'-бензилфосфит-5'-дibenзилфосфат обработкой смешанным ангидридом бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот. При хлорировании получается хлорфосфат, который при реакции с 3'-О-ацетилтимидином в присутствии основания превращался в защищенный динуклеотид. Кислотным гидролизом с последующей обработкой щелочью удаляли две из трех бензильных групп и ацетильную группу. Последующий каталитический гидрогенолиз монобензилпроизводного приводит к образованию динуклеотида [7].

Несмотря на осложнения, связанные с наличием *цис*-гликольной группы в рибонуклеозидах, метод был с успехом распространен на синтез аденозин-2'-уридин-5'-фосфата [8]. В результате транс-ацетилирования из 2',3',5'-три-О-ацетиладенозина и 5'-О-ацетиладенозина (полученного непосредственно при частичном дезацетилировании триацетата) образуется с хорошим выходом 3',5'-ди-О-ацетиладенозин. Последний превращается обычным путем в 2'-бензилхлорфосфат, который вводится в реакцию с 2',3'-ди-О-ацетилауридином.

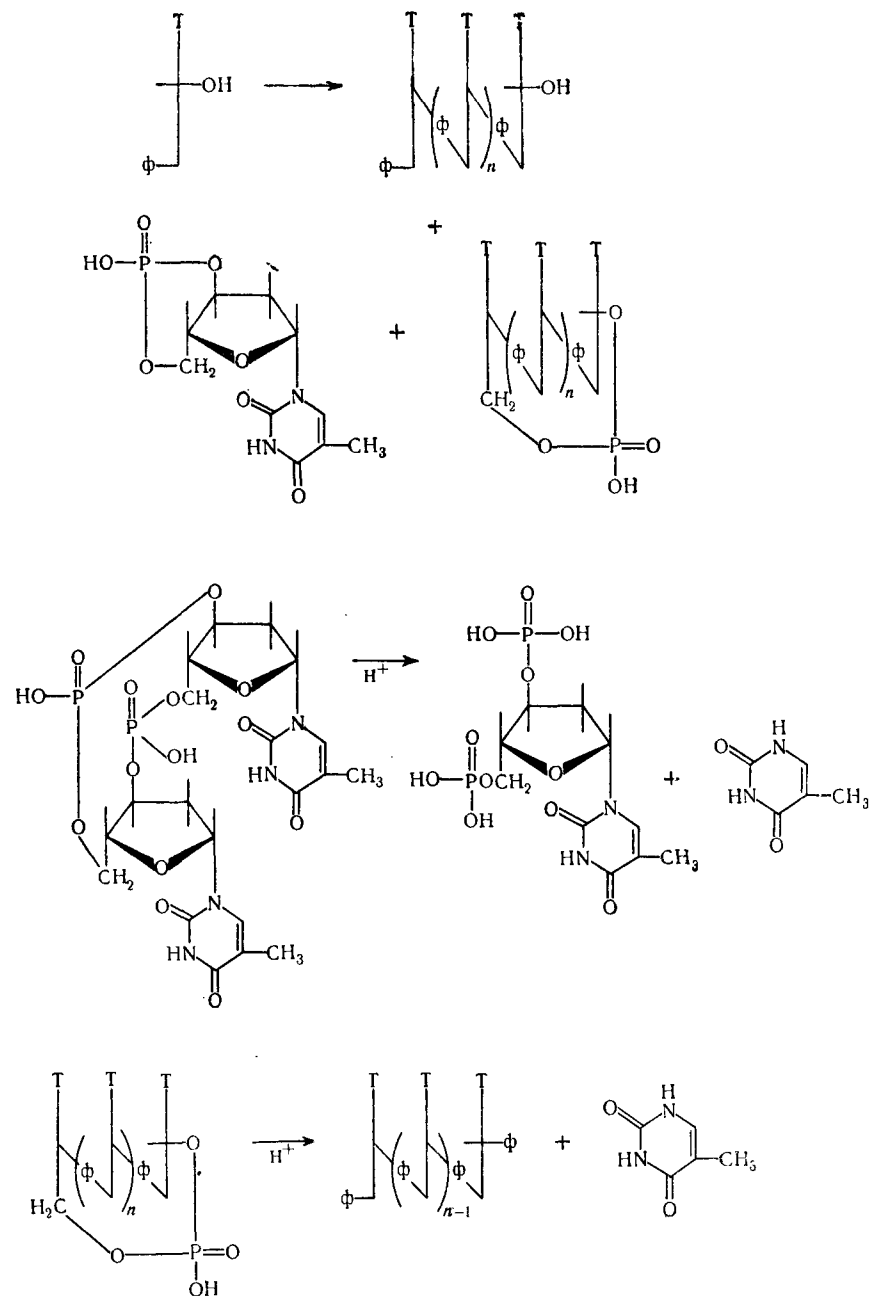
После гидрогенолиза бензильной группы и обработки щелочью в очень мягких условиях образовалась смесь продуктов, из которой аденилил-2': 5'-уридин (аденозин-2'-уридин-5'-фосфат) выделяли с помощью ионообменной хроматографии. В противоположность щелочеустойчивому ди(нуклеозид-5')-фосфату, который был описан выше, этот диэфир обнаружил многие свойства, характерные для рибонуклеиновых кислот. При щелочном гидролизе этого динуклеозидфосфата образуются уридин и смесь аденозин-2'- и аденозин-3'-фосфатов; ферментативный гидролиз диэстеразой змеиного яда приводит к аденозину и уридин-5'-фосфату; а при окислении периодатом с последующим выдерживанием при pH 10 получают урацил и аденозин-2'-фосфат [8].

ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИИМИД

Хотя первые удачные попытки и продемонстрировали возможность синтеза олигонуклеотидов, были очевидны значительные трудности в проведении таких синтезов и необходимость разработки более простых и более эффективных методов. Ранние исследования показали, что при обработке пиридиниевой соли уридин-5'-фосфата в диметилформамиде большим избытком дициклогексилкарбодиимида образуются вещества, имеющие, вероятно, более высокий молекулярный вес, чем ожидавшийся динуклеозидпирофосфат [9]. В дальнейшем обнаружили, что реакция тимидин-5'-фосфата либо с *n*-толуолсульфохлоридом, либо лучше с дициклогексилкарбодиимидом в безводном пиридине приводит к ряду полимерных

продуктов [10]. Фракционирование сложной смеси на колонке, заполненной целлюлозным анионообменным материалом, обнаружило присутствие двух больших серий веществ; они были идентифицированы как линейные олигодезоксинуклеотиды (с 3'—5'-межнуклеотидными связями), содержащие концевой 5'-моноэтерифицированный фосфатный остаток, и гомологический ряд циклических олигонуклеотидных производных, получающихся в результате фосфорилирования концевой 3'-гидроксильной группы 5'-фосфатной группой, находящейся на другом конце олигонуклеотида. Степень внутримолекулярной циклизации уменьшается с увеличением длины цепи; так, циклического пентануклеотида образуется только небольшое количество по сравнению с линейной пентатимидиловой кислотой. Члены обоих рядов вплоть до пентануклеотида были выделены в сравнительно чистом состоянии и охарактеризованы химическими и ферментативными методами. Низкие выходы олигонуклеотидов объясняются частично образованием неидентифицированных нуклеотидных производных; однако хроматографические методы свидетельствовали о присутствии полимеров, содержащих до одиннадцати нуклеотидов. Диэстераза змеиного яда легко расщепляет линейные полимеры до тимидин-5'-фосфата, тогда как при обработке моноэстеразой предстательной железы (для удаления концевой 5'-фосфата) и затем диэстеразой селезенки получают тимидин-3'-фосфат и концевой тимидин. Длина цепи определялась из отношения количества общего фосфора к количеству фосфора, образующегося при обработке полимера моноэстеразой, и из относительных количеств мононуклеотида и нуклеозида, образовавшегося при гидролизе диэстеразой (яда или селезенки) полученного олигонуклеотида, у которого предварительно был удален концевой фосфатный остаток. Однако, поскольку даже очищенная диэстераза яда может содержать пирофосфатазу [11], очень желательно безукоризненное доказательство чистоты, гомогенности и структуры высших олигонуклеотидов.

Общая структура циклических олигодезоксинуклеотидов была определена по отсутствию моноэтерифицированных фосфатных концевых групп в исследованных ди-, три-, тетра- и пентатимидиловых кислотах. Подтверждением этому служит быстрое превращение линейных дитимидиловых и тритимидиловых кислот в соответствующие циклические олигодезоксинуклеотиды при взаимодействии с дициклогексилкарбодимидом в пиридине. Диэстераза яда вызывает полное расщепление до тимидин-5'-фосфата, хотя гидролиз циклических динуклеотидов протекал намного медленнее, чем гидролиз линейных соединений. В противоположность P^1 , P^2 -дитимидин-5'-пирофосфату циклический динуклеотид устойчив к действию 0,1 н. соляной кислоты при 100°. Тем не менее кислотный гидролиз в более жестких условиях приводит к образованию тимидин-3',



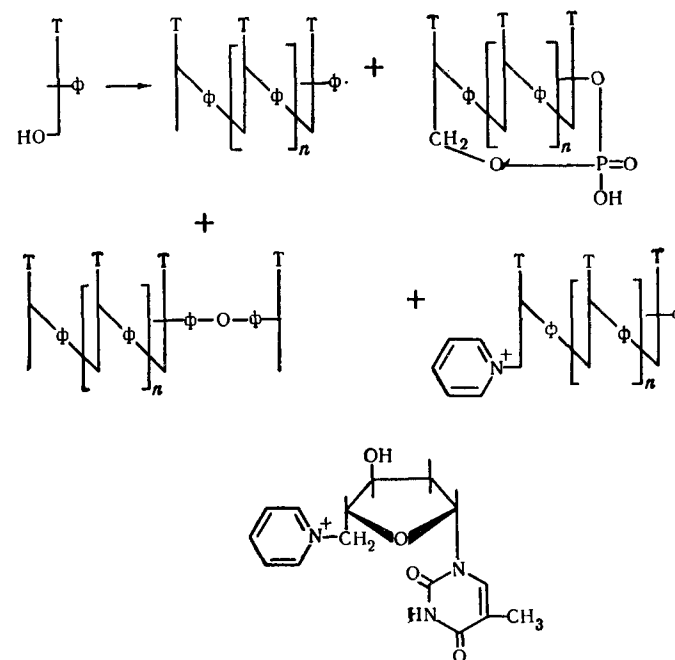
5'-дифосфата, тимина и неорганического фосфата. Подобным образом при кислотном гидролизе высших циклических олигодезоксинуклеотидов образуются линейные олиготимидиловые кислоты с концевыми моноэтерифицированными остатками фосфорной кислоты на обеих 3'- и 5'-гидроксильных группах и на один тимидин меньше, т. е. (тимидин)_n(фосфат)_n превращается в (тимидин)_{n-1}(фосфат)_n. В каждом случае начальная стадия состоит в расщеплении тимин-гликозидной связи с последующим освобождением фосфата из апириимидинового остатка дезоксирибозы так же, как при кислотном гидролизе дезоксирибонуклеиновых кислот.

Аналогично при полимеризации тимидин-3'-фосфата (который сначала превращается в P¹,P²-дитимидин-3'-пирофосфат) при обработке избытком дициклогексилкарбодиимида в безводном пиридине образуется сложная смесь продуктов [12]. Наряду с гомологическим рядом циклических олигонуклеотидов, образующихся из линейных соединений фосфорилированием 5'-гидроксильной группы, находящейся на одном конце, 3'-фосфатным остатком, находящимся на другом, были получены с еще более низкими выходами линейные тимидинолигонуклеотиды (вплоть до пентануклеотида), несущие 3'-фосфатные концевые группы.

Были обнаружены также два других ряда нуклеотидных компонентов, один из которых состоит из полимеров, содержащих P¹,P²-дитимидин-3'-пирофосфаты наряду с соединениями с 3'—5'-межнуклеотидной связью. Избирательного гидролиза пирофосфатной связи можно добиться кислотной обработкой в мягких условиях, в результате которой образуются нуклеотидные или олигонуклеотидные компоненты, которые до гидролиза были связаны пирофосфатными группами. Члены других гомологических рядов были опытным путем идентифицированы как олигонуклеотиды, содержащие 5'-дезоксипиридиниевое производное концевого нуклеозида [12].

Количество циклических олигонуклеотидов можно несколько уменьшить полимеризацией тимидин-5'-фосфата (3 части) в присутствии 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата (1 часть) в качестве агента, прикрывающего цепь. В результате продолжительной обработки (в течение 6 дней) смеси дициклогексилкарбодиимидом в пиридине при комнатной температуре и последующего щелочного гидролиза образуется сложная смесь соединений, основным в которой был циклический динуклеотид. Линейные полимеры, содержащие 2—11 нуклеотидов (с общим выходом около 50%), были частично очищены и охарактеризованы (без выделения в твердом состоянии) посредством многократного хроматографирования на колонке [13]. При этом были обнаружены также многочисленные неидентифицированные побочные соединения. Заключение о чистоте и гомогенности отдельных пиков, полученных в результате хрома-

тографии на целлюлозных анионообменных материалах, необходимо делать с большой осторожностью, так как хроматография на бумаге нескольких таких фракций обнаружила по пять и более соединений, а повторная хроматография декануклеотида дала хроматографический профиль, показывавший на присутствие наряду с декануклеотидом приблизительно десяти побочных продуктов. Подобным



образом при сополимеризации N⁶,3'-О-диацетилдезокситидин-5'-фосфата с тимидин-5'-фосфатом образовалась чрезвычайно сложная смесь продуктов, среди которых были линейные олиготимидиловые кислоты, имеющие на конце цепи дезокситидин-5'-фосфатный остаток.

Из-за осложнений, связанных с присутствием 6-аминогруппы, дезокситидин-5'-фосфат непосредственно нельзя подвергать полимеризации. Поэтому был предложен метод защиты, согласно которому нуклеотид полностью ацилировали избытком анизилхлорида (*n*-метоксибензоилхлорида) и продукт обрабатывали щелочью при тщательно контролируемых условиях. В результате избирательного отщепления О-анизоильных групп (связанных с гидроксильными или фосфатными группами) образовывался N⁶-анизилдезоксиди-

фосфорилирования защищенных нуклеозидов пока ничего неизвестно. Хотя эти результаты и представляют некоторый интерес, они никоим образом не обосновывают идею о «мономерном метафосфате» как *начальном* фосфорилирующем промежуточном соединении, несмотря на заключение, к которому можно прийти [18]. Прямое одностадийное образование триалкилтриметафосфатов из моноалкилфосфата весьма маловероятно; однако они с успехом могут образовываться из ранее полученного мономерного метафосфата в безводных условиях. В любом случае растворитель (пиридин) играет несомненно важную роль.

Хотя принято считать общим метод, «в котором фосфомоноэфирная группировка активируется непосредственно» [10], ясно, что реакция даже с простейшими нуклеотидами (по сравнению с соединениями, содержащими функциональные группы, которые могут вызвать различные осложнения) протекает очень сложно. Разрыв пирофосфатных связей при обработке неочищенного продукта уксусным ангидридом в пиридине упрощает хроматографию смеси [44].

Значительно больший успех достигнут при использовании этого метода в ступенчатом синтезе низших олигодезоксинуклеотидов, для чего используются подходящим образом защищенные нуклеотидные и нуклеозидные производные [19]. Таким образом обработка смеси тимидин-5'-фосфата в присутствии избытка 5'-О-тримитилтимидина *n*-толуолсульфохлоридом с последующим кислотным гидролизом для удаления тримитильной группы приводит к образованию смеси тимидилил-5' : 3'-тимидина и других продуктов, возникающих в результате полимеризации незащищенных нуклеотидов.

Более контролируемый синтез этого динуклеозидфосфата был достигнут реакцией 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата с 5'-О-тримитилнуклеозидом в присутствии избытка дициклогексилкарбодимида [20]. При дезацетилировании и детримитилировании неочищенного продукта получается смесь, содержащая тимидилил-5' : 3'-тимидин, тимидин-5'-фосфат, тимидин и P¹,P²-дитимидин-5'-пирофосфат, из которой требуемое соединение отделяется хроматографией на бумаге. Аналогичным образом в результате обработки 5'-О-тримитилтимидина N⁶,3'-О-диацетилдезокситидин-5'-фосфатом (приготовленным ацетилированием свободного нуклеотида) и дициклогексилкарбодимидом образуется дезокситидилил-5' : 3'-тимидин. Аналогичный дезоксиаденилил-5' : 3'-тимидин получается из N⁶,3'-О-диацетилдезоксаденозин-5'-фосфата и 5'-О-ацетилтимидина, так как неустойчивость пурин-гликозидной связи препятствует использованию кислотного гидролиза для удаления тримитильной группы [20]. Другие дидезоксинуклеотидфосфаты получали несколько трудоемким методом с использованием полностью защищенных

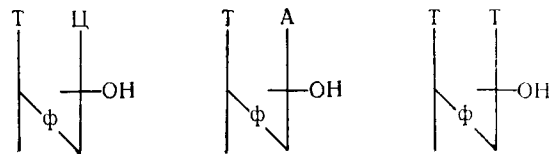
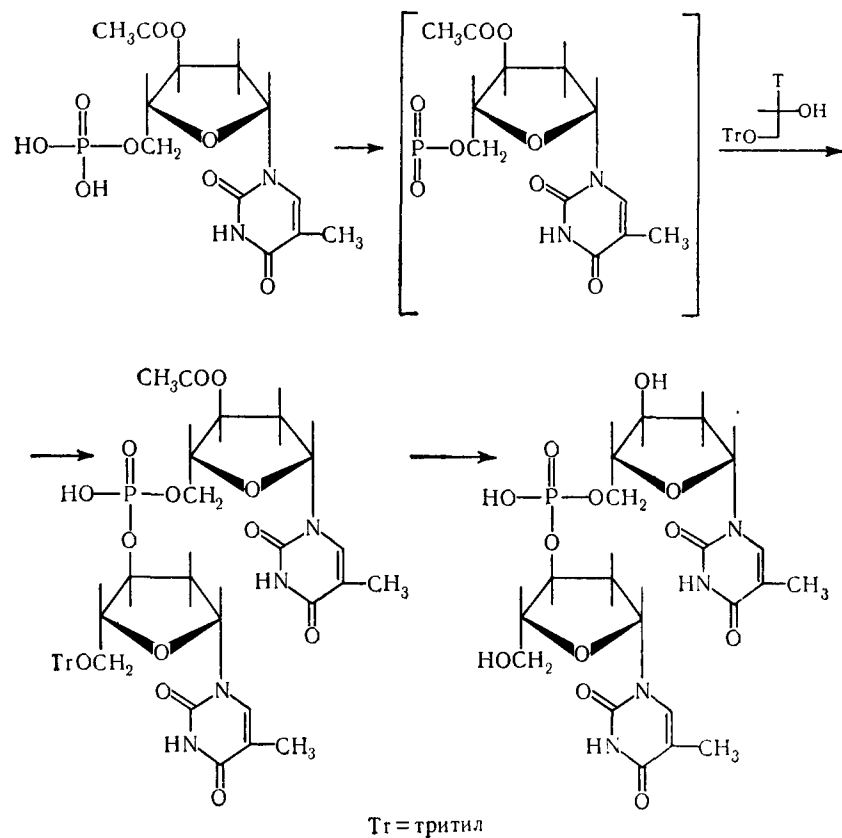
(включая гетероциклическое основание) дезоксинуклеозидных и дезоксинуклеотидных производных [21].

Синтез динуклеотида был осуществлен способом, подобным тому, который использовался в первоначальном синтезе тимидилил-5' : 3'-тимидин-5'-фосфата, а именно фосфорилированием тимидин-5'-дибензилфосфата 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфатом, после чего из полученного вещества удаляли защитные группы. При замещении ацетилированного тимидиннуклеотида N,3'-О-диацетилдезоксаденозин-5'-фосфатом был получен соответствующий динуклеотид, дезоксиаденилил-5' : 3'-тимидин-5'-фосфат.

Разработаны также и другие методы, в которых защищенный динуклеозидфосфат фосфорилируется по единственному свободному гидроксилу сахара. При кислотной обработке 3'-О-ацетилтимидилил-5' : 3'-(5'-О-тримитил)тимидина в мягких условиях удалялась тримитильная группа, а фосфорилированием получившегося 3'-О-ацетилтимидилил-5' : 3'-тимидина дибензилхлорфосфатом с последующим щелочным гидролизом и удалением бензильных групп с помощью гидрирования был получен тимидилил-5' : 3'-тимидин-5'-фосфат. Для синтеза изомерного динуклеотида, содержащего концевую 3'-моноэтерифицированную фосфатную группу, описанное промежуточное полностью защищенное соединение обрабатывали щелочью, в результате чего образуется тимидилил-5' : 3'-(5'-О-тримитил)тимидин. Фосфорилирование и удаление защитных групп приводит затем к тимидилил-3' : 5'-тимидин-3'-фосфату. Позже были разработаны более эффективные методы фосфорилирования динуклеозидфосфатов в присутствии дициклогексилкарбодимида и β-цианэтилфосфата [22]. Как и при полимеризации тимидин-5'-фосфата, здесь, вероятно, образуются промежуточные метафосфаты.

Хотя метод специфического синтеза 3'—5'-межнуклеотидной связи описан в качестве общего метода, применение его для ступенчатого синтеза олигодезоксинуклеотидов в действительности сильно ограничено [23] вследствие необходимости всесторонней защиты функциональных групп. Тем не менее метод успешно распространен на синтез двух тридезоксинуклеозиддифосфатов, которые, подобно димерам, выделены в относительно чистом состоянии с помощью хроматографии на бумаге. При взаимодействии 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата с тимидилил-5' : 3'-(5'-О-тримитил)тимидином в присутствии дициклогексилкарбодимида и последующем мягком щелочном, а затем кислотном гидролизе продукта образуется тимидилил-5' : 3'-тимидилил-5' : 3'-тимидин. Аналогично дезокситидилил-5' : 3'-деоксиаденилил-5' : 3'-тимидин был получен из N⁶,3'-О-диацетилдезокситидин-5'-фосфата и дезоксиаденилил-5' : 3'-(5'-О-тримитил)тимидина. В последнем случае в реакции, по-видимому, участвует адениновая аминогруппа, поэтому удале-

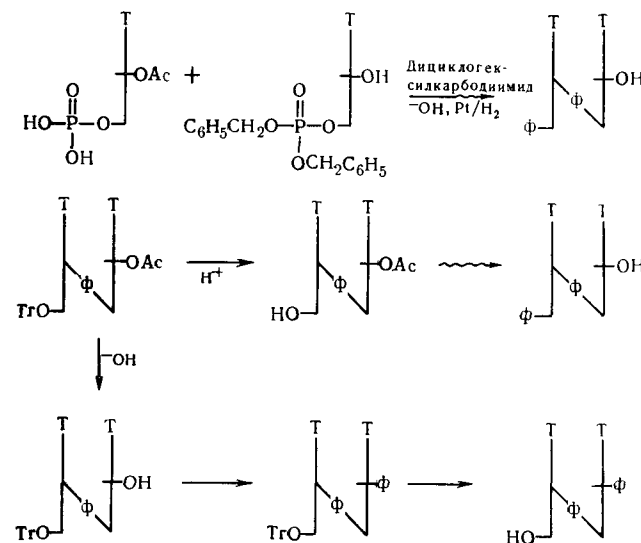
ние защитных групп связано с известными трудностями [23]. Аналогичными методами, использующими «фосфорилирование» ти-



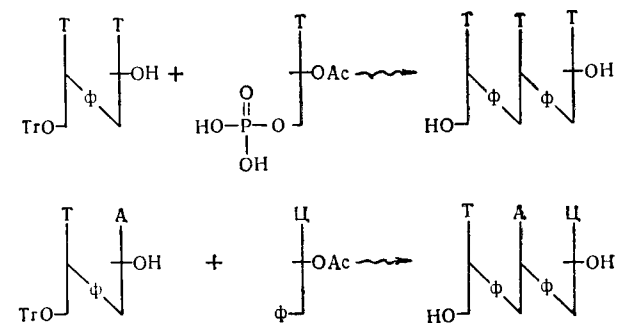
мидин-3'-цианэтилфосфата или защищенного с помощью β-цианэтилфосфата олигодезоксинуклеотида 5'-О-тритилтимидин-3'-фосфатом или 5'-О-тритилтимидил-3' : 5'-тимидин-3'-фосфатом в присутствии дициклогексилкарбодиимида, были синтезированы ди-

три- и тетратимидиловые кислоты, содержащие концевую 3'-фосфатную группу [46].

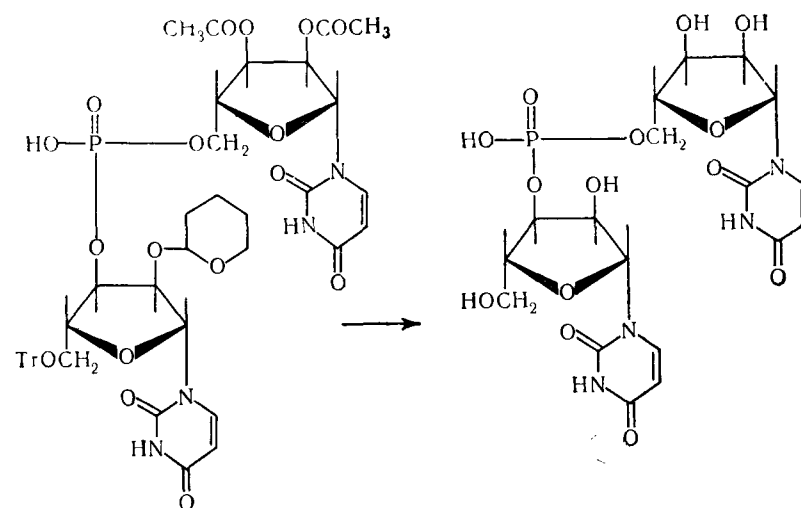
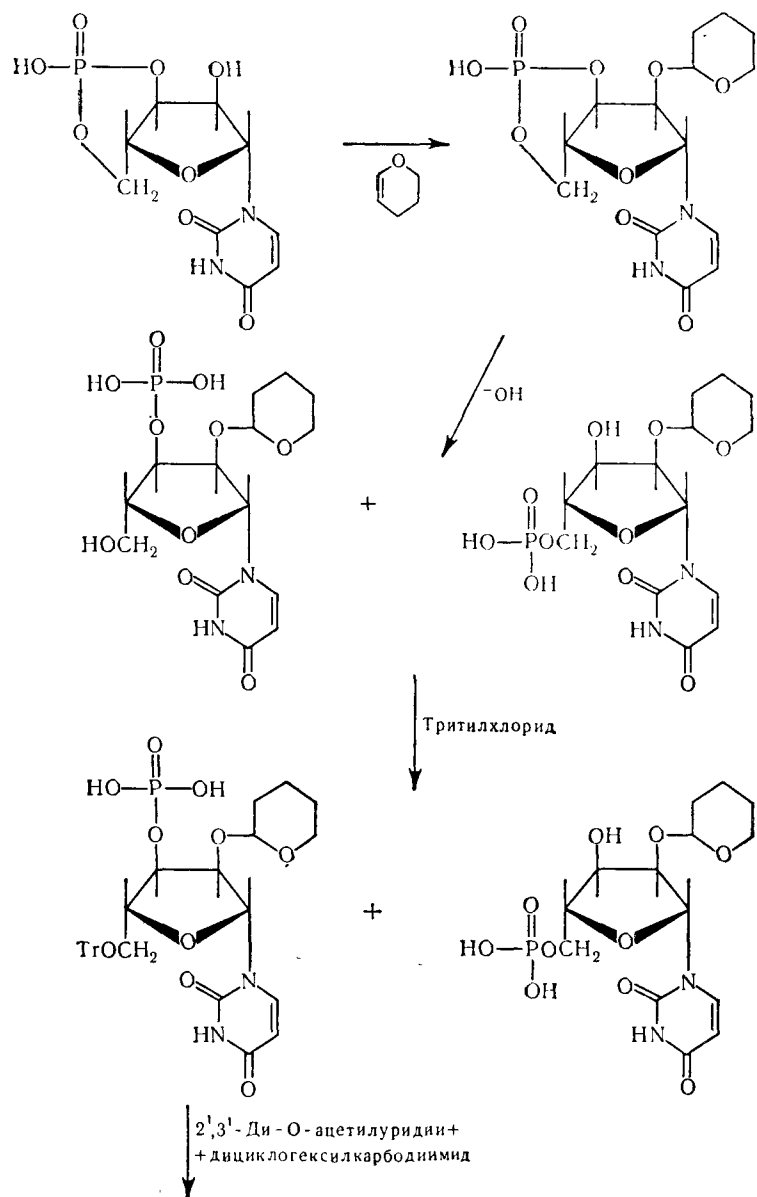
Аналогично с помощью дициклогексилкарбодиимида могут быть получены олигорибонуклеотиды. Применение соответствующим



образом защищенных производных уридина приводит к синтезу уридил-5':3'-уридина [24, 25]. 2'-О-Тетрагидропиранильное производное



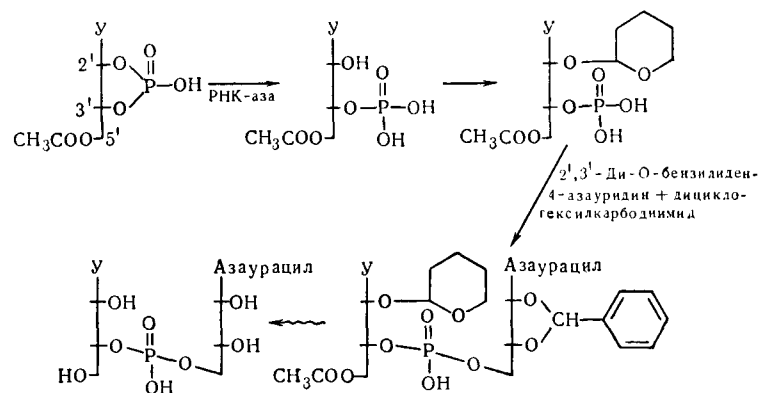
образуется при взаимодействии уридин-3',5'-циклофосфата с ди-гидропираном. Последующий щелочной гидролиз циклического фосфата дает смесь 2'-О-тетрагидропиранильных производных уридин-3'-фосфата и уридин-5'-фосфата. После тритилирования (не специфического для первичной гидроксильной группы) смеси обра-



зуется 2'-О-тетрагидропиранил-5'-О-тритуридин-3'-фосфат, который отделялся от непрореагировавшего 5'-фосфата и обрабатывался 2',3'-ди-О-ацетиуридином в присутствии дициклогексилкарбодиимида. Ацетильные группы удалялись щелочным гидролизом, а тритильная и тетрагидропиранильная — кислотным гидролизом в водном растворе уксусной кислоты, в результате чего с низким общим выходом получается уридилил-3' : 5'-уридин [24]. В улучшенном варианте применяли 5'-О-ди-*n*-метоксифенилфенилметильную защитную группу (образующую значительно менее устойчивый по отношению к кислоте эфир, чем соответствующий трифенилметильный эфир) [45]. Метод был распространен на синтез уридилил-3' : 5'-аденозина из N,N,2',3'-О-тетрабензоиладенозина (желательно защищать гетероциклическое основание) [45]. Защищенный мононуклеотид можно получить непосредственно из нуклеозид-3'-фосфата реакцией с дигидропираном, в результате которой образуется 2',5'-ди-О-тетрагидропиранилпроизводное [25]. Следует отметить, что присутствие 2'-О-тетрагидропиранильной группы делает промежуточный диэфир устойчивым к действию щелочи, вследствие чего применимы более жесткие условия для удаления бензоильных групп.

Для синтеза 4-азауридилил-5' : 3'-уридина пользовались более простым способом, который включал специфическое раскрытие 2',3'-циклического фосфата до 3'-фосфата [26. 47]. Гидролиз 5'-О-ацетиуридин-2',3'-циклофосфата под действием рибонуклеазы приводит к 3'-фосфату, который при взаимодействии с дигидропира-

ном дает 5'-О-ацетил-2'-О-тетрагидропиранилуридин-3'-фосфат.

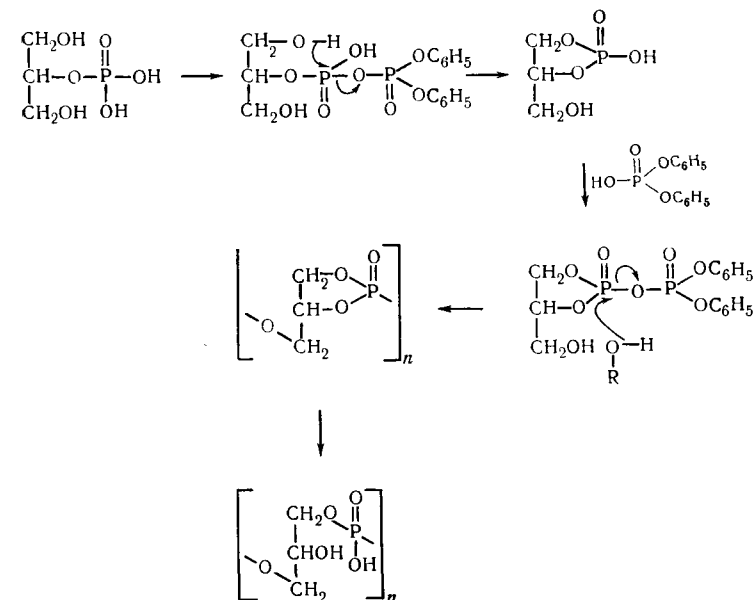


В результате реакции защищенного нуклеотида с 2',3'-О-бензилиден-4-азауридином и дициклогексилкарбодимидом образуется защищенный динуклеозидфосфат, из которого уридилил-3': 5'-азауридин был получен дезацетилированием и удалением тетрагидропиранильной и бензилиденовой групп посредством гидрогенолиза.

МЕТОД СМЕШАННЫХ АНГИДРИДОВ

Если нуклеотид содержит незащищенную *цис*-гидроксильную группу, примыкающую к фосфатному остатку, то нельзя применять дициклогексилкарбодимидный метод, так как в этом случае легко образуются циклические фосфаты, которые, будучи диэфирами фосфорной кислоты, уже не могут превращаться в метафосфаты. Однако рибонуклеотиды могут быть легко и количественно превращены в полимеры с помощью модифицированного метода смешанных ангидридов, используя полностью этерифицированный ангидрид [27]. Трудностей при использовании и удалении защитных групп в ряду рибонуклеотидов можно избежать, если превратить нуклеозид-2'(3')-фосфат в 2',3'-циклофосфат, в котором свободна лишь одна 5'-гидроксильная группа. Предварительные опыты с глицеро-2 (или 1)-фосфатом показали, что полиглицерофосфорная кислота легко получается из мономера при обработке дифенилхлорфосфатом или тетрафенилпирофосфатом [28]. Сначала в процессе полимеризации образуется P¹-глицеро-2(или 1)-P²-дифенилпирофосфат, который легко превращается в глицеро-1,2-циклический фосфат; внутримолекулярное фосфорилирование осуществляется более слабой кислотой, входящей в смешанный ангидрид,

что является обычным для пирофосфатных производных. Взаимодействие этого циклофосфата с избытком дифенилхлорфосфата приводит к образованию второго лабильного несимметричного ангидрида, P¹-глицеро-1,2-цикло-P²-дифенилпирофосфата, легко полимеризующегося в результате межмолекулярного фосфорилирования свободной гидроксильной группы с выделением дифенилфосфата.



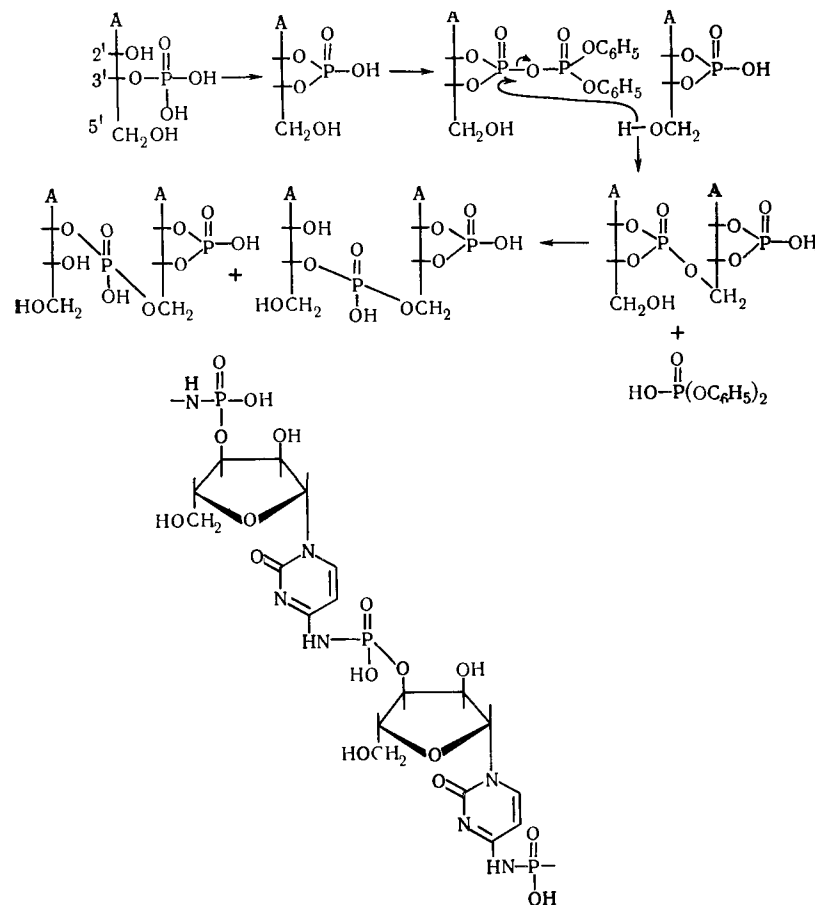
Заключительный разрыв связей в полимерном фосфатном триэфири, приводящий к диэфиру, происходит самопроизвольно в водном растворе и может идти в трех направлениях, приводящих к полимерам с 1 : 3-глицерофосфатными связями, или с 2 : 3-связями, или к разложению полимера. (При этом образуется продукт, содержащий главным образом 1 : 3-связи.) Легко протекающий при всех значениях pH гидролиз уридин-3'-диметилфосфата (вероятно, через метиловый эфир циклического фосфата) до моноэфиров уридин-2'- и уридин-3'-фосфатов со следами уридин-2',3'-циклофосфата [29] показывает, что и разложение полимера должно быть незначительным, что и наблюдается в действительности.

Аналогично нуклеозид-2',3'-циклофосфат был получен впервые из аденозин-2'(3')-фосфата и дифенилхлорфосфата [30]. При последующей полимеризации образуются полиадениловые кислоты с разной длиной цепи, начиная от динуклеотида до полинуклеотидов,

содержащих до 15 мономеров. Метод легко распространяется на синтез полимеров гуанозин-2'(3')-фосфата, уридин-2'(3')-фосфата [31] и псевдоуридин-2'(3') фосфата [32]. В дополнение к сказанному отметим, что был получен ряд полимеров из следующих аналогичных нуклеотидов: N¹-метил-, 5-хлор-, 5-бром- и 5-йодуридиловых кислот [33].

Из цитидин-2'(3')-фосфата также было получено соединение, представляющее собой полимер, однако ни химическими, ни ферментативными, ни спектроскопическими методами не удалось установить наличия межнуклеотидных связей, аналогичных связям в природных нуклеиновых кислотах (т. е. фосфодиэфирных групп, связывающих вторичный гидроксил сахара одного нуклеозида с первичной гидроксильной группой другого). Этот полимер вполне устойчив к действию щелочи и к ферментативному гидролизу обычными диэстеразами и, скорее всего, содержит фосфоамидные межнуклеотидные связи между 2'(или 3')-фосфатными группами и 6-аминогруппой соседнего цитозина. Избирательное ацетилирование аминогруппы в цитидин-2',3'-циклофосфате с последующей обработкой дифенилхлорфосфатом приводит к образованию полинуклеотидов (с обычным типом связи), из которых ацетильные группы удаляются щелочным гидролизом в мягких условиях, в результате чего были получены олигоцитидиловые кислоты с различной длиной цепи [32]. Следует отметить, что при ацетилировании сначала образуется промежуточный смешанный ангидрид уксусной кислоты и циклофосфата (в результате взаимодействия цитидин-2',3'-циклофосфата с уксусным ангидридом), который и является ацилирующим агентом. В отличие от этого ангидрида в дезоксицитидил-5'-ацетате происходит замещение более стабильного аниона (ацетата), т. е. в пиридине становится доступным для нуклеофильной атаки атом фосфора. По существу, различие между двумя типами соединений объясняется неравенством значений констант диссоциации (pK) гидроксильных групп фосфатного остатка (около 1 и 6,5 соответственно), принимающих участие в образовании ангидридной связи. Несмотря на это и вопреки вводящим в заблуждение данным [14], избирательное ацетилирование аминогруппы в дезоксицитидин-5'-фосфате все же может быть осуществлено при подходящих условиях (использование пространственно затрудненного третичного основания и диоксана вместо пиридина в качестве растворителя).

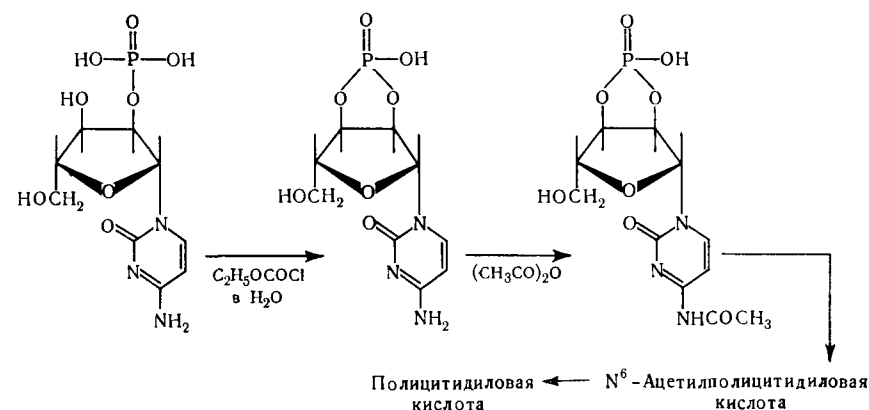
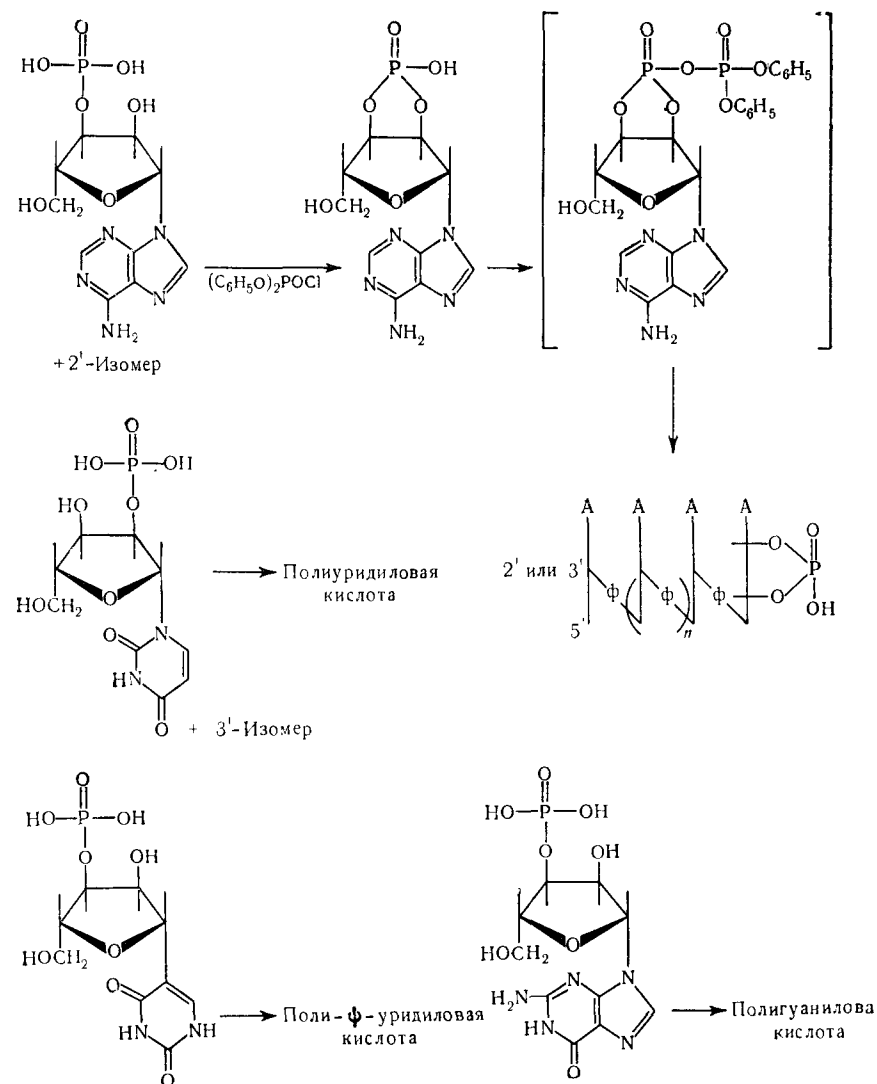
Рассмотрение стереохимических данных говорит о том, что образование циклодинуклеотидов через промежуточный триэтерифицированный 2',3'-циклический фосфат маловероятно, а вероятность образования циклических три- и тетра-нуклеотидов еще меньше. Кроме того, при полимеризации использовали очень концентрированные растворы, что еще больше уменьшало возможность образования циклических олигонуклеотидов. Такие соединения не были



обнаружены даже при полимеризации в разбавленных растворах: они образуются либо в очень незначительном количестве по сравнению с обычным продуктом, либо совсем не образуются.

Частичное разделение синтетических полимеров достигалось диализом против воды и растворов различных солей. После диализа в 2 M растворе хлористого натрия остаток состоял из вещества со средней длиной цепи 10—12 нуклеотидов, что определялось гидролизом диэстеразой яда до нуклеотидов и конечного нуклеозид-3',5'-дифосфата или дефосфорилированием (моноэстеразой предстательной железы) полимеров после обработки кислотой для раскрытия 2',3'-циклической фосфатной группы на конце цепи. Если использовать достаточно разбавленные растворы для реакции

полимеризации, то получаются соединения, содержащие относительно большие количества низших олигонуклеотидов. Эти низшие олигонуклеотиды (вплоть до пентануклеотида), как было показано, являющиеся членами гомологического ряда линейных полимеров, содержащих нуклеотиды, связанные 2'-5'- и 3'-5'-фосфодиэфирными связями и оканчивающиеся 2':3'-циклическим фосфатом.



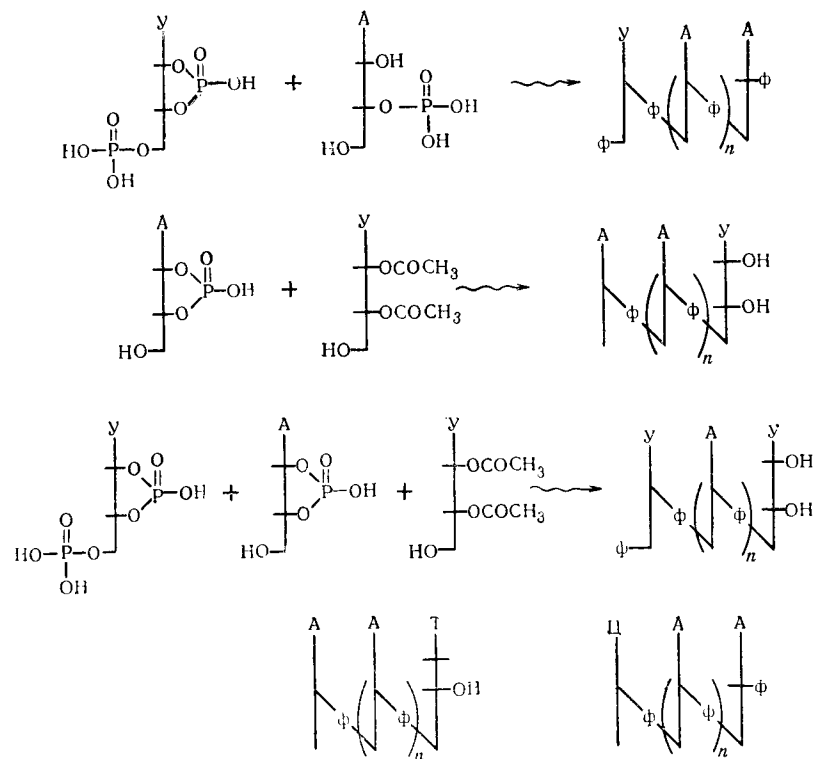
(Такие олигонуклеотиды гидролизуются рядом гремучей змеи намного легче, чем аналогичные соединения, содержащие концевой 2'- или 3'-моноэтерифицированный фосфат.) Удаление этого концевого фосфата приводит к ряду соединений, члены которого имеют формулу (нуклеозид)_n (фосфат)_{n-1} и при щелочном гидролизе которых получаются нуклеозид-2'(3')-фосфат и концевой нуклеозид. Свойства высокомолекулярных фракций свидетельствуют о том, что они состоят лишь из линейных полимеров с общей структурой, аналогичной структуре биосинтетических полинуклеотидов и нуклеиновых кислот, за исключением того, что примерно 50% межнуклеотидных связей являются 2'—5'-связями, а остальные — 3'—5'-связями [31]. Дальнейшее разделение высших гомологов может быть осуществлено с использованием целлюлозных анионообменных материалов, однако менее эффективно, чем разделение низших олигонуклеотидов [32].

Этот метод полимеризации применим и в случае синтеза полимеров с определенными концевыми нуклеотидными или нуклеозидными остатками. В результате обработки уридин-2' (или 3'), 5'-дифосфата тетрафенилпирофосфатом (или дифенилхлорфосфатом) образуется Р¹-уридин-(2',3'-циклофосфо)-5'-Р²-дифенилпирофосфат. Последний обычным образом вводился в сополимеризацию с адениловой кислотой, причем уридиновый нуклеотид служил агентом, прикрывающим цепь. После щелочной обработки этого полимера в мягких условиях, в результате чего расщепляется концевая триэтерифицированная пирофосфатная группа, получается полиадениловая кислота, содержащая уридин-5'-фосфат на одном конце и аденозин-2'(3)'-фосфат на другом. Аналогичным способом была получена полиадениловая кислота с концевым уридином при полимеризации адениловой кислоты в присутствии 2',3'-ди-О-ацетилуридина с последующим селективным щелочным гидролизом для

удаления ацетильных групп. Полимеризация же адениловой кислоты в присутствии обеих производных уридина дает продукт с концевыми уридином и уридин-5'-фосфатом, т. е. поли(нуклеозид-5'-фосфат) [31].

Синтезированы также и другие полимеры с определенными головными и концевыми нуклеозидами, включая полиадениловые кислоты с головным остатком цитидиловой кислоты (использовали N⁶,5'-О-диацетилцитидин-2',3'-циклофосфат) [34] и полиадениловые кислоты с концевым остатком тимидина (для ограничения цепи использовали 3'-О-ацетилтимидин) [31].

Кроме гомополимеров пяти основных рибонуклеотидов, получено и несколько сополимеров, включая сополимер всех пяти нуклеотидов. При полимеризации смеси адениловой и уридиловой

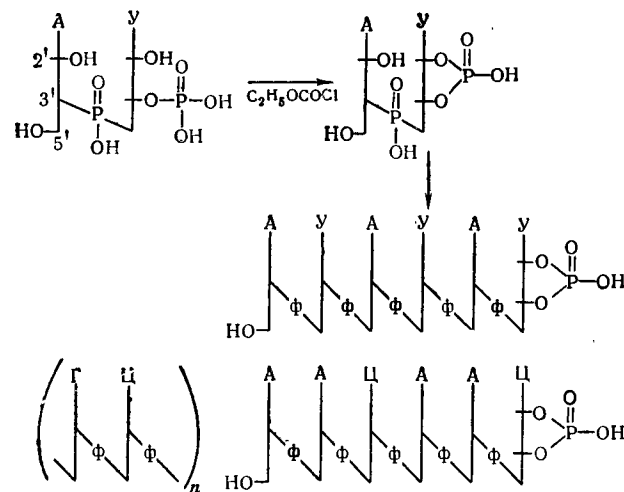


кислот в различных отношениях образуются соответствующие сополимеры с более или менее беспорядочным распределением аденина и урацила, тогда как частичная полимеризация отдельно адениловой и отдельно уридиловой кислот (до средней длины цепи

около трех моонуклеотидов) с последующей сополимеризацией смеси олигонуклеотидов приводит к образованию полинуклеотидов с пуриновыми и пиримидиновыми участками [31]. Кроме двух первых типов сополимеров, был получен и третий тип при полимеризации динуклеотида — аденилил-3': 5'-уридин-3'-фосфата (после циклизации концевого моноэтерифицированного фосфата в 2': 3'-циклический фосфат под действием хлоругольного эфира). Этот тип представлял собой олигонуклеотиды с определенным расположением чередующихся адениловой и уридиловой кислот [32].

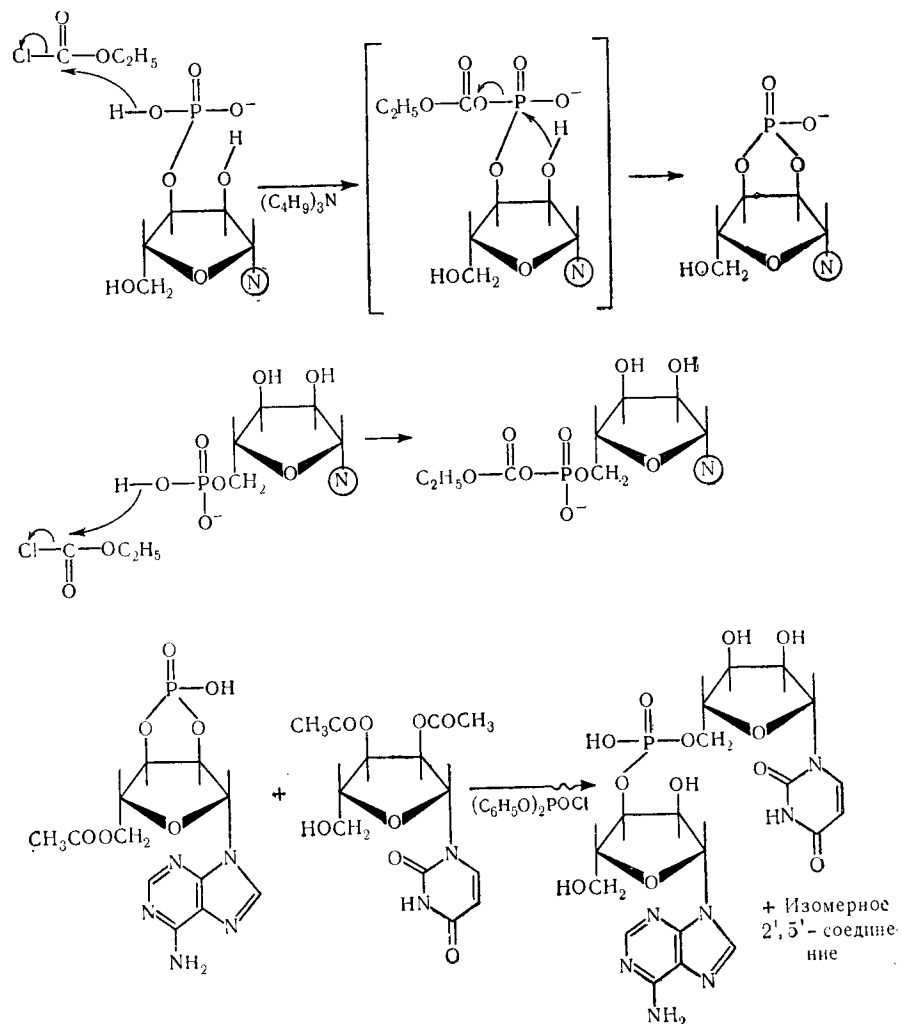
Аналогичная полимеризация гуанилил-3': 5'-цитидин-3'-фосфата (ГЗ'ф5'ЦЗ'ф) и аденилил-3': 5'-аденилил-3': 5'-цитидин-3'-фосфата (АЗ'ф5'АЗ'ф5'ЦЗ'ф) после предварительной защиты аминогруппы цитидина избирательным ацелированием приводит к образованию соответствующих полимеров с определенным повторяющимся порядком чередования оснований [32].

Этот метод может быть легко использован для ступенчатого синтеза олигонуклеотидов, содержащих различные основания в определенном порядке. Под действием хлоругольного эфира и основания в водном растворе уридин-2'(или 3')-фосфат превращается



в циклический фосфат (этот метод более удобен, чем обработка дифенилхлорфосфатом в безводных условиях, так как он не сопровождается последующей полимеризацией). Затем нуклеотид в безводной среде ацелируется и полученный 5'-О-ацетилирудин-2',3'-циклофосфат обрабатывается дифенилхлорфосфатом и основанием в присутствии 2',3'-ди-О-ацетиладенозина. При «фосфорилировании» свободной 5'-гидроксильной группы защищенного нуклеозида

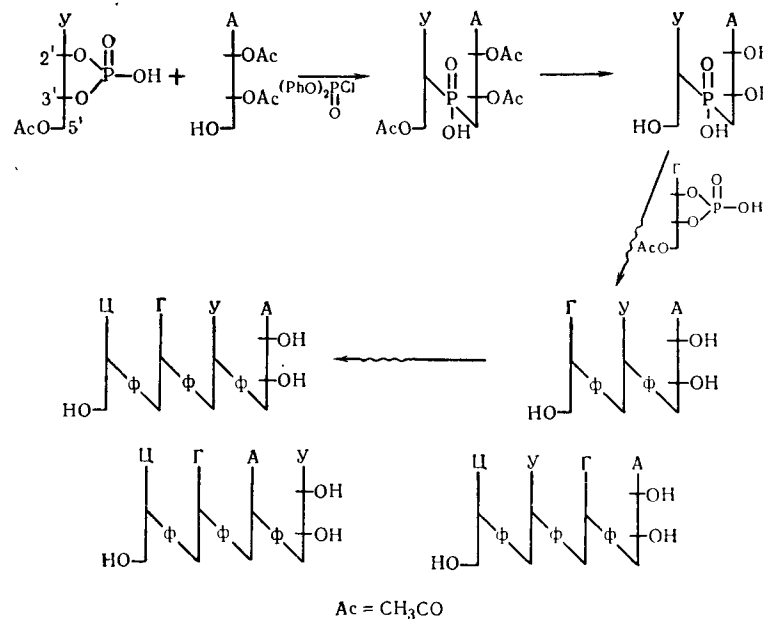
промежуточным P^1 -5'-О-ацетилирудин-2',3'-цикло- P^2 -дифенил-пирофосфатом получается с хорошим выходом защищенный динуклеозидфосфат, который после избирательного дезацетилирования (гидролиз щелочью в мягких условиях) превращается в смесь уридил-2' : 5'-аденозина и уридил-3' : 5'-аденозина. Аналогично из различных нуклеотидных и нуклеозидных производных был синтезирован ряд динуклеозидфосфатов, включая АфА, УфА, АфУ, УфУ, ЦфУ, ЦфА, ГфА и 5'-дезоксид-5'-бромуридил-2'(3') : 5'-



аденозин [32, 35], где ф обозначает фосфатную связь от 3'(или 2')-гидроксильной группы нуклеозида слева к 5'-гидроксильной группе нуклеозида справа, а А, Ц, Г и У — соответствующие нуклеозиды. Изомерные пары динуклеозидфосфатов (с 2'—5'-и 3'—5'-связями) разделяли методом анионообменной хроматографии. Приблизительно 50% вещества в каждом случае было с 3'—5'-связями, а остальное — с 2'—5'-связями [32]. Многие из этих динуклеозидфосфатов выделены в кристаллическом виде.

Синтез тринуклеозиддифосфатов был основан на сильном различии реакционной способности первичной и вторичной гидроксильных групп в рибонуклеозидах и их производных. Из аденил-3':5'-уридина и 5'-О-ацетилгуанозин-2',3'-циклофосфата под действием дифенилхлорфосфата с последующим удалением ацетильной группы образуется гуаниладенилилуридин (ГфАфУ). Подобным же образом были синтезированы ГфУфА, УфГфА, ЦфУфА и ЦфАфУ из соответствующих ацетилированных нуклеозид-2',3'-циклофосфата и нуклеозидфосфата.

Повторение этого процесса с ГфАфУ при действии избытка №, 5'-О-диацетилцитидин-2',3'-циклофосфата и последующее отщепление ацетильных групп приводит к образованию цитидилгуаниладенилилуридина (ЦфГфАфУ); таким же путем с хорошим выходом из соответствующих тринуклеозиддифосфатов и моно-

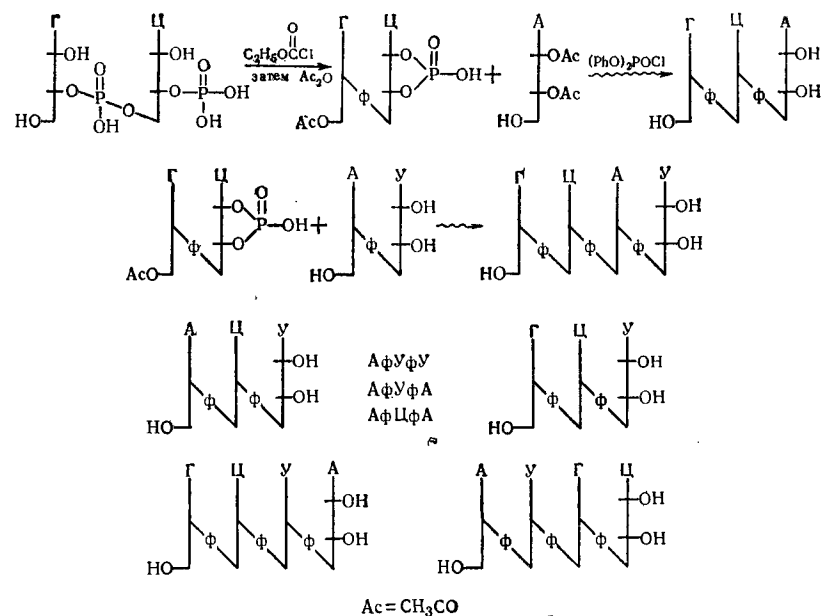


нуклеотидов [32] были получены ЦфГфУфА и ЦфУфГфА. Все эти соединения очищали с помощью анионообменной хроматографии и выделяли в твердом состоянии в виде свободных кислот.

Другой путь ступенчатого синтеза олигонуклеотидов, содержащих основания в определенной последовательности, включает «фосфорилирование» динуклеотидами производных нуклеозидов и нуклеотидов. В результате взаимодействия аденилил-3':5'-цитидин-3'-фосфата с хлоругольным эфиром образуется динуклеотид с концевой 2',3'-циклической фосфатной группой. Это соединение полностью ацетилировали, и после обработки продукта дифенилхлорфосфатом и 2',3'-ди-О-ацетиладенином был получен защищенный тринуклеозиддифосфат. После удаления ацетильных групп получают аденилилцитидилилуридин (АфЦфУ). Таким же путем ГфЦфУ и АфУфУ образуются из 2',3'-ди-О-ацетиладенина и гуанилил-3':5'-цитидин-3'-фосфата (ГЗ'ф5'ЦЗ'ф) или аденилил-3':5'-уридин-3'-фосфата (АЗ'ф5'УЗ'ф) соответственно, а аналогичная обработка 2',3'-ди-О-ацетиладенозина приводит к АфЦфА, ГфЦфА и АфУфА.

Успешным оказалось распространение этого метода на синтез тетрамеров, причем и в этом случае происходило избирательное фосфорилирование первичного гидроксильного остатка в незащищенном динуклеозидфосфате. Так, например, при взаимодействии уридил-2'(3'):5'-аденозина со смешанным ангидридом, полученным из ацетиладенина и дифенилхлорфосфата, образуется соединение, которое после отщепления ацетильных групп превращалось в гуанилилцитидилилуридилладенозин (ГфЦфУфА) (выделялся в виде свободной кислоты). Подобные реакции между ГфЦф и АфУ или АфУф и ГфЦ привели к ГфЦфАфУ и АфУфГфЦ соответственно [32].

Следует отметить, что ацетилирование динуклеотидов не сопровождается значительным разрывом межнауклеотидных связей. Это легко объяснить, исходя из свойств ангидридов уксусной кислоты и диалкил(или диарил)фосфатов. Такие соединения ведут себя исключительно как ацилирующие, но не фосфорилирующие агенты, особенно при применяемых условиях (при наличии пространственно затрудненного третичного амина и в отсутствие катализа пиридином). Такая направленность реакции объясняется тенденцией к замещению более устойчивого фосфатного аниона ($pK \sim 1$ по сравнению с $pK \sim 4,5$ для карбоксильной группы). Ацетилирующее действие подчеркивается способностью карбонильной группы к реакциям присоединения. Аналогично специфическое действие хлоругольного эфира на динуклеотиды приводит к сохранению исходного динуклеотида, содержащего, однако, концевую 2',3'-циклическую фосфатную группу. Такое течение реакции является результатом избирательности нуклеофильной атаки хлор-

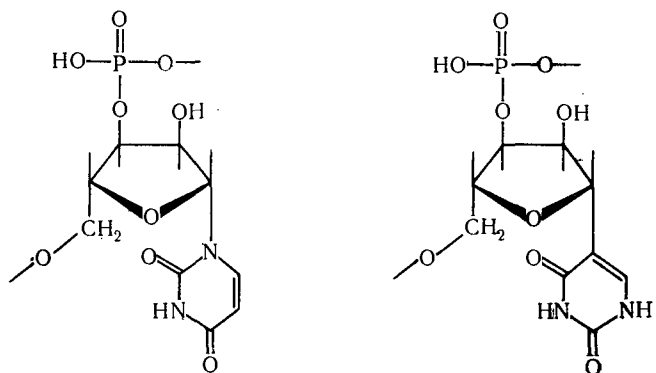


угольного эфира вторичной гидроксильной группой ($pK \sim 6$) фосфатного остатка, а не первичным ($pK \sim 1$) гидроксильным межнауклеотидной фосфатной группы. С другой стороны, это можно объяснить, учитывая стабильность рассмотренных анионов, которая в этом случае отражает их нуклеофильный характер. Так, ангидриды нуклеозид-5'-фосфатов и этилового эфира угольной кислоты легко и количественно получают в мягких условиях, но до сих пор не описаны ангидриды динуклеотидов и этилового эфира угольной кислоты.

Природа продуктов расщепления, образующихся при гидролизе синтетических олигомеров щелочью, диэстеразой яда и панкреатической рибонуклеазой полностью соответствует приписанной олигомерам структуре и последовательности оснований.

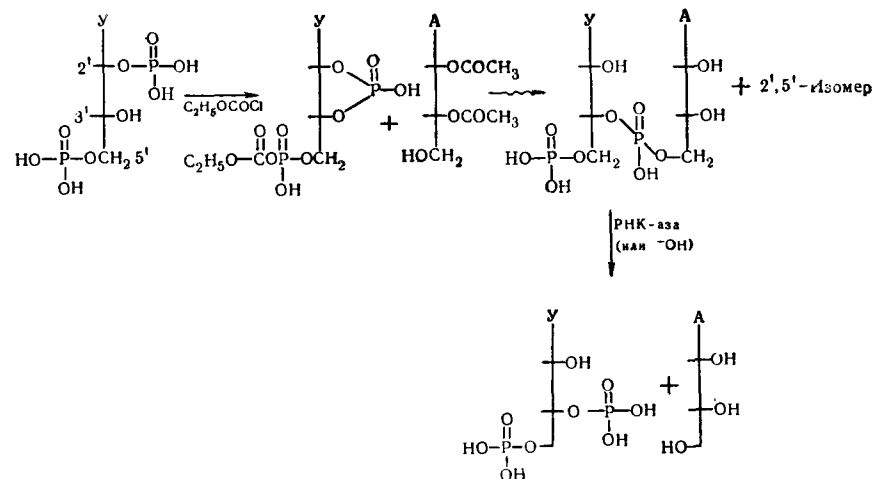
Химические и биохимические свойства синтетических гомополимеров (и сополимеров) также находятся в полном соответствии с приписанной им структурой. В результате раскрытия концевой циклической фосфаты при кислотном гидролизе в мягких условиях образуются олиго- и полинуклеотиды, содержащие концевой остаток фосфорной кислоты в положении 2'(или 3'). При гидролизе кислотами в более жестких условиях получают либо пурины, или пиримидиннуклеозид-2'- и пиримидиннуклеозид-3'-фосфаты,

либо те и другие, что определяется структурой полимера. Обработка щелочами приводит к полному расщеплению до мононуклеотидов и концевых нуклеозид-2' (или 3'), 5'-дифосфата или нуклеозида. Полигуаниловая кислота обладает заметно большей устойчивостью к щелочному гидролизу по сравнению с полиуридиловой кислотой. Все полинуклеотиды и высшие олигонуклеотиды осаждаются протаминсульфатом в водном растворе. Под действием моноэстеразы предстательной железы удаляется концевая фосфатная группа



из обработанных кислотой гомополимеров, в результате чего образуется гомологический ряд олигонуклеотидов. Динуклеотиды с концевой 2' (или 3')-фосфатной группой вполне устойчивы к смеси моноэстеразы и диэстеразы, имеющейся в яде гремучей змеи (*Crotalus atrox*). Однако уже тринуклеотиды медленно реагируют с ферментом, а высшие олигонуклеотиды с концевой 2',3'-циклической фосфатной группой расщепляются более легко до нуклеозида и концевого нуклеозиддифосфата. Наблюдался [36] также гидролиз диэстеразой змеиного яда олигорибонуклеотидов (полученных в результате деградации РНК), содержащих концевую 2',3'-циклофосфатную группу (но не концевую 3'-фосфомоноэфирную группу). Если в полимере отсутствует концевая 2'- или 3'-фосфат (например, УфУфУ и ЦфУфА), то разложение до нуклеозидов протекает значительно быстрее. Тогда как полиадениловая и полигуаниловая кислоты не изменяются под действием панкреатической рибонуклеазы, пиримидиновые производные (полицитидиловая, полиуридиловая и полипсевдоуридиловая кислоты) расщепляются ею до смеси нуклеозид-3'-фосфата и ди-, три- и тетрануклеотидов, содержащих исключительно 2'—5'-связи. Следует отметить, что характер и относительное расположение функциональных групп, свойственное уридиловой кислоте (что, вероятно, важно для образования водородных связей с ферментом), сохраняются в полипсевдоуридиловой кислоте.

Аналогично полиадениловая кислота расщепляется диэстеразой селезенки (или рибонуклеазой Т2) до смеси аденозин-3'-фосфата и устойчивых к ферменту олигонуклеотидов, содержащих исключительно 2'—5'-межнуклеотидные связи. Синтетические гомополимеры иницируют ферментативную полимеризацию нуклеозид-5'-пирофосфатов под действием полинуклеотидфосфорилазы. Не



имея свободного для этерификации 3'-гидроксила, они не внедряются в биосинтетические полимеры подобно обычным олиго (нуклеозид-5'-фосфатам) и олигонуклеотидам, лишенным концевого моноэтерифицированного фосфата. Биологические свойства включают торможение рядом синтетических полимеров развития тканевых культур (костный мозг, эмбриональная кожа и саркома 76 и 180 мышей), высокую активность олигогуаниловых кислот (особенно тех, которые имеют в цепи шесть нуклеотидов), в том числе образование стрептолизина S в *Streptococci*, и промотирование дипептидного синтеза полимерами с большей длиной цепи в ферментативных системах с использованием нуклеозид-5'-трифосфатов и аминокислот.

Синтез олигорибонуклеотидов, имеющих концевую 5'-фосфатную группу, легко осуществляется при использовании нуклеозид-2' (3'), 5'-дифосфатов. В результате взаимодействия цитидин-2' (3'), 5'-дифосфата с хлоругольным эфиром образуется смешанный ангидрид нуклеозид-2',3'-циклофосфо-5'-фосфата и этилугольной кислоты, который после ацетилирования 6-аминогруппы (для предотвращения образования фосфоамидных связей в полимере) обрабатывается дифенилхлорфосфатом и 2',3'-ди-О-ацетиладенозином. После удаления защитных групп в мягких условиях получают смесь изомерных динуклеотидов аденилил-5' : 2'-цитидин-5'-фосфата

(ф5'Ц2'ф5'А) и аденилил-5' : 3'-цитидин-5'-фосфата (ф5'Ц3'ф5'А). Аналогичным образом из соответствующих нуклеотидов были получены [37] аденилиладенозин-5'-фосфат [ф5'А2'(3')ф5'А] и аденилилуридин-5'-фосфат [ф5'У2'(3')ф5'А].

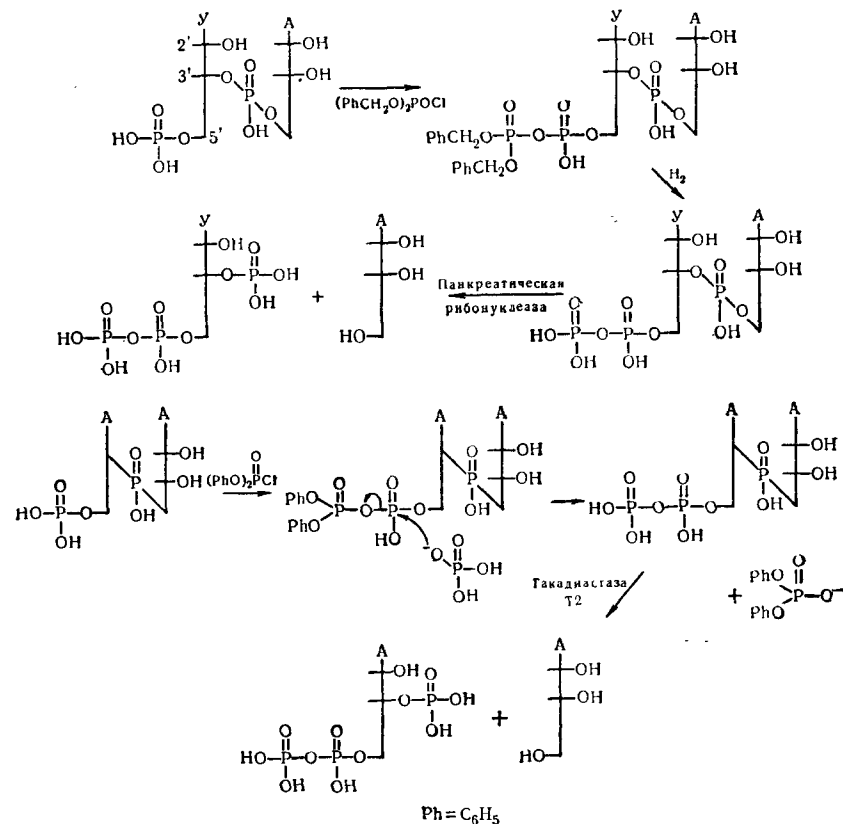
Дальнейшая обработка этих динуклеотидов (выделенных в твердом состоянии в виде свободных кислот) дибензилхлорфосфатом приводит к образованию промежуточных Р¹-дибензил-Р²-динуклеотид-5'-пирофосфатов, гидрогенолизом которых получают динуклеотидные производные с концевой 5'-пирофосфатной группой. Эти соединения, вероятно, интересны с точки зрения действия на них полинуклеотидфосфорилазы. Другой метод синтеза аналогичных соединений состоит в обработке дибензилпроизводного (или Р¹-дифенил Р²-динуклеотид-5'-пирофосфата, получающегося при действии дифенилхлорфосфата) фосфорной кислотой, замещающей в результате нуклеофильной атаки дибензил(или дифенил)фосфорную группу. Следует отметить, что при данных условиях хлорфосфаты реагируют только со вторичной гидроксильной группой фосфатного остатка (иначе наблюдался бы разрыв межнауклеотидной связи *) и что при анионном обмене снова более устойчивый анион вытесняется менее устойчивым. Превращение динуклеотида в незащищенный пирофосфат включает таким образом два нуклеофильных замещения с освобождением в каждом случае более устойчивого аниона (сначала Cl⁻, а затем дифенилфосфат-иона [37]). Факт, что предпочтительной реакцией является взаимодействие вторичной гидроксильной группы **, уже обсуждался при описании действия на аналогичные соединения этилового эфира хлоругольной кислоты; эта специфичность обуславливается значительным различием в стабильности первичных и вторичных фосфорильных анионов.

Структура динуклеотидов с концевой 5'-пирофосфатной группой полностью подтверждена щелочным гидролизом или ферментативным гидролизом диэстеразой неочищенного змеиного яда, которые привели к ожидаемым продуктам. При обработке рибонуклеа-

* Неясно, почему автор говорит о возможности разрыва межнауклеотидной связи в случае, если образуется смешанный ангидрид с участием межнауклеотидного фосфатного остатка. Такой смешанный ангидрид при участии *цис*-гидроксильной группы должен превращаться или в соединение, содержащее триэтерифицированную межнауклеотидную фосфатную группу (которое, как это было показано выше, при гидролизе дает смесь изомеров с 2'—5'- и 3'—5'-межнауклеотидными связями) или в 2'-О-фосфорилированное (ненуклеотидной частью ангидрида) производное. Ни в том, ни в другом случае разрыва межнауклеотидной связи произойти не может. — Прим. ред.

** Нельзя согласиться с автором, что межнауклеотидная фосфатная группа не реагирует с дифенилхлорфосфатом (или аналогичными соединениями). Образование несимметричного динуклеозиддифенилпирофосфата именно в такой реакции, позволило осуществить синтез Р-аминокислотного производного динуклеозидфосфата, т. е. производного по межнауклеотидному фосфору; см. ДАН СССР, 166, 101 (1966). — Прим. ред.

зой (панкреатической или из такадиастазы в соответствующих случаях) образуются нуклеозид и нуклеозид-(3'-фосфо)-5'-пирофосфат. Структура последних подтверждена сравнением с соответствующими синтетическими образцами.



АНАЛОГИ

Кроме полимеров природных нуклеотидов, методом смешанных ангидридов был получен ряд полимеров, аналогов рибонуклеотидов, включая поли-4-азауридиловую кислоту [38]. Галогенирование уридин-2'(3')-фосфата дает соответствующие 5-хлор-, 5-бром- и 5-иодпроизводные. В результате превращения в циклический фосфат при действии хлоругольного эфира с последующей полимеризацией были получены соответствующие полинуклеотиды [33]. Поли-N¹-метилуридиловая кислота также легко образуется из

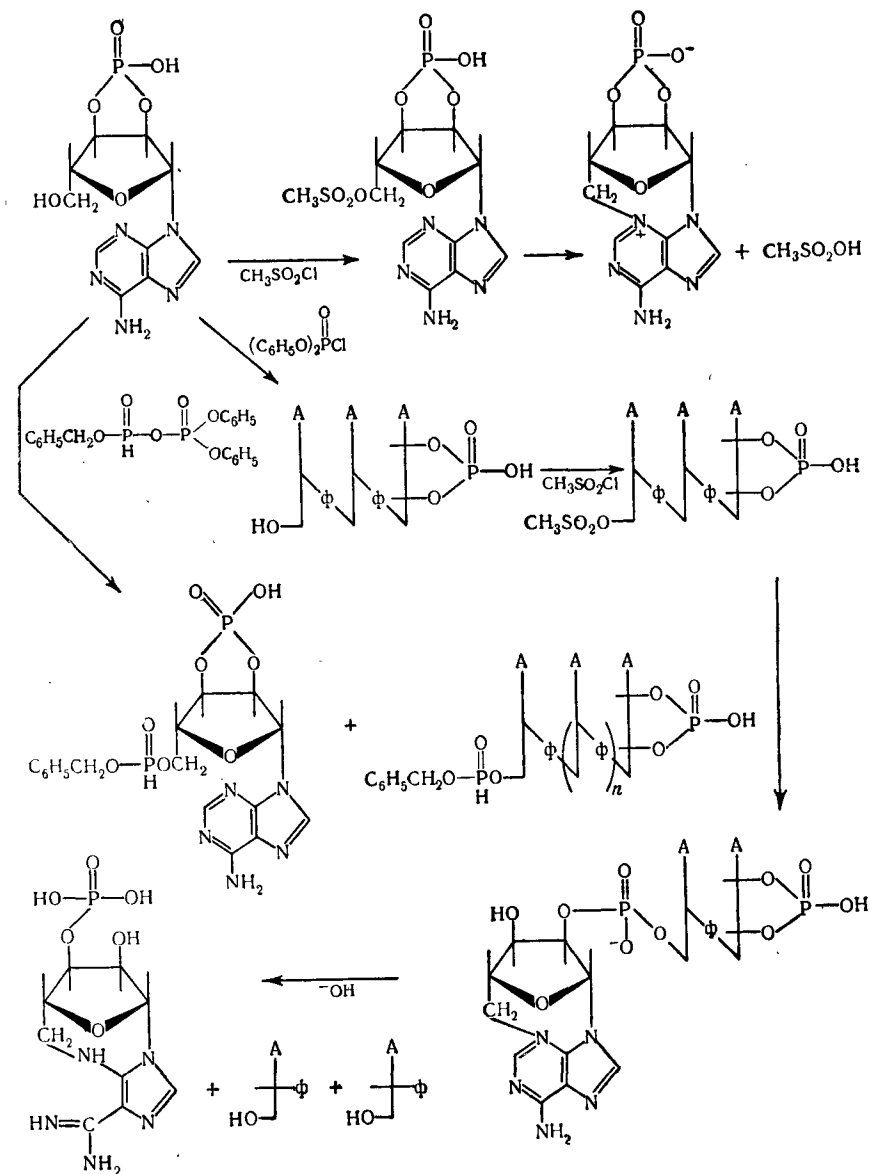
в отличие от поли- N^1 -метилюридиловой кислоты расщепляется рибонуклеазой [35]. При ферментативном гидролизе ядом гремучей змеи образуется 5'-тиоурин и уридин-2'(3')-фосфат-5'-тиофосфат, причем и 5'-моноэстераза и диэстераза, имеющиеся в неочищенном яде, активно действуют на 5'-тиопроизводные. Под действием бромистого лития 5'-О-метансульфонуридин-2',3'-циклофосфат превращается в 5'-бром-5'-дезоксиуридин-2',3'-циклофосфат. При взаимодействии последнего с 2',3'-ди-О-ацетиладенозином в присутствии дифенилхлорфосфата с последующим удалением защитных групп был получен 5'-бром-5'-дезоксиуридил-3':5'-аденозин, а также его 2':5'-изомер, причем первый расщеплялся рибонуклеазой [35].

При взаимодействии аденозин-2',3'-циклофосфата с метансульфонилхлоридом образуется неустойчивое ковалентное 5'-О-метансульфонильное производное, которое при нагревании превращается в $N^3,5'$ -циклоаденозин-2',3'-циклофосфат. Таким же путем из соответствующих олигонуклеотидов можно получить олигоадениловые кислоты с концевым циклоаденозиновым остатком. При щелочном гидролизе эти кислоты расщепляются до аденозин-2'(3')-фосфата и производного имидазола, образующегося из концевого циклонуклеозида [31, 34].

Полимеры адениловой кислоты с модифицированными концевыми остатками образуются также при обработке аденозин-2',3'-циклофосфата смешанным ангидридом бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот. При этом примерно 50% циклофосфата превращается в аденозин-(2',3'-циклофосфо)-5'-бензилфосфит [40] и олигоадениловые кислоты, содержащие концевую 5'-бензилфосфитную группу [31].

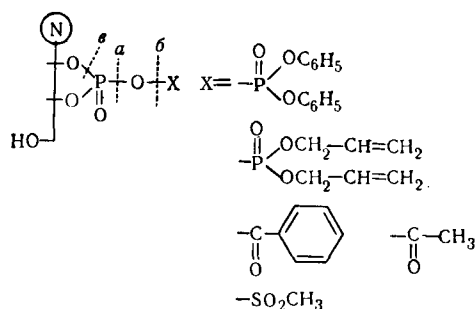
МЕХАНИЗМ

Хотя полимеризация нуклеозид-2',3'-циклофосфатов под действием дифенилхлорфосфата представляет собой удобный, быстрый и широко применяемый метод синтеза олиго- и низших полирибонуклеотидов, остаются еще в силе известные ограничения метода. Так, образующийся полимер содержит приблизительно равные количества 2'—5'- и 3'—5'-межнуклеотидных связей. Условия гидролиза промежуточных полимерных соединений, содержащих триэтерифицированную межнуклеотидную фосфатную группу до полимеров с дизфирной связью, оказывают незначительное влияние на это соотношение, несмотря на разнообразие использованных растворителей и широкий интервал рН среды, хотя при получении аналогичных бензиловых эфиров уридиловой кислоты (из уридин-2',3'-циклофосфата и дифенилхлорфосфата в присутствии избытка бензинового спирта) образуется примерно 75% уридин-3'-бензилфосфата и 25% его 2'-изомера [31]. Прямой специфический синтез

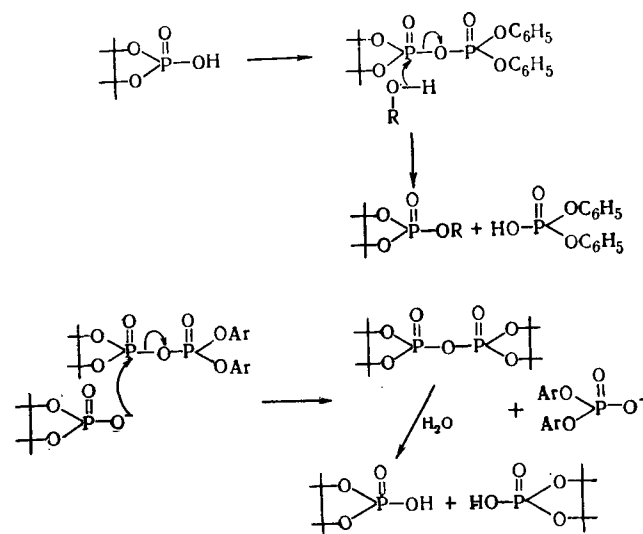


3'—5'-межрибонуклеотидной связи без соответствующей защиты 2'-гидроксильной группы пока не осуществлен, а использование защитных групп накладывает значительные ограничения. Для синтеза полинуклеотидов с большим молекулярным весом оба метода, а именно метод полностью этерифицированных смешанных ангидридов, а также менее эффективный карбодимидный метод кажутся малообнадеживающими. Химический синтез полинуклеотидов, сравнимых по длине цепи с полинуклеотидами, полученными ферментативным путем, потребует, вероятно, совершенно новых синтетических подходов, ничего общего не имеющих с ортодоксальными подходами органической химии (см. также стр. 515).

Изучались также механизмы превращений нуклеозид-2',3'-циклофосфатов под действием различных ангидридов кислот в растворе диоксана в присутствии три-*n*-бутиламина (т. е. пространственно затрудненного третичного основания) и в растворе пиридина [33]. В зависимости от природы ангидрида и условий реакции могут протекать все три возможные реакции [41], включающие расщепление промежуточного ангидрида по связям, обозначенным *α*, *β* и *γ*. При нуклеофильной атаке 5'-гидроксильной группой, приводящей к разрыву связей «*α*» или «*γ*», образуются соединения полинуклеотидной природы; расщепление связи «*β*» приводит к этерификации 5'-гидроксильной группы, т. е. полимеризации не происходит.



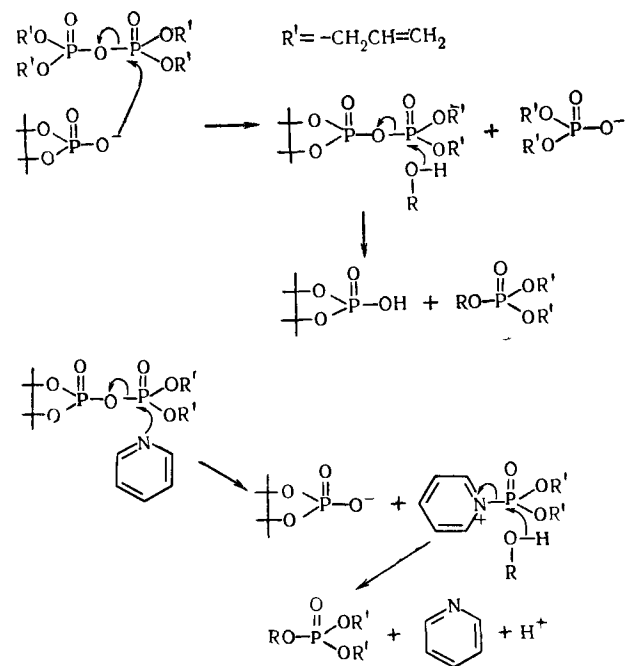
Количественная полимеризация уридин-2',3'-циклофосфата наблюдается при действии на него ангидридов кислот, включая дифенилхлорфосфат, тетрафенилпирофосфат, тетра-*n*-бромфенилпирофосфат, фенилдихлорфосфат и *n*-толуолсульфохлорид, независимо от того, проводится реакция в пиридине или диоксане. Естественно предположить, что все эти реагенты действуют по механизму «*α*», т. е. имеет место межмолекулярная нуклеофильная атака 5'-гидроксильной группой атома фосфора нуклеотида, причем нуклеофильный реагент подходит с тыльной стороны по отношению



к уходящему более стабильному аниону (более сильной кислоты) промежуточного нуклеотидангидрида.

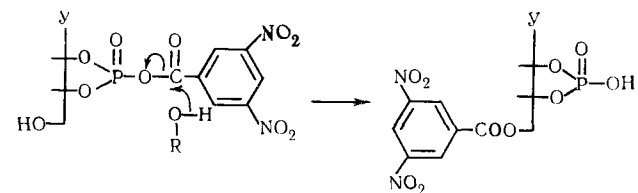
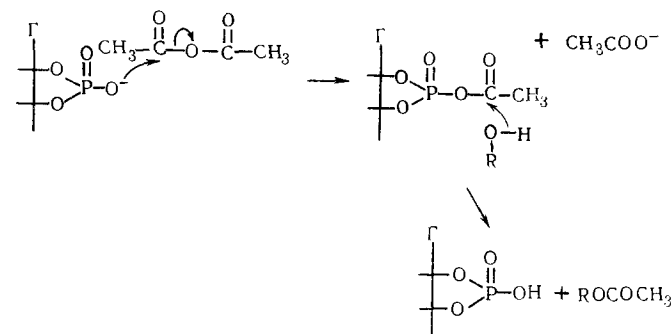
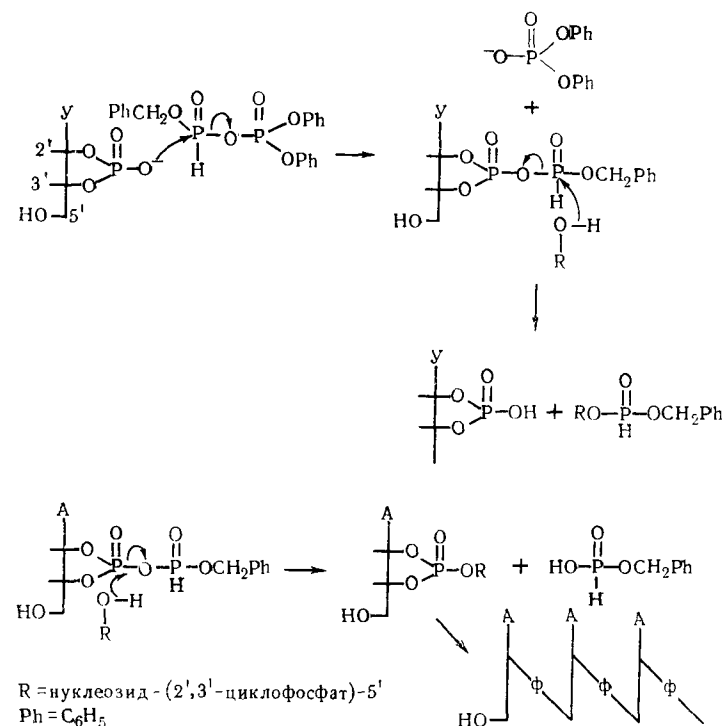
Ангидрид, однако, не должен быть слишком активным, так как при обработке циклофосфата, например, тетра-*n*-нитрофенилпирофосфатом полимеризации не происходит, что, возможно, объясняется быстрой атакой нуклеозидциклофосфатом промежуточного P^1 -нуклеозид-2',3'-цикло- P^2 -ди-*n*-нитрофенилпирофосфата, в результате которой образуется P^1 , P^2 -ди (нуклеозид-2',3'-цикло)пирофосфат. Такие соединения обычно очень трудно полимеризуются, но легко гидролизуются до нуклеозид-2', 3'-циклофосфата. (Вероятно, в этом и заключается механизм обрыва цепи в обычных реакциях полимеризации с использованием дифенилхлорфосфата). Аналогично реакциям анионного обмена, описанным выше (стр. 265), по-видимому, для успешного применения промежуточных ангидридов их реакционная способность должна быть не просто небольшой или значительной, а должна лежать в известных, вполне ограниченных пределах, определяемых относительной устойчивостью анионов, входящих в состав ангидрида.

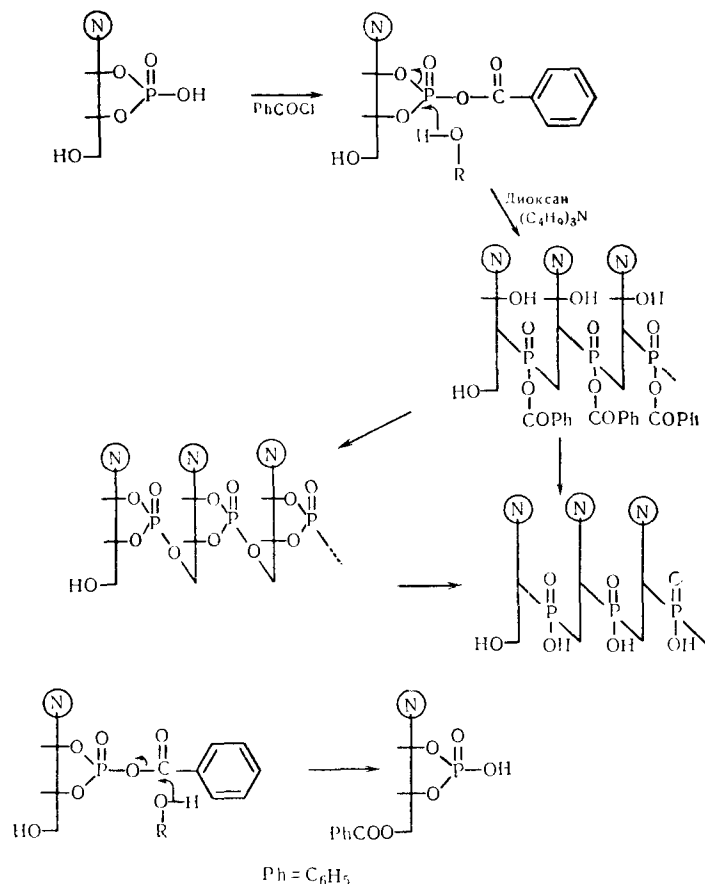
Когда промежуточный ангидрид содержит кислоту, незначительно более сильную, чем циклический фосфат, как это имеет место при использовании тетрабензилпирофосфата, тетрааллилпирофосфата или P^1, P^2 -добензил- P^1, P^2 -дифенилпирофосфата, то фосфорилирование 5'-гидроксильной группы протекает по механизму «*β*»,



т. е. имеет место нуклеофильная атака ненуклеотидного атома фосфора промежуточного ангидрида. Как и следовало ожидать, реакция протекает значительно медленнее, чем в случае более активных ангидридов, а значительная степень превращения наблюдается лишь в пиридине. Так как в диоксане (в присутствии три-*n*-бутиламина) реакция протекает в небольшой степени, если вообще идет, то реакция, катализируемая пиридином, вероятно, связана с образованием пиридинового комплекса.

При использовании смешанного ангидрида бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот через промежуточный ангидрид нуклеозид-2',3'-циклофосфата и бензилфосфористой кислоты легко образуется нуклеозид-(2',3'-циклофосфат)-5'-бензилфосфит в растворе как пиридина, так и диоксана. В этом случае (а, вероятно, и во всех других) очень важное значение имеет природа нуклеотида, так как при введении в реакцию уридин-2',3'-циклофосфата образуются лишь следы динуклеотида, тогда как с адениновым производным наряду с введением фосфитной группы происходит значительная полимеризация (по механизму «а»). Это может быть отнесено за счет некоторого различия в силе двух кислот (нуклеозид-2',3'-



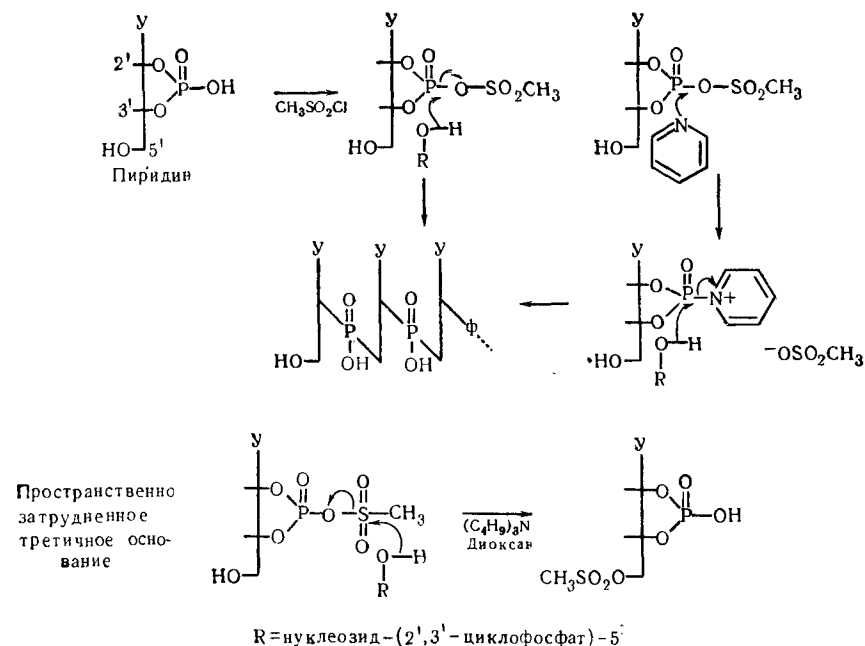


циклофосфатов), а также разницы в устойчивости их анионов по сравнению с устойчивостью бензилфосфористой кислоты.

Ангидриды нуклеозид-2',3'-циклофосфатов с карбоновыми кислотами представляют собой ацилирующие агенты, т. е. нуклеофильная атака направлена на карбонильную группу с замещением более устойчивого аниона циклического фосфата (более сильная кислота). Так, 5'-О-(3,5-динитробензоил)уридин-2',3'-циклофосфат был получен при действии 3,5-динитробензоилхлорида на уридин-2',3'-циклофосфат как в диоксане, так и в пиридине, причем ацилирование облегчается способностью карбонильной группы к реакциям присоединения. Таким же путем при обработке циклофосфата уксусным ангидридом получается 5'-О-ацетильное производное.

Однако при использовании бензоилхлорида реакция протекает по третьему механизму с разрывом связи «в», так как несмотря на способность карбонильной группы к реакциям присоединения в диоксановом растворе происходит значительная полимеризация. Эта реакция включает, вероятно, прямую межмолекулярную нуклеофильную атаку 5'-гидроксильной группы атома фосфора, в результате которой образуется промежуточный олиго(нуклеотид-бензоилангидрид), гидролизующийся затем до олигонуклеотида. Тот же реагент в пиридине бензоилирует уридин-2',3'-циклофосфат (наряду с наличием незначительной полимеризации), т. е. реакция протекает по механизму «б». В результате обработки аденозин-2',3'-циклофосфата бензоилхлоридом в обоих растворителях получается главным образом соединение олигонуклеотидной природы. Пространственные аспекты конформации ангидрида циклофосфата и бензойной кислоты могут играть очень важную роль с точки зрения удобства атаки атома фосфора.

Еще более сильное влияние рассмотренных растворителей на течение реакции, но с обратным эффектом, было обнаружено для ангидридов, образующихся из метан- и этансульфонилхлоридов. В диоксане образуется лишь 5'-О-алкансульфонилуридин-2',3'-



циклофосфат (механизм «б»), тогда как в пиридине оба реагента вызывают полимеризацию, протекающую со значительной скоростью.

Природа продуктов, полученных из полностью этерифицированных ангидридов нуклеотидов описанного типа, является, таким образом, функцией компонентов ангидрида и в особенности ненуклеотидной его части (хотя несомненно имеются различия между нуклеотидами), природы растворителя (по-видимому, диэлектрические свойства среды влияют на распределение электронной плотности в ангидриде) и наличия или отсутствия основного катализа [33]. В некоторых отношениях химическое регулирование и направление течения реакции напоминают ферментативное регулирование, которое вполне очевидно для ряда биохимических реакций, включающих ангидриды нуклеозид-5'-фосфатов. Дальнейшее сходство можно найти в химическом синтезе нуклеотидкоферментов, образующихся в результате нуклеофильного анионного обмена.

ЭТИЛПОЛИФОСФАТ

Недавно было описано [42, 43] использование этилполифосфата (полученного растворением пятихлористого фосфора в этиловом эфире) для полимеризации мононуклеотидов. Нуклеотиды (2'-, 3'-или 5'-фосфаты, а также 2',3'-циклофосфаты) смешивают непосредственно с вязким эфиром полифосфорной кислоты и оставляют при температуре около 50—60°; добавляемый пиридин катализирует полимеризацию. После диализа продуктов реакции были выделены с выходом 10—20% недиализуемые полинуклеотиды. Молекулярные веса, определенные седиментационным и вискозиметрическим методами, колеблются от $2 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^4$, что указывает на наличие в цепи приблизительно 100 нуклеотидов. Предварительные данные показали, что рибонуклеотиды связаны между собой преимущественно природной 3'—5'-межнуклеотидной связью *. Этот же метод применим и для полимеризации дезоксинуклеотидов.

Значительный интерес представляет тот факт, что реагент (который может быть использован для синтеза нуклеозидов и мононуклеотидов) является эффективным и для замещения гетероциклических оснований в апуриновой кислоте. Так, при обработке апуриновой кислоты из ДНК зобной железы телят этим полифосфатом в присутствии аденина образуется вещество, в котором все удаленные пуриновые основания оказались замещенными на аденин, причем свободные альдегидные группы отсутствовали. Реконструированная

* Вопрос о природе межнуклеотидных связей в образующихся полимерах остается открытым. Многие исследователи ставят под сомнение факт образования дифирных связей, см., например, Кочетков Н. К. и соотр., *Biochim. Biophys. Acta*, 80, № 1, 145 (1964). — *Прим. ред.*

ДНК расщеплялась дезоксирибонуклеазой и фосфодиэстеразой яда гремучей змеи, и после гидролиза был найден в требуемом количестве дезоксиаденозин. Такое реконструирование можно проводить как в безводных условиях (в диметилформамиде), так и в водном растворе [43].

Хотя другие методы синтеза специфических соединений, возможно, лучше, чем метод с использованием этилполифосфата, многосторонность свойств этого реагента просто замечательна. Помимо синтеза нуклеотидов, нуклеозидов и полинуклеотидов, реагент используется в полипептидном синтезе и для получения линейных полисахаридов, включая поли- β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-глюкозу и даже такие неустойчивые полисахариды, как поли- α -(1 $\rightarrow$ 5)-D-рибоза [42, 43, 48]. При этом присутствие в реакционной смеси небольших количеств воды не мешает полимеризации. Все эти реакции представляют несомненный интерес в связи с вопросами о происхождении жизни на Земле.

Литература

1. Gulland J. M., Smith H., *J. Chem. Soc.*, 1948, 1532.
2. Elmore D. T., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 1952, 3681.
3. Michelson A. M., *Biochim. et Biophys. Acta*, 55, 841 (1962).
4. Durant G. J., Turnbull J. H., Wilson W., *Chem. and Ind.*, 1958, 157.
5. Riley G., Turnbull J. H., Wilson W., *J. Chem. Soc.*, 1957, 1373.
6. Hall R. H., Todd A. R., Webb R. F., *J. Chem. Soc.*, 1957, 3291.
7. Michelson A. M., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 1955, 2632.
8. Michelson A. M., Szabo L., Todd A. R., *J. Chem. Soc.*, 1956, 1546.
9. Christie S. M. H., Elmore D. T., Kenner G. W., Todd A. R., Weymouth F. J., *J. Chem. Soc.*, 1953, 2947.
10. Tener G. M., Khorana H. G., Markham R., Pol E. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 6223 (1958).
11. Okazaki R., *Biochim. et Biophys. Acta*, 44, 478 (1960).
12. Turner A. F., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4651 (1959).
13. Khorana H. G., Vizsolyi J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 675 (1961).
14. Khorana H. G., Turner A. F., Vizsolyi J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 686 (1961).
15. Ralph R. K., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 2926 (1961).
16. Todd A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 45, 1389 (1959).
17. Cramer F., Wittmann R., *Angew. Chem.*, 72, 628 (1960).
18. Weimann G., Khorana H. G., *Chem. and Ind.*, 1962, 271.
19. Khorana H. G., Razzell W. E., Gilham P. T., Tener G. M., Pol E. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1002 (1957).
20. Gilham P. T., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 6212 (1958).
21. Schaller H., Khorana H. G., *Chem. and Ind.*, 1962, 699.
22. Tener G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 159 (1961).
23. Gilham P. T., Khorana H. G., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 4647 (1959).

24. Smith M., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **81**, 2911 (1959).
25. Rammler D. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 3112 (1962).
26. Smrť J., Beranek J., Šorm F., Collection Czechoslov. Chem. Commun., **25**, 2459 (1960).
27. Michelson A. M., Nature, **181**, 303 (1958).
28. Michelson A. M., Chem. and Ind., **1958**, 1147.
29. Brown D. M., Magrath D. I., Todd A. R., J. Chem. Soc., **1955**, 4396.
30. Michelson A. M., Chem. and Ind., **1958**, 70.
31. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 1371.
32. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 3655.
33. Lettters R., Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1962**, 71.
34. Michelson A. M., неопубликованные данные.
35. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1962**, 979.
36. Cohn W. E., Volkin E., J. Biol. Chem., **203**, 319 (1953).
37. Michelson A. M., Strasbourg Meeting on RNA and Polyphosphates, July, 1961.
38. Beranek J., Smrť J., Collection Czechoslov. Chem. Commun., **25**, 2029 (1960).
39. Szer W., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **7**, 491 (1960).
40. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1958**, 2055.
41. Michelson A. M., Nature, **181**, 375 (1958).
42. Schramm G., Grottsch H., Pollmann W., Angew. Chem., **73**, 619 (1961).
43. Schramm G., Strasbourg Meeting on RNA and Polyphosphates, July, 1961.
44. Khorana H. G., Vizsolyi J. P., Ralph R. K., J. Am. Chem. Soc., **84**, 414 (1962).
45. Smith M., Rammler D. H., Goldberg I. H., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 430 (1962).
46. Weimann G., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 419 (1962).
47. Smrť J., Šorm F., Coll. Czech. Commun., **27**, 73 (1962).
48. Schramm G., Grottsch H., Pollmann N., Angew. Chem., **74**, 53 (1961).

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Задача физической химии нуклеиновых кислот состоит в описании и интерпретации ряда свойств, возникающих благодаря наличию у этих полимеров вторичной структуры. Первичная структура, т. е. природа и расположение ковалентных связей в молекуле, изучалась и будет изучаться специальными методами биохимии и органической химии. Аспекты вторичной структуры касаются размеров, формы и конформации макромолекулы, и их изучение проводится методами рентгенографии, а также менее специализированными методами физической химии. Чисто морфологические детали третичной структуры изучаются главным образом методами современной электронной микроскопии. Они включают вопросы взаимоотношения нуклеиновой кислоты и белка в нуклеопротеидах, организации агрегатов полинуклеотидных тяжей и упаковки субъединиц в вирусах и нуклеопротеидных частицах. При рассмотрении еще более высоких уровней организации, например вопроса о распределении нуклеиновых кислот в хромосомах, сомнительно, уместно ли для таких структур пользоваться термином молекула (или даже макромолекула).

В настоящее время известно, что многие физические свойства нуклеиновых кислот, которые ранее связывали только с их относительно высоким молекулярным весом, характерны для олигонуклеотидов и низкомолекулярных полинуклеотидов [1]. Чтобы избежать повторений, мы не будем придерживаться исторической последовательности и начнем наш обзор с описания свойств олигонуклеотидов с известной структурой. Далее будут обсуждены свойства высокомолекулярных полимеров, синтезированных ферментативным путем, и затем, наконец, будут рассмотрены свойства самих нуклеиновых кислот. Мы надеемся, что это позволит избежать путаницы, а число недоразумений, которые обычно возникают время от времени, будет сведено к минимуму.

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Современные сведения о физикохимических свойствах олигонуклеотидов и низкомолекулярных полинуклеотидов получены в основном при изучении рибонуклеотидов, синтезированных хими-

ческим путем [2, 3]. Кроме синтетических олигорибонуклеотидов, содержащих, как и природные нуклеиновые кислоты, 3'—5'-межнуклеотидные связи, определенное значение для описания и объяснения ряда общих свойств, характерных для олигонуклеотидов, имели изомерные производные с 2'—5'-связями [4]. Одним из наиболее замечательных из этих свойств является влияние степени полимеризации на ультрафиолетовое поглощение пуриновых и пиримидиновых оснований.

ГИПЕРХРОМНЫЙ ЭФФЕКТ

Дегградация нуклеиновых кислот сопровождается увеличением ультрафиолетового поглощения, которое обычно измеряют в области максимума поглощения (260 мμ). Этот гиперхромный эффект наблюдался многократно [5—16], и можно заключить, что все известные значения молярной экстинкции нативных нуклеиновых кислот ниже, чем суммарная экстинкция их мононуклеотидных компонентов [17]. Так как нуклеиновые кислоты еще мало изучены, экстинкцию обычно рассчитывают по отношению к молярному содержанию фосфора [18], и полученные результаты, таким образом, отражают среднее молярное оптическое поглощение на один нуклеотид. При полном щелочном или ферментативном гидролизе рибонуклеиновых кислот до мононуклеотидов оптическое поглощение возрастает, как правило, на 24—45%. При частичном гидролизе панкреатической рибонуклеазой наблюдается несколько меньший гиперхромный эффект (около 15%). Для удобства обычно пользуются понятием гиперхромизм (т. е. выраженное в процентах увеличение оптического поглощения при λ_{макс} при дегградации или денатурации), а не гипохромизм (уменьшение оптического поглощения в процентах), который наблюдается при полимеризации или образовании водородных связей. Полный гидролиз нативных ДНК и некоторых высокомолекулярных гомополимерных полирибонуклеотидов, синтезированных ферментативным путем, сопровождается исключительно высоким гиперхромизмом (до 60—70%).

Было найдено, что оптическое поглощение некоторых дидезокси-нуклеотидов примерно на 5—10% ниже, чем соответствующих мононуклеотидов [15, 19, 20], что противоречит той точке зрения, что гипохромизм не является результатом связывания нескольких мононуклеотидов. В соответствии с этим, гиперхромные эффекты наблюдали при разрушении большого числа олигорибонуклеотидов, характерные величины которых, приведенные в табл. 8-1 и 8-2, показывают, что эти эффекты, которые могут быть достаточно большими даже для динуклеотидов, быстро достигают предельных значений при длине цепей 5—6 нуклеотидов для каждой гомологической серии [21] и что они являются функцией не только сум-

Таблица 8-1
ГИПЕРХРОМИЗМ ПРИ ЩЕЛОЧНОМ ГИДРОЛИЗЕ

Соединение ^a	Средняя длина цепи	Гиперхромизм	Соединение ^a	Гиперхромизм
Полиадениловая кислота	7,7	31,8	УфГФА	6,8
Полиадениловая кислота	13,6	36,7	ГФАФУ	11,3
Полицитидиловая кислота	9,8	15,9	ГфУФА	5,3
Полигуаниловая кислота	12,5	0	ЦФАФУ	12,5
Полиуридиловая кислота	6,6	6,5	ЦфУФА	7,5
Полиуридиловая кислота	11,9	8,6	ЦфУфГФА	7,7
Полиуридиловая кислота	6,2	10,5	ЦфГФАФУ	12,9
ПолиАЦГУ	12,5	14,3	ЦфГфУФА	6,2
Дитидиловая кислота		8,7	ГфЦФАФУ	12,3
Трицитидиловая кислота		13,9	ГфЦфУФА	6,6
Тетрацитидиловая кислота		15,3	АфУфГфЦ	8,6

Соединение	Гиперхромизм	Соединение	Гиперхромизм
А3'ф5'А3'ф5'Ц3'ф	22,5	Ц2'ф5'Ц	10,8
А3'ф5'А3'ф5'Ц	23,3	Ц3'ф5'Ц	7,4
Г3'ф5'Ц3'ф	3,8	Г2'ф5'А	5,0
Г3'ф5'Ц	3,0	Г3'ф5'А	3,3
У2'ф5'А	5,2	А2'ф5'А	18,4
У3'ф5'А	3,2	А3'ф5'А	13,3
А2'ф5'У	12,8	Ц2'ф5'А	9,7
А3'ф5'У	4,1	Ц3'ф5'А	10,2
А5'ф5'А	10,3	А3'ф5'Ц	7,6

^a Все приведенные выше соединения представляют собой смесь полимеров с 2'—5'- и 3'—5'-связями.

марного состава молекул, но и последовательности расположения нуклеотидных остатков [22].

Наблюдалось также изменение гиперхромизма с изменением pH (рис. 8-1), а результаты, приведенные в табл. 8-2, показывают, что влияние pH на ультрафиолетовое поглощение олигонуклеотидов и низкомолекулярных полинуклеотидов (по сравнению с оптическим поглощением их мононуклеотидных компонентов при тех же значе-

Таблица 8-2

ИЗМЕНЕНИЕ ГИПЕРХРОМИЗМА С ИЗМЕНЕНИЕМ pH

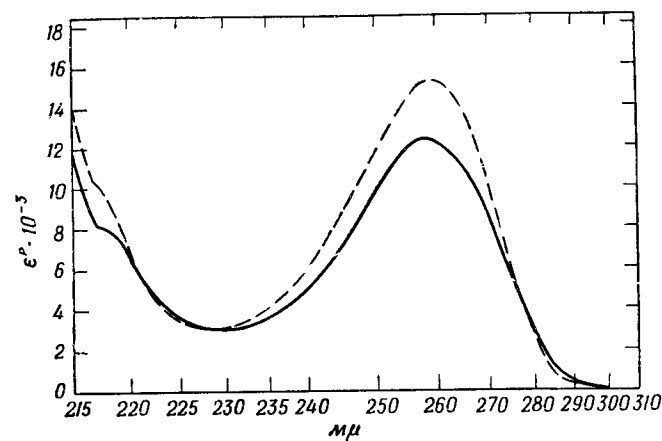
Соединение	0,01 н. HCl	pH 7	0,2 н. NaOH
A2'ф5'У	12,3	10,0	12,8
A3'ф5'У			4,1
A5'ф5'У	13,6		10,3
P ¹ -Аденозин-5'-Р ² -уридин-5'-пирофосфат	9,0	12,6	6,7
N3'ф5'N3'Ac ^a	11,2	22,5	24,6
Ac3'N5'ф5'N3'Ac	11,9	33,1	39,3
P ¹ , P ² -Диаденозин-5'-пирофосфат . . .	13,6	33,9	33,9
Диадениловая кислота (смесь 2'—5'- и 3'—5'-изомеров)	0		15,1
Триадениловая кислота (смесь 2'—5'- и 3'—5'-изомеров)	6,8		22,8
Тетраадениловая кислота (смесь 2'—5'- и 3'—5'-изомеров)	13,2		30,7
Пентаадениловая кислота (смесь 2'—5'- и 3'—5'-изомеров)	16,4		32,9
Полиадениловая кислота (средняя длина цепи 13,6)	22,9		36,7
Полигуаниловая кислота (средняя длина цепи 12,5)	18,0	23,0	0
Поли[аденилил(2)-гуаниловая (1)] кислота (средняя длина цепи 6,2)	14,7	36,7	19,0
Поли-N'-метилуридиловая кислота (средняя длина цепи 5,9)	16,5	19,2	8,5
P ¹ -Аденозин-5'-Р ² -оэстронпирофосфат . .		~25	(ε _{макс} 12 600, рассч. ε _{макс} 16 000)

^a N = 6-диметиламино-9-β-D-(3'-амино-3'-дезоксирибофуранозил)пуриин.

ниях pH) представляет собой сумму многих различных факторов, связанных не только с нуклеотидным составом, но и с порядком чередования нуклеотидных остатков. В частности, гиперхромизм динуклеотидов, содержащих аминопурины или аминопиримидины, значительно понижен в кислых растворах, но фактически одинаков в нейтральных и щелочных условиях; в то же время у динуклеотидов, содержащих 6-кетогруппы, гиперхромный эффект заметно понижен при щелочных значениях pH (когда пуриновые или пири-

мидиновые основания полностью ионизированы) по сравнению с гиперхромизмом в нейтральных или кислых растворах.

Необходимо отметить, что гиперхромизм является свойством полимеров не только с 3'—5'-межнуклеотидными связями, но он характерен также для динуклеозид-5'-фосфатов (т. е. 5'—5'-фосфодиэфиров) и изомеров с 2'—5'-связями. В действительности,

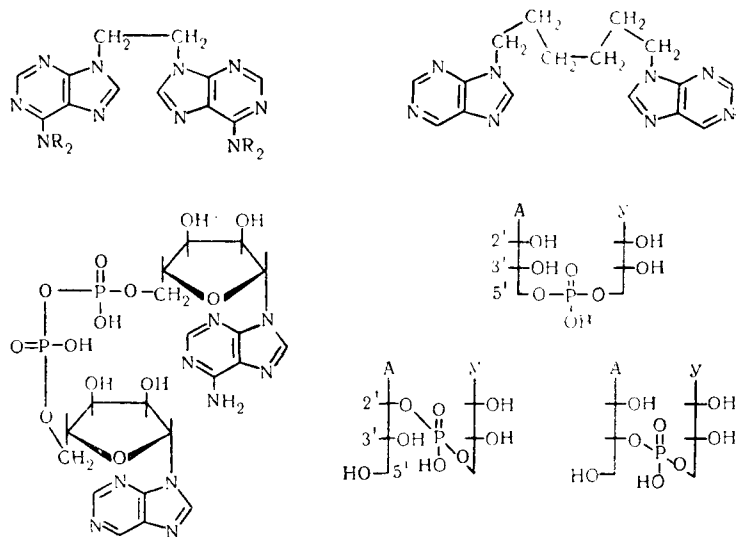


Р и с. 8-1. Действие щелочи на триадениловую кислоту.
— полимер в 0,2 н. NaOH; — — — продукты [21].

α,ω-ди-9-пуринилэтаны или α,ω-ди-9-пуринилгексаны [23], в особенности первые, по сравнению с 9-метил (или рибозил) производными, характеризуются значительными гипохромными эффектами (порядка 15—40%). При этом в качестве пуриновых оснований использовали пурин, аденин, 6-диметиламинопурин и 6-диметил-амино-8-азапурин, и в этом случае даже для α,ω-ди-9-пуринилгексана отклонение от аддитивности оптического поглощения оснований было значительно меньше в кислой среде (pH 1), чем в нейтральной или щелочном растворе.

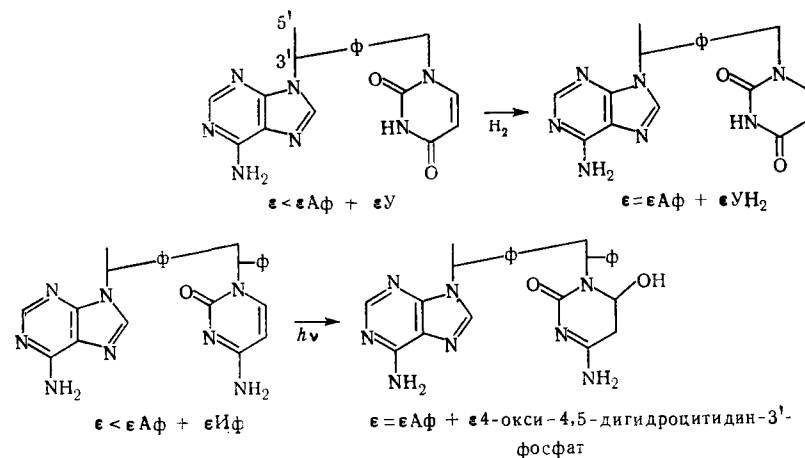
Понижение значений ε_{макс} наблюдается также и у P¹, P²-динуклеозид-5'-пирофосфатов [24]. Наличие пирофосфатной связи увеличивает гибкость, необходимую для наиболее тесного сближения и максимального перекрывания оснований, и не удивительно, что гиперхромный эффект для P¹, P²-диаденозин-5'-пирофосфата значительно выше, чем у изомерных диадениловых кислот. В случае P¹-аденозин-P²-оэстронпирофосфата наблюдалось, кроме того, уменьшение рассчитанной величины ε_{макс} на 20% [25], что, по-видимому, является результатом взаимодействия между адениновым ядром и бензольным кольцом стероидного остатка. Что касается

динуклеозидфосфатов и более высокомолекулярных олигонуклеотидов, 2' — 5'-изомеры, в общем, характеризуются более высокими гиперхромными эффектами, чем 3' — 5'-производные; влияние порядка чередования оснований отчетливо видно при сравнении гиперхромных эффектов А2'ф5'У и изомерного У2'ф5'А. Влияние изменений порядка чередования оснований заметно, хотя и менее отчетливо, и у изомеров с 3' — 5'-связями.



Так как динуклеозидфосфаты, полученные из 6-диметиламинопурина, характеризуются высокими гиперхромными эффектами (фактически превышающими эффекты соответствующих производных аденина [24]) при всех значениях pH, мало вероятно, что образование водородных связей играет важную роль в гипохромизме олигонуклеотидов, в особенности потому, что на этот эффект не влияет повышение температуры до 90°. Представление об образовании молекулами воды ледообразной решетки, которая имеет существенное значение для макромолекулярной структуры высокомолекулярных дезоксирибонуклеиновых кислот, вряд ли применимо к динуклеозидфосфатам. Далее, исчезновение гипохромизма у таких динуклеотидов, как А3'ф5'У и А3'ф5'Ц3'ф, при насыщении 4,5-двойной связи в пиримидиновом остатке при гидрировании [26] или фотолизе [27] указывает на то, что π -электронные системы пуриновых и пиримидиновых оснований играют важную роль в этом явлении.

При более коротких длинах волн в области поглощения карбонильной группы (в производных 4,5-дигидроцитозина 2-карбонильная группа остается сопряженной с 1,6-двойной связью) некоторый небольшой гипохромизм еще сохраняется, но потеря ароматического характера такими производными приводит к образованию



промежуточных соединений, для которых максимальное поглощение, по существу, аддитивно складывается из значений мононуклеотидных компонентов [27]. Аналогичным образом гидрирование урацила по 4,5-двойной связи в ГфУфА приводит к образованию продукта, который не обладает гипохромизмом, но соединение, полученное при гидрировании или фотолизе изомерного УфГфА, характеризуется все же более низким оптическим поглощением благодаря наличию двух соседних пуриновых остатков [28]. В случае продуктов фотолиза реакция в противоположном направлении (тепловая реактивация) приводит к полному восстановлению величины гипохромных эффектов. Хотя потеря ароматического характера пиримидиновыми циклическими системами заметно отражается на константах диссоциации (превращение цитозина в дигидроцитозин смещает значение pK аминогруппы от 4,6 до 6 и выше, а величина pK группы — $\text{NH} - \text{CO}$ — в дигидроурациле превышает 11), 4,5-дигидропиримидины существуют главным образом в таких формах, которые допускают образование водородных связей [26].

Наряду с другими объяснениями наиболее правдоподобная интерпретация этих результатов предполагает, что в относительно низкомолекулярных полинуклеотидах пуриновые и (или) пиримидиновые основания уложены слоями друг над другом, причем расстояние между этими слоями равно, и что взаимодействие между

π -электронами соседних циклов не только стабилизирует эту конформацию, но и вызывает возникновение, по существу, новой электронной системы, которая определяет характеристическое ультрафиолетовое поглощение всей молекулы, а не простое суммирование независимых величин оптического поглощения мононуклеотидных компонентов [2, 29, 30]. Взаимодействие π -электронов систем, по-видимому, должно оказывать некоторое влияние на ионизацию функциональных групп пуринов и пиримидинов, так как они входят в хромофорные системы. Аналогичным образом, перестройка этих групп при ионизации или образовании водородных связей также может непосредственно влиять на взаимодействие π -электронов. В случае высокомолекулярных нуклеиновых кислот и полинуклеотидов на это взаимодействие, а следовательно, и на ультрафиолетовое поглощение всей молекулы может оказывать влияние, кроме того, изменение ионной силы и другие факторы, изменяющие конформацию макромолекулы. Любые процессы, которые увеличивают взаимодействие между пуриновыми и пиримидиновыми циклами, например ограничение вращения вокруг межинуклеотидных связей при образовании спиральных структур, стабилизированных водородными связями, сжатие макромолекулы или образование хелатных комплексов оснований с металлами, должны увеличивать гиперхромный эффект [4].

Прямой предпосылкой для такой интерпретации гиперхромизма олигонуклеотидов является тот факт, что низкомолекулярные полинуклеотиды обладают определенной конформацией и что даже динуклеотиды и динуклеозидфосфаты характеризуются ограниченным вращением вокруг межинуклеотидной связи. Это подтверждается подвижностью изомерных динуклеозидфосфатов при электрофорезе [22]. Во всех изученных случаях производные с 2'—5'-связями обладают более высокой подвижностью, чем 3'—5'-изомеры (что параллельно их гиперхромизму); таким образом, соединения первого типа более компактны, чем соединения второго типа, что приводит к более сильному взаимодействию между основаниями. Это особенно примечательно, так как в других отношениях 3'—5'-соединения ведут себя как более сильные кислоты.

Таким образом, величина гиперхромизма является мерой степени взаимодействия между основаниями и зависит от перекрывания оснований и расстояния между их плоскостями. Как и можно было ожидать, для изомерных динуклеозидфосфатов, например, АЗ'ф5'Ц и ЦЗ'ф5'А, эти факторы не идентичны, так как смещение, необходимое для максимального сближения пуриновых и пиримидиновых оснований, зависит от направления связи. Аналогичным образом вследствие стереохимических особенностей в случае 2'—5'-изомеров, например, А2'ф5'У, основания могут быть расположены ближе друг к другу и более сильно перекрываться, чем у соедине-

ний с 3'—5'-связями, например у АЗ'ф5'У. Кроме определенной упаковки оснований, межплоскостные взаимодействия в более высокомолекулярных олигонуклеотидах и полинуклеотидах могут вызвать поворот спирали вдоль оси углеводфосфатного остова молекулы, что приведет к еще более тесному сближению и более сильному перекрыванию π -электронных систем. Этот эффект может служить мерой стабильности двухспиральных структур даже в отсутствие внутрицепочечных комплементарных водородных связей, и, таким образом, он может объяснить обратимость титрования дезоксирибонуклеиновых кислот при 0° или более низкой температуре по сравнению с гистерезисом (который указывает на денатурацию), наблюдаемым при более высоких температурах [31, 32]. Можно ожидать, что некоторое ограничение вращения оснований вокруг гликозидной связи будет наблюдаться в полирибонуклеотидах, которые содержат пиримидиновые нуклеозиды, в результате образования водородной связи между С₂-карбонильными группами пиримидинов и 2'-гидроксильными группами сахаров. Этот эффект, по-видимому, должен отсутствовать у соответствующих полидезоксинуклеотидов, так как в этом случае конформационные изменения должны происходить более легко. В связи с этим было бы интересно сравнить полицитидиловую и полидезоксцитидиловую кислоты (ср. относительную стабильность комплексов этих двух полимеров с полидезоксигуаниловой кислотой).

Ранее мы уже упоминали о влиянии ионизации пуриновых и пиримидиновых оснований на гипохромный эффект. Несмотря на то что эти изменения до некоторой степени являются результатом деформации π -электронных систем, вероятно, что главной причиной их возникновения служит увеличение горизонтального смещения или разьединения плоскостей оснований вследствие отталкивания одинаково заряженных пуриновых и пиримидиновых оснований. Далее, в случае любого полинуклеотида, по-видимому, проявляются два противоположных эффекта: отталкивание заряженных фосфатных групп, уравновешенное взаимодействием пуриновых и пиримидиновых оснований. С точки зрения точной стереохимической структуры молекулы, положение этого равновесия сильно зависит от степени ионизации фосфатных остатков (влияние ионной силы и природы присутствующих катионов), а также от состояния оснований. Энергия (ΔE) вандерваальсова взаимодействия для неполярных молекул обратно пропорциональна шестой степени расстояния между молекулами (r_{AB}), как это следует из приближенной формы [33] основного уравнения Лондона

$$\Delta E = \frac{-3\alpha_A\alpha_B(I_A)(I_B)}{2r_{AB}^6(I_A + I_B)},$$

где α_A и α_B — степень поляризации молекул, а I_A и I_B — приблизительно равны ионизационным потенциалам молекул. Поэтому ясно, что такое взаимодействие будет лишь незначительно изменять межплоскостные расстояния.

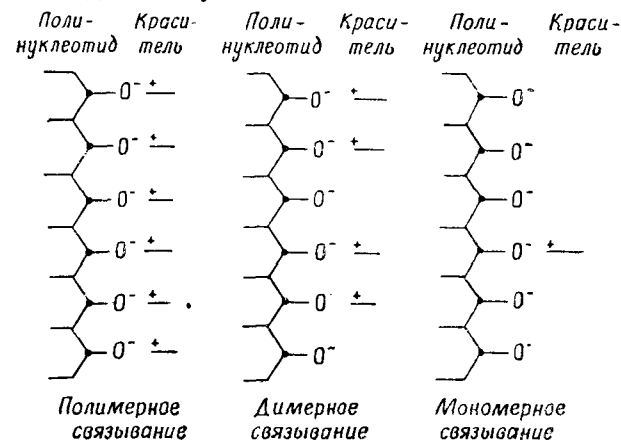
Наряду с гипохромными эффектами олигонуклеотидов при максимуме поглощения, было найдено, что даже ди- и тринуклеотиды [21] обладают небольшим, но заметным гиперхромизмом для более длинных волн (280—300 мμ). (См. стр. 631, где этот вопрос обсуждается более детально.)

Как и в случае изменений ультрафиолетового поглощения, взаимодействия в олигонуклеотидах прежде всего вызывают увеличение оптического вращения на 10—30%. Его можно сравнить с почти 10-кратным возрастанием величины оптического вращения у дезоксирибонуклеиновых кислот при образовании их строго упорядоченной вторичной структуры [34].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КРАСИТЕЛЯМИ

При изучении влияния олигонуклеотидов на спектры поглощения ряда красителей в видимой области было получено доказательство, подтверждающее тот факт, что плоскости пуриновых и пиримидиновых оснований в этих полимерах расположены друг над другом. Широко изучено связывание нуклеиновыми кислотами некоторых плоскостных основных красителей и аминокридинов [35—51]. Основные красители, проявляющие метахроматизм при взаимодействии с полиэлектролитами, характеризуются тем, что их водные растворы не подчиняются закону Ламберта — Бера. Это отклонение обусловлено агрегацией молекул красителя в концентрированных растворах. Долгое время считали, что агрегация происходит за счет того, что молекулы ароматического соединения укладываются друг над другом так, что их плоскости параллельны, причем нити агрегатов удерживаются вместе за счет лондоновских дисперсионных сил, возникающих между π -электронными системами, вследствие чего появляются изменения в спектре поглощения в видимой области. Связывание таких красителей нуклеиновыми кислотами в разбавленном растворе приводит к аналогичным эффектам (рис. 8-2). Прямая корреляция метахроматичности красителей (за счет определенной упаковки молекул) с гипохромизмом олигонуклеотидов вытекает из тех наблюдений [52, 53], которые показывают, что силы, действующие между циклами соседних ионов в агрегатах красителей в концентрированных растворах, характеризуются равновесным расстоянием 3—4 Å. Отрицательный дихроизм окрашенных волокон ДНК (при использовании толудинового голубого) в видимой области указывает на то, что в таких случаях плоскостные поглощающие группировки красителя расположены в основном под

прямыми углами к длинной оси нити [54]. Важнейшими группировками, взаимодействующими с молекулами основных красителей, обычно служат диссоциированные фосфатные группы в полинуклеотидной цепи [37, 55], а метахроматичность толудинового голубого, вызываемая дезоксинуклеогистонами из зубной железы телят,

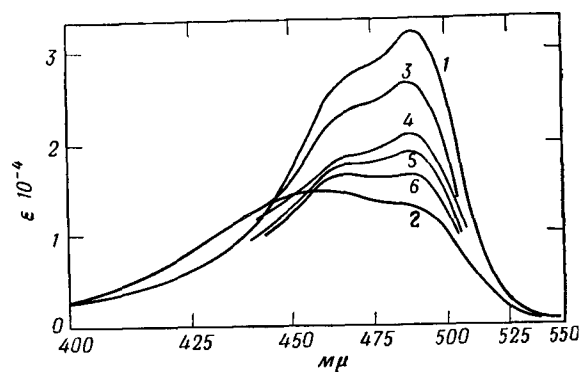


Р и с. 8-2.

обычно приводят как доказательство того, что несвязанные фосфатные группы в нуклеопротеиде следуют одна за другой [36] (по-видимому, в результате отделения белковых субъединиц). Для этой цели, кроме толудинового голубого, использовали также розанилин, тионин и акридиновый оранжевый. В случае акридинового оранжевого наблюдалось, кроме того, заметное самопогашение флюоресценции вследствие либо укладки молекул красителя друг над другом, либо концентрационных эффектов или взаимодействия с полианионами [41].

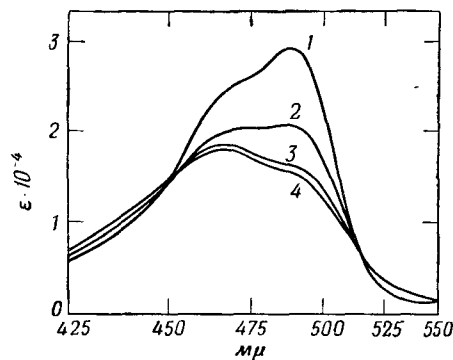
Влияние синтетических олигонуклеотидов (со средней длиной цепи около 6 нуклеотидов) на спектры поглощения розанилина, толудинового голубого и акридинового оранжевого (рис. 8-3 и 8-4) [21, 22] было сходным, но не идентичным тому, которое наблюдалось при использовании нуклеиновых кислот. Чтобы избежать связывания с отдельными мономерными фрагментами, которое, по-видимому, могло произойти при большом избытке полимера, использовали эквимоллярные количества красителя и полинуклеотида [56]. Кроме того, применяли буферные растворы с низкой ионной силой, так как при избытке катионов, особенно двухвалентных, константы связывания для комплексов краситель — нуклеиновая кислота понижены. (Двухвалентные катионы примерно в 30 раз эффективнее одновалентных и, по-видимому, действуют исключительно как

конкурирующие агенты [57].) Во всех случаях влияние синтетических полимеров на оптическое поглощение красителя было меньше, чем влияние продуктов деградации РНК со сравнимой длиной цепи.



Р и с. 8-3. Влияние олигонуклеотидов [$3 \cdot 10^{-5}$ М (Р)] на спектр поглощения акридинового оранжевого ($3 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,01 М растворе ацетата аммония при рН 6,8.

1 — краситель; 2 — краситель + полиглутаминовая кислота [$3 \cdot 10^{-5}$ М (COOH)]; 3, 4, 5, 6 — краситель + олигоуридиловая, олигодитидиловая, олигоадениловая и олигогуаниловая кислота соответственно [21, 22].



Р и с. 8-4. Влияние длины цепи олигонуклеотида на спектр акридинового оранжевого.

1 — краситель; 2, 3, 4 — краситель + олигогуаниловые кислоты с примерной длиной цепи 4, 6 и 10 мононуклеотидов соответственно.

Достоверное объяснение этого факта заключается в том, что синтетические полимеры содержат как 2' — 5', так и 3' — 5'-межнуклеотидные связи; это приводит к менее однородному распределению фосфатных групп вдоль их полинуклеотидных цепей по сравнению с природными полинуклеотидами. Следовательно, даже в том

случае, если связываются все группировки, сильная метахроматичность может отражать наличие только 2' — 5'- или 3' — 5' связей. Более того, ее появление отражает скорее «димерное», а не «полимерное» связывание (см. рис. 8-2). Как было показано, природа пуринового или пиримидинового основания оказывает глубокое влияние на индуцируемую метахроматичность красителя. Является ли это показателем необходимости наличия вторичной стереоспецифичности для эффективного связывания или отражением упорядоченности конформации различных гомополимеров, пока еще не известно. Эффективность гомополимеров со сравнимыми длинами цепей возрастает в следующем порядке: поли-У < поли-Ц < поли-А < поли-Г. В этом же порядке полинуклеотиды (при использовании тех же препаратов) располагаются по их способности подавлять флуоресценцию акридинового оранжевого. Интерес представляет влияние длины цепи полимера на степень взаимодействия с красителями. Оказалось, что заметное взаимодействие появляется при длине цепи 8—10 нуклеотидов; в случае гомогенного препарата (исключительно с 2' — 5'- или 3' — 5'-межнуклеотидными связями) эффективное связывание красителя происходит, возможно, и при меньшей длине цепи (4—5 нуклеотидов). Аналогичные эффекты наблюдались для апуриновой кислоты, которая содержит относительно короткие отрезки (до 10 нуклеотидов) из пиримидиновых полидезоксинуклеотидов, и разнообразных основных красителей [58].

Полиглицерофосфат (со средней длиной цепи 12,1 глицерофосфатных единиц), в котором вряд ли можно ожидать упорядоченного расположения фосфатных остатков, не оказывает никакого влияния на красители в стандартных условиях [21]. Однако в случае акридинового оранжевого и α-поли-L-глутаминовой кислоты наблюдалось заметное взаимодействие, которое можно было сравнить с метахроматичностью, вызываемой полигуаниловой кислотой [1]. По-видимому, молекулы красителя, связываясь с карбоксильными группами, которые находятся на расстоянии 3—4 Å друг от друга, располагаются одна над другой.

ДРУГИЕ СВОЙСТВА

Наблюдалось также взаимодействие олигонуклеотидов с хлоридом ртути(II). В то время как изменениями в ультрафиолетовом спектре поглощения при добавлении хлорида ртути(II) к аденилил-3': 5'-аденозину (АЗ'ф5'А) можно пренебречь, с увеличением длины синтетической полиадениловой кислоты степень взаимодействия возрастает, что доказывается bathochromным смещением $\lambda_{\text{макс}}$ и уменьшением оптического поглощения приблизительно на 15% [59]. При этом происходит прямое взаимодействие иона ртути

с гетероциклическими основаниями. В случае ДНК, кроме изменений в спектре поглощения, наблюдается заметное уменьшение истинной вязкости [60].

Полимеризация может влиять также на кажущиеся значения pK оснований. При этом для олигоуридиловой или олигоцитидиловой кислоты существенных изменений не было отмечено, но спектрофотометрическое титрование олигогуаниловой кислоты показало, что для полимера со средней длиной цепи 5,4 нуклеотида кажущееся значение pK смещается у мононуклеотидов от 2,3 до 2,6, а в щелочной области было замечено смещение от 9,3 до 10,8 (для полимера со средней длиной цепи 5,4 единицы) и до 11,2 (для полигуаниловой кислоты со средней длиной цепи 12,5 единиц). Аналогичное смещение диссоциации групп — NH — СО — гуанина (до 10,2) наблюдалось [22] при полимеризации динуклеотида Г3'ф5'Ц3'ф. Несмотря на то что можно ожидать появления различий в значениях pK в результате влияния локальных (внутрицепочечных) зарядов (которые действительно наблюдались для аминокислот цитозина у цитидин-2'- и цитидин-3'-фосфатов [61], у изомерных 2' — 5'- и 3' — 5'-динуклеозидфосфатов [22], а также у динуклеозидфосфатов и динуклеотидов [22]), эти эффекты были малы или фактически отсутствовали, как у олигоцитидиловых кислот. Влияние взаимодействия π -электронов оснований на значение pK , по-видимому, также мало, и возможно, что такие смещения, наблюдавшиеся ранее для дезоксирибонуклеиновых кислот [62, 63], являются в первую очередь результатом образования водородных связей внутри цепи или между отдельными полинуклеотидными цепями, даже фактически в бессолевых растворах. (Сравни с увеличением значения pK в кислой среде, когда высокомолекулярная полиуридиловая кислота образует с полиадениловой кислотой двухспиральный комплекс, связанный водородными связями, стр. 545). В случае химически синтезированной полигуаниловой кислоты наблюдались вызываемые нагреванием гиперхромные эффекты (оптическая плотность при $260\text{ м}\mu \sim 19\text{—}80^\circ$ в нейтральном солевом растворе возрастала на $\sim 20\%$), что указывало на существование структур с водородными связями (беспорядочными или какими-то иными). Меньшее возрастание оптической плотности происходит также при нагревании бессолевого раствора полигуаниловых кислот с короткой длиной цепи, и в этом случае оказалось, что средняя или высокая ионная сила не является необходимой для эффективного образования водородных связей [24]. Известный интерес представляло бы параллельное изучение изменения оптической плотности в зависимости от температуры*.

* В подтверждение вышеупомянутых результатов недавнее изучение три- и тетрадезоксигуаниловой кислот также показало их способность агрегировать; константы седиментации составляли 8—12 ед. Сведберга [401].

Кроме того, в результате упорядоченного расположения заряженных фосфатных групп во вторичной структуре, поддерживаемой водородными связями, может происходить увеличение местного электростатического потенциала. Влияние ионной силы на оптическое поглощение и на значения pK полигуаниловой кислоты (со средней длиной цепи 8 нуклеотидов) указывает на то, что это действительно так. При нейтральном значении pH $\epsilon_{\text{макс}}^P$ растворов полимеров в 1 M растворе хлористого натрия (или в 0,1 M растворе сульфата магния) примерно на 6,5% меньше, чем в бессолевом растворе [24]. Кажущиеся значения pK в воде были 2,7 и 11,6 (определенные спектрофотометрически), но в 0,01 M растворе сульфата магния значение pK для основных групп понижалось до 2,2, а в 1 M растворе хлористого натрия кислотная диссоциации понижалась от 11,6 до 10,2. Это обратимое смещение значений pK , по-видимому, является следствием понижения электростатического потенциала ионизированных фосфатных групп (см. стр. 594).

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ

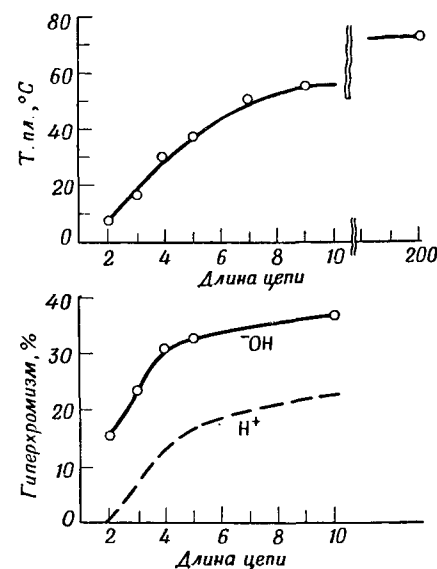
Хотя взаимодействия химически синтезированных полиадениловой и полиуридиловой кислот не наблюдали, частичное взаимодействие полицитидиловой с полигуаниловой кислотой (обе со средней длиной примерно 10 нуклеотидов) было показано с помощью противоточного распределения, а также электрофореза на бумаге гомополимеров и их смеси [22]. Это взаимодействие (сопровождается небольшим уменьшением ультрафиолетового поглощения), по-видимому, сходно с тем, которое наблюдается у высокомолекулярных ферментативно синтезированных полимеров [64]. Кроме того, обнаруженное затем ограниченное вращение вокруг межнуклеотидных связей в олигонуклеотидах также свидетельствует о том, что водородные связи между остатками гуанина и цитозина более прочные, чем между аденином и урацилом. Эти синтетические полимеры содержали как 2' — 5'-, так и 3' — 5'-связи, и трудно было ожидать их полного взаимодействия даже в случае использования препаратов с более длинными цепями, так как изменение межплоскостного взаимодействия могло бы значительно понизить эффективность образования водородных связей*. Последующие работы

* Совсем недавно было показано, что гексадезоксиадениловая кислота образует упорядоченный комплекс с додекатимидиловой кислотой при 0° в 1 M растворе хлористого натрия. Стехиометрия указывает на то, что происходит образование двухцепочечной структуры, содержащей эквивалентные количества тимина и аденина (оптическое поглощение при $259\text{ м}\mu$ уменьшается на 11%) с т. пл. $\sim 16^\circ$ в 1 M растворе хлористого натрия. Никаких доказательств образования комплекса между гексатимидиловой и гексадениловой кислотой не получено [399].

показали, что образование водородных связей между высокомолекулярной полиуридилевой кислотой (с длиной цепи около 200 нуклеотидов) и олигоадениловыми кислотами (с длиной цепи от 2 до 20 нуклеотидов), содержащими только природные 3' — 5'-межнуклеотидные связи, можно легко наблюдать при соответствующих условиях [65, 66]. С увеличением длины олигонуклеотидной цепи стабильность комплексов заметно возрастает, причем температуры плавления комплексов (определенные с помощью измерения ультрафиолетового поглощения и оптического вращения) для ди-, три-, тетра-, пента- и декаадениловых кислот соответственно равны примерно 10, 18, 30, 38 и 55° [65]. При соотношении А : У = 2 : 1 наблюдалось максимальное уменьшение оптического поглощения (35%), что указывало на образование комплекса, сходного с трехцепочечным спиральным комплексом, содержащим две цепи полиуридилевой и одну цепь полиадениловой кислот (см. стр. 550). При соответствующих условиях может быть также получен и двухцепочечный комплекс (с максимальным гипохромизмом 25%). Аналогичное взаимодействие наблюдалось между высокомолекулярной полиадениловой кислотой и олигоуридилевыми кислотами природного происхождения [66] и между полиадениловой кислотой и химически синтезированными олиготимидиловыми кислотами неизвестной длины и структуры [67].

Хотя образование последнего комплекса расценивалось как факт в пользу возможности переноса информации от ДНК к РНК, более существенное спаривание происходит между полимерами из дезоксиадениловой и уридилевой кислот (вследствие образования водородных связей между 2-кето- и 2'-гидроксильными группами пиримидиновых рибонуклеотидов). То, что такие комплексы могут существовать, было показано при изучении образования водородных связей между тридезоксиадениловой и полиуридилевой кислотами [68]. Образуется трехцепочечный комплекс, содержащий две цепи полиуридилевой кислоты. Если гипохромный эффект (32%) при этом сравним с гипохромным эффектом, которым обладает соответствующий комплекс, содержащий тририбоадениловую кислоту, то его температура плавления несколько выше (23° по сравнению с 17°). Даже при более высокой устойчивости к нагреванию различие (18°) определяет зону, в которой гибридный комплекс полирибозитидиловой кислоты с полидезоксигуаниловой кислотой более устойчив, чем двухспиральная структура, образованная полидезоксигуаниловой и полидезокситидиловой кислотами [69]. Идентификация таких гибридных комплексов свидетельствует в пользу представления, что они возникают как промежуточные соединения при переносе информации от ДНК к месту биосинтеза белка.

Найдено, что химически синтезированные олигоадениловые кислоты, содержащие 2' — 5'-межнуклеотидные связи, образуют комплексы с ферментативно синтезированной полиуридилевой кислотой [68, 70]. В 10⁻³ М растворе хлористого магния может образовываться трехцепочечный комплекс (содержащий две цепи полиуридилевой кислоты) с триадениловой кислотой, содержащей исключительно 2' — 5'-связи (полученной ферментативным гидролизом



Р и с. 8-5. Влияние длины цепи олигоадениловой кислоты на температуру плавления ее комплексов с высокомолекулярной полиуридилевой кислотой [65]. Зависимость гипохромизма олигоуаниловой кислоты от длины цепи в кислоте и щелочи [21].

полимера, синтезированного химическим путем), что следует из максимального гипохромного эффекта (35%) смеси [68]. Однако его температура плавления (13,7°) значительно ниже, чем температура плавления соответствующего комплекса из полиуридилевой кислоты и изомерной природной триадениловой кислоты с 3' — 5'-межнуклеотидными связями (т. пл. 23° при той же ионной силе) (рис. 8-5). Так как стабильность комплекса зависит от стереохимических факторов, это различие находится в соответствии с утверждением, что природа межнуклеотидной связи (2' — 5'- или 3' — 5') влияет на расстояния между плоскостями или на другие структурные факторы. Дополнительные данные указывают на то, что тетраадениловая кислота, содержащая беспорядочные 2' — 5'- и 3' — 5'-связи, обра-

зует как двух-, так и трехцепочечные комплексы с полиуридилевой кислотой. Эта работа показывает, что разделять смеси олигонуклеотидов с 2'—5'- и 3'—5'-связями можно путем избирательного образования комплексов с полимерами, синтезированными ферментативно. Если смесь взять в избытке по отношению к высокомолекулярному препарату, содержащему только 3'—5'-связи, а затем отделить комплекс центрифугированием, то надосадочная жидкость, по-видимому, будет обогащена препаратом с 2'—5'-межнуклеотидными связями.

Уменьшение прочности связывания является, кроме того, результатом некомплементарности концевых групп. Так, полиуридиловая кислота образует двух- и трехцепочечные комплексы с фАфАфУ, фАфАфАфУ и фАфАфАфУф, но они менее стабильны, чем комплексы, образованные соответствующими олигонуклеотидами без концевых уридиновых остатков. Стехиометрия реакции указывает на то, что несвязанные уридиловые концы довольно сильно отклонены от цепи, так что соответствующие участки цепи полиуридилловой кислоты открыты и могут образовывать комплементарные связи с остатками адениловой кислоты [68].

Специфическое связывание относительно коротких полидезоксинуклеотидных цепей с высокомолекулярными тяжами доказывалось восстановлением трансформирующей активности у трансформирующей ДНК, обработанной ультразвуком (и практически полностью потерявшей свою активность) при ренатурации ее с нативной ДНК дикого типа [71].

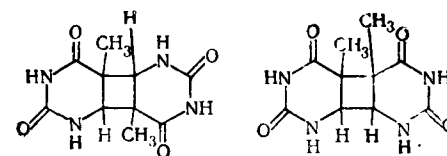
Понижение температуры плавления полиадениловой кислоты в присутствии уридина или тимидина, как было показано, указывает на их специфическое взаимодействие [34]. Однако последние работы показали, что водородные связи при этом не образуются; различные ароматические соединения (включая пурины и пиримидины) также оказались эффективными, а уменьшение стабильности может быть результатом «гидрофобных» взаимодействий [389].

ОБЛУЧЕНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ СВЕТОМ

Независимое доказательство существования взаимодействия между соседними гетероциклами в олигонуклеотидах вытекает из увеличения чувствительности олиготимидиловых [27] и олигоуридиловых кислот к ультрафиолетовому облучению по сравнению с мононуклеотидами. Как и в случае мономеров, для пиримидиновых нуклеотидов в их полинуклеотидной цепи могут происходить обратимые фотохимические превращения, включая присоединение воды по 4,5-двойной связи [27].

Известный интерес представляет образование нерастворимых в воде волокон размером до 7—8 мм × 200 м при облучении высу-

шенных пленок олигоуридилловой кислоты (со средней длиной цепи примерно 6 нуклеотидов), дезоксирибонуклеиновой и апуриновой кислот ультрафиолетовым светом. Такие волокна не удается получить из полиадениловой и полигуаниловой кислот, и весьма вероятно, что они возникают в результате фотохимически индуцированного образования поперечных 4(5)—4(5)-связей между индивидуальными олигонуклеотидными цепями, что в свою очередь приводит к образованию объемистых полимерных волокон [73, 74]. Такое поперечное связывание с образованием димера происходит при облучении ультрафиолетовым светом замороженных растворов тимина [75, 76]; дальнейшее облучение размороженного раствора вызывает быстрый распад димера с образованием тимина [77].



Для димеров тимина [78] были предложены различные структуры. В результате *цис*- и *транс*-расположения гетероциклических систем вокруг цикlobутанового кольца можно себе представить четыре изомера этого димера. Облучение замороженного водного раствора 1,3-диметилтимина дает два димера, которые можно разделить, причем один из них идентичен соединению, полученному исчерпывающим метилированием димера самого тимина [79]. Спектры ядерного магнитного резонанса не позволяют различить изомеры, так как протоны, присоединенные к атому C₄ пиримидиновых циклов, независимо от изомера в магнитном поле эквивалентны, и поэтому, даже когда C₄-положение является соседним, нельзя ожидать расщепления спинов [74]. Облучение смеси тимина и урицила дает смешанный димер [75].

Замороженные растворы тимина были использованы для опытов с облучением, целью которых была попытка выяснить свойства для тимина в «твердом состоянии» в нативной ДНК. Однако необходимо помнить, что успешное образование димера есть в основном результат укладки гетероциклов друг над другом в кристаллах моногидрата тимина. В случае других пиримидиновых оснований такая кристаллическая структура может и не образовываться. Облучение водных растворов ДНК приводит к необратимому разрыву водородных связей, а также к образованию устойчивых к нагреванию поперечных связей между двумя комплементарными полинуклеотидными цепями [80], которые препятствуют разделению цепей. Это было показано центрифугированием в градиенте плотно-

сти и по уменьшению степени гидролиза ДНК фосфодиэстеразой из *E. coli*.

Описано также поперечное связывание двух цепей в ДНК при действии азотистой кислоты * и бифункционального алкилирующего агента, *бис*-(β -хлорэтил)метиламина [81]. Такое образование поперечных связей приводит к полной обратимости свойств, возникающих у продукта при денатурации, даже у гетерогенной ДНК животного происхождения. Вероятно, точки поперечного связывания в двухтяжной структуре при процессах ренатурации играют роль центров, удерживающих смежные пары оснований. Так как образование поперечных связей под действием азотистой кислоты препятствует разделению комплементарных цепей, такой механизм может объяснить (помимо дезаминирования остатков, содержащих аминокислоты) мутагенную активность и, в особенности, ярко выраженный летальный характер азотистой кислоты [81].

ВЫВОДЫ

Общие свойства олигонуклеотидов указывают на то, что вторичная структура присуща не только полимерам с высоким молекулярным весом **. Ограниченное вращение вокруг межинуклеотидной связи заметно даже на динуклеотидном уровне, а при длине цепи $\sim 7-10$ нуклеотидов у олигонуклеотидов возникают специфические конформации, так как многие физические свойства либо начинают проявляться, либо достигают предела на этом уровне. Интересно, что у синтетических пептидов их критические размеры при образовании спирали, хотя и зависят от природы пептида, растворителя и температуры, равны 7—9 аминокислотам для пептидов γ -метил-L-глутаминовой кислоты в диметилформамиде при 25° [82].

Второй уровень организации появляется, когда вследствие образования спиральных структур происходит фактически полное ограничение подвижности оснований (по сравнению с олигонуклеотидами). Гипохромные эффекты, связанные с этим вторым уровнем организации, зависят от целостности структуры и поэтому могут изменяться с изменением таких внешних факторов, как температура и ионная сила, в противоположность гипохромности олигонуклеотидов, в то время как наибольшее увеличение ультрафиолетового поглощения происходит при предельных значениях pH вследствие разрушения структуры.

* Ср. [412] с действием азотистой кислоты на 5-аминоуридин (стр. 41).

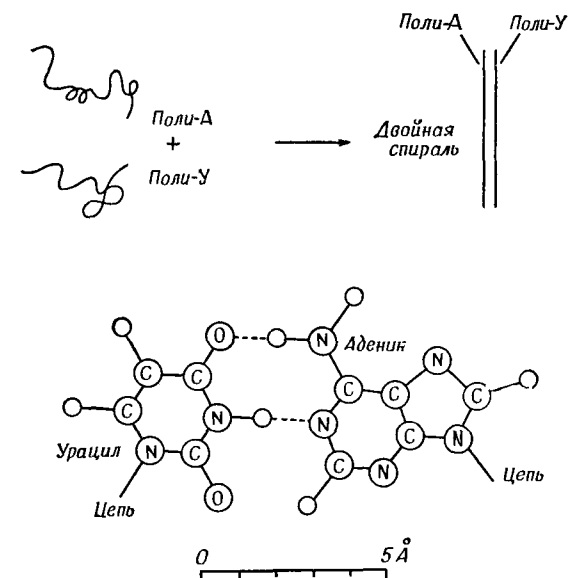
** Это, по-видимому, имеет значение при рассуждениях о химической природе жизни. Интерпланарные взаимодействия могут также играть важную роль в стабильности двухспиральных структур, как это следует из фактически одинаковых температур диссоциации ДНК и полностью дейтерированной ДНК в воде или в тяжелой воде [415, 416].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТАТИВНО СИНТЕЗИРОВАННЫХ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ

После открытия полирибонуклеотидфосфорилазы ряд полирибонуклеотидов стал доступен для изучения физическими методами. Так, полимеры (с молекулярным весом 10^5-10^6), синтезированные ферментативным путем, оказались весьма удобными моделями для изучения ряда свойств, имеющих непосредственное отношение к нуклеиновым кислотам. Хотя после этих работ сведения о характеристических физических свойствах полинуклеотидов сильно расширились, большое значение все же имели ранние исследования самих нуклеиновых кислот, а также развитая для ДНК концепция о существовании пар оснований, связанных водородными связями.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ПОЛИНУКЛЕОТИДНЫМИ ЦЕПЯМИ

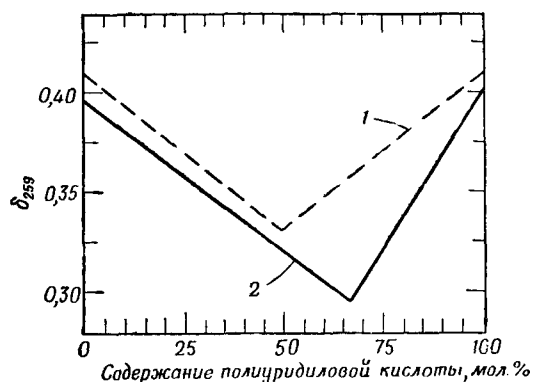
Если смешать эквимольные количества (в расчете на мононуклеотиды) полиуридиловой и полиадениловой кислот в разбавленном водном растворе при нейтральном pH, то образуется комплекс



Р и с. 8-6. Схема образования водородных связей в комплексе полиадениловой кислоты с полиуридиловой кислотой [84].

(рис. 8-6) с электрофоретическими свойствами, отличающимися от электрофоретических свойств гомополимеров [83]. Нити, выделен-

ные из этого препарата, обладают сильным отрицательным двойным лучепреломлением и дают рентгенограммы, очень похожие на рентгенограммы ДНК [84]. Детальное рентгенографическое исследование показало, что из цепочек двух полимеров образуется двухспиральная структура за счет водородных связей между остатками аденина и урацила. Так же как и в ДНК, на один виток спирали



Р и с. 8-7. Оптическая плотность при 259 мμ смесей полиадениловой кислоты с полиуридиловой кислотой [85].

1 — в отсутствие $MgCl_2$; 2 — в присутствии $1,2 \cdot 10^{-2}$ М $MgCl_2$.

приходится около десяти пар оснований, шаг спирали составляет 34 Å, а нуклеотиды уложены так, что плоскости оснований примерно перпендикулярны к оси цепи.

Взаимодействие полиадениловой и полиуридиловой кислот может быть проконтролировано по гипохромному эффекту, который обусловлен (косвенно) наличием водородных связей между комплементарными цепочками [85, 86]. Минимальное ультрафиолетовое поглощение, проявляемое при низкой концентрации катионов смесью, содержащей эквимольные количества двух полимеров, как раз и позволяет предположить, что в том случае, когда число остатков аденина равно числу остатков урацила, образуются новые комплексы с точной стехиометрией. Анализ результатов, полученных при ультрацентрифугировании двух гомополимеров и их комплекса, показал, что происходит образование нового агрегата, обладающего значительно более высокими константами седиментации, чем любой из двух компонентов.

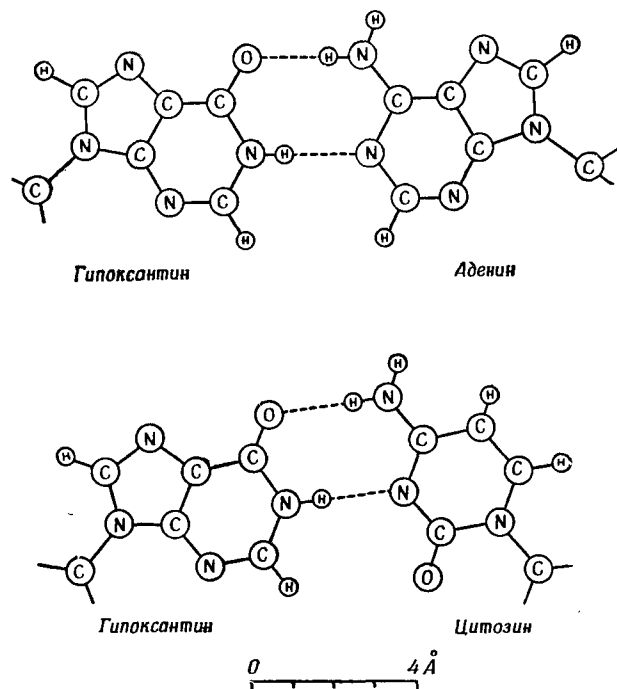
Высокая константа равновесия для этого взаимодействия, определенная из крутизны падения кривой оптической плотности (рис. 8-7), указывает на то, что в комплексообразовании принимает участие более 95% остатков [87]. Это наводит на мысль, что взаимо-

действие обратимо, и, действительно, эффекты, вызываемые изменением температуры, подтверждают это. Комплексы рассматриваются как длинные цепочки, состоящие из перекрывающихся молекул полиадениловой и полиуридиловой кислот, образующих двойную спираль, в которой остается очень мало зазоров и участков, не связанных водородными связями [87].

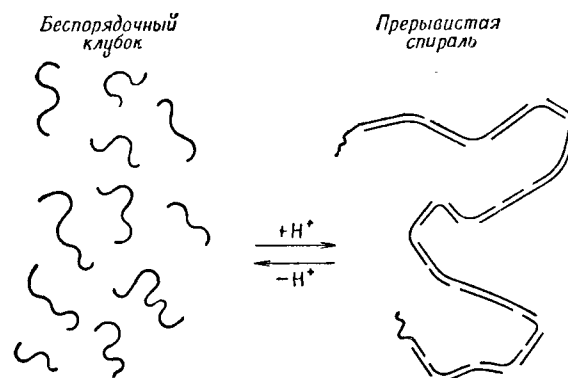
В присутствии двухвалентных катионов, в особенности магния, между полиуридиловыми и полиадениловыми кислотами легко образуется второй комплекс [88]. Изменение оптической плотности с изменением молярного соотношения двух полимеров вновь проходит через резкий минимум, что указывает на наличие стабильного комплекса. Однако этот минимум появляется при соотношении урацил: аденин, равном 2 : 1, а комплекс является трехцепочечным с константой седиментации примерно на 50% выше константы седиментации двухцепочечного комплекса. Третья цепочка полиуридиловой кислоты, по-видимому, заполняет глубокий спиральный желобок двойной спирали, замещая на этой поверхности молекулы воды и, таким образом, мало влияя на силы сцепления или факторы, определяющие форму комплекса. Вероятно, что второй остаток урацила в каждом триплете оснований присоединен к паре аденин — урацил в исходном комплексе посредством водородных связей между O^6 и N^1 урацила и 6-аминогруппой и N^7 аденинового остатка. Были получены рентгенограммы таких трехцепочечных комплексов, но их полный анализ пока не осуществлен [89].

Изучение кинетики образования трехцепочечного комплекса из смеси двухцепочечного полиаденилил-полиуридилового агрегата и полиуридиловой кислоты показало, что для двухвалентных катионов реакция имеет второй порядок, т. е. на каждый триплет приходится два катиона. Хотя такие катионы, как магний и марганец, заметно эффективны, они не являются уникальными, поскольку трехцепочечный комплекс образуется также и в растворах хлористого натрия достаточно высокой концентрации. Главная роль катионов, вероятно, заключается в понижении электростатического отталкивания между отрицательно заряженными фосфатными группами в трех полинуклеотидных цепях. Более высокая эффективность двухвалентных катионов по сравнению с одновалентными является, по-видимому, следствием различных констант диссоциации металлфосфатных солей.

Аналогичным путем доказано образование (рис. 8-8) двух- и трехцепочечных комплексов из полиадениловой и полиинозиновой кислот [90] и двухцепочечного комплекса из полиинозиновой и полицитидиловой кислот [91, 92]. Двух- и трехцепочечные агрегаты также образуются подобным путем из полириботимидиловой и полиадениловой кислот [89]; кроме того, описаны комплексы полигуаниловой и полицитидиловой кислот [93].



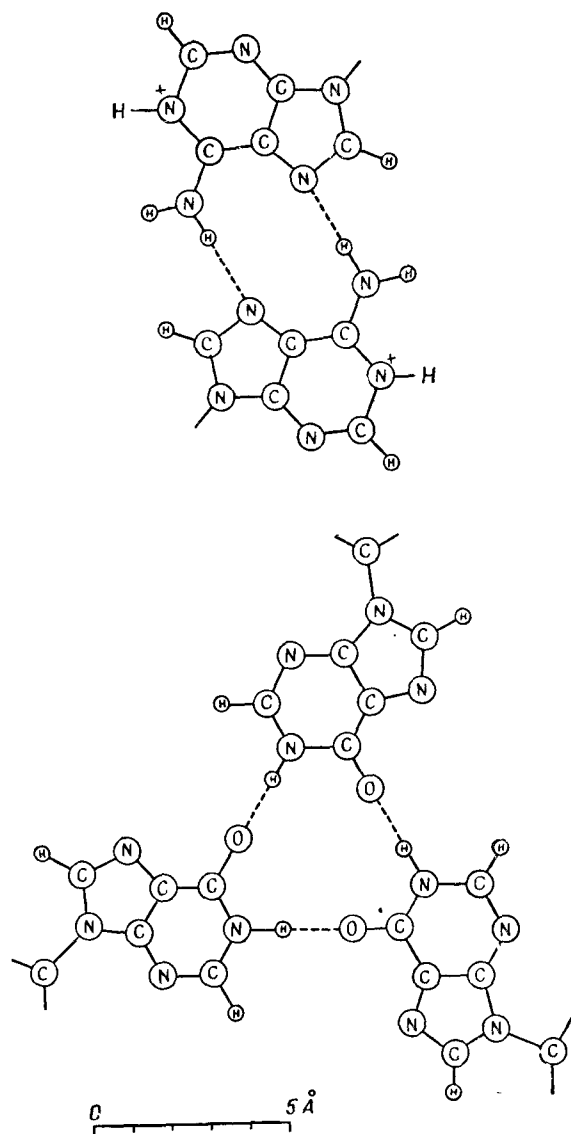
Р и с. 8-8. Схема образования водородных связей в комплексах полиадениловой и полиинозиновой кислот [90], а также полицитидиловой и полиинозиновой кислот [91, 92].



Р и с. 8-9. Схема перехода спираль — клубок для полиадениловой кислоты [94].

Помимо образования этих различных гетероцепочечных комплексов, некоторые гомополимеры могут в соответствующих условиях самоагрегировать. Отсутствие значительного двойного лучепреломления в потоке и возрастание вязкости, наблюдаемое при пониженной ионной силе, показывают, что в нейтральном растворе полиадениловая кислота обладает беспорядочно скрученной одноцепочечной конформацией (рис. 8-9) [94]. Однако в растворах с низкой ионной силой и при pH меньше 6,5 наблюдается резкий переход к упорядоченной конформации, выражающийся в уменьшении ультрафиолетовой адсорбции, увеличении веса частицы и появлении заметного отрицательного двойного лучепреломления в потоке [94, 95]. Изменения констант седиментации, вязкости и светорассеяния коррелируют с кривыми титрования, и эти данные показывают, что при протонировании аденинового остатка образуется относительно жесткий, прерывистый двойной спиральный агрегат из различного числа молекул адениловой кислоты. Так как аминогруппа аденина легко реагирует с формальдегидом, когда полимер находится в беспорядочно скрученном состоянии, но не тогда, когда образован содержащий водородные связи комплекс, вероятно, что агрегация является результатом спаривания адениновых оснований за счет водородных связей. Это подтверждается переходом от упорядоченной структуры к беспорядочному клубку в узком температурном интервале (приблизительно при 90° в 0,15 M растворе соли при кислых значениях pH); аналогичным образом ведет себя дезоксирибонуклеиновая кислота, что объясняется кооперативным разрывом водородных связей [94]. Спиральная структура исчезает также при очень низких значениях pH, по-видимому, в результате протонирования N⁷, приводящего к разрыву водородной связи [96].

Рентгенограммы растворов полиадениловой кислоты [97—99] при кислых значениях pH и комплексов в виде нитей характеризуются сильным меридиональным рефлексом при 3,8 Å и слоевой линией с периодом 15,4 Å. Эти результаты находятся в соответствии с моделью *аци*-формы полиадениловой кислоты (рис. 8-10), в которой рибозофосфатные цепи параллельны друг другу (в отличие от антипараллельной системы в ДНК) и локализованы на внешней поверхности молекулы с основаниями, связанными водородными связями между N⁷ имидазольного кольца и аминогруппой противоположного аденина. В соответствии с этим комплекс устойчив к азотистой кислоте [100]. Каждая пара оснований связана с последующей через трансляционное расстояние 3,8 Å и повернута на 45° , причем на один виток спирали приходится около восьми пар оснований. Кроме того, фосфатная группа притянута к оси агрегата водородной связью между атомами кислорода фосфатного остатка и аминогруппой адениновых оснований, что приводит к тому, что расстояние между плоскостями при укладке оснований становится



Р и с. 8-10. Схема образования водородных связей для полиадениловой кислоты в *аци*-форме [99] и в трехцепочечном комплексе полиинозиновой кислоты [101].

равным 3,8 Å, а не 3,4 Å, которое более характерно для гетерокомплексов. Можно заметить, что при pH 6,5 (предельное значение pH для стабильности комплекса) происходит присоединение протона к атому N¹ кольца аденина, а электростатические силы между положительно заряженными адениновыми остатками в противоположной цепи, создающие «внутренний солевой эффект», приводят к некоторой внутренней стабилизации двухспиральной структуры, что выражается в высокой температуре диссоциации комплекса [99].

Для растворов полиинозиновой кислоты также может быть осуществлен переход от беспорядочно скрученного состояния к упорядоченной спиральной конфигурации, и наоборот. При низкой концентрации соли или при предельных значениях pH константа седиментации полиинозиновой кислоты низка. Однако при высокой концентрации соли константа седиментации значительно возрастает, а ультрафиолетовое поглощение заметно понижается. Рентгенограммы ориентированных волокон (они обладают отрицательным двойным лучепреломлением), вытянутых из полимерных агрегатов, дают характерную для спирали дифракционную картину, обусловленную многотяжной структурой [101]. Двухцепочечная модель не соответствует данным рентгеноструктурного анализа (которые дают первую слоевую линию на расстоянии 9,8 Å в противоположность более распространенным интервалам 30—40 Å, в то время как вторая слоевая линия находится на расстоянии 5,2 Å, а третья интенсивная меридиональная слоевая линия — на расстоянии 3,4 Å), но эти данные вполне соответствуют трехтяжной модели, в которой три цепочки параллельны друг другу, а угол между остатками, следующими друг за другом, составляет 41,6°. Три гипоксантиновых остатка расположены вокруг оси вращения третьего порядка, а водородные связи образуют замкнутый цикл так, что кислород 6-кетогруппы пуринового кольца связан водородной связью с атомом N¹ соседнего пурина. Полиинозиновая кислота взаимодействует с полиадениловой лишь в том случае, если первая находится в форме беспорядочно скрученной одноцепочечной нити. Все упомянутые спиральные структуры являются обратимыми; их стабильность часто зависит от ионной силы, а область значений pH определяется условиями существования специфических таутомерных форм.

Изучение количественных инфракрасных спектров полинуклеотидов и комплексов, которые они образуют, в тяжелой воде свидетельствует о том, что пуриновые и пиримидиновые основания в этих соединениях и в мононуклеотидах имеют в каждом случае одни и те же таутомерные формы и что при взаимодействии не происходит смещения таутомерного равновесия. Однако при образовании полиаденилил-полиуридиловых и полицитидилил-полиинозиновых

комплексов происходит уменьшение интенсивности и смещение в область более высоких частот определенных полос в инфракрасных спектрах. В частности, интенсивность полосы при 1630 см^{-1} в двухцепочечных комплексах полиуридиловой и полиадениловой кислот уменьшается, а для трехцепочечного комплекса из двух полиуридиловых и одной полиадениловой (или тетраадениловой) кислот эта полоса как отдельный пик вообще исчезает. При повышенных температурах (выше точки тепловой денатурации) вновь появляется четко выраженный пик при 1625 см^{-1} [102]. Считают, что эти изменения являются косвенным результатом того, что водородные связи между полинуклеотидными цепочками вызывают смещение молекул воды и отсюда понижение локальной диэлектрической проницаемости [102]. Отмечены также аналогичные различия в инфракрасных спектрах моонуклеотидов и образованных из них гомополимеров, что, возможно, является результатом укладки пуриновых и пиримидиновых оснований в полинуклеотидную цепь [103].

При критической температуре (в области $50\text{--}90^\circ$) происходит быстрое возрастание поглощения ультрафиолетового света при нагревании растворов двух- и трехцепочечных гетерокомплексов и двухцепочечной полиадениловой кислоты в *аци*-форме, что указывает на разрушение упорядоченной структуры, в которой разрыв нескольких водородных связей понижает стабильность соседних пар оснований, связанных водородными связями. Изучение критических температур «плавления» различных спиральных комплексов делает доступным прямое измерение относительной стабильности «энергий связей», проявляемых различными типами пар оснований [104]. Такая информация может быть также получена при изучении изменения оптического вращения с изменением температуры [103].

Спиральные комплексы устойчивы к ферментативному фосфорулизу [83], в то время как менее упорядоченные или неупорядоченные структуры при определенных условиях разрушаются. Влияние водородных связей очевидно также из значительного смещения в кажущихся значениях pK оснований. Так, титрование эквимольного полиаденилил-полиуридилового комплекса ясно указывает на диссоциацию комплекса при $pH\ 10,4$ (которая сопровождается разрушением упорядоченной вторичной структуры при диссоциации протона, участвующего в водородной связи). В самой полиуридиловой кислоте диссоциация группы $\text{NH} - \text{CO}$ происходит при $pH\ 9,7$. Диссоциация трехцепочечного комплекса происходит в две различные стадии — при $pH\ 10,1$ и $pH\ 10,4$, что позволяет предположить, что вторая цепь полиуридиловой кислоты удерживается менее прочно, чем первая [105]. Аномальное поведение полиуридиловой кислоты при титровании, включающее очень быстрый захват протона при $pH\ 6,5$, упоминалось выше. Свободные моно-

нуклеотиды имеют относительное значение pK , равное приблизительно 3,8.

Представляют интерес и другие свойства индивидуальных гомополимеров. За исключением полиуридиловой кислоты, высокомолекулярные полимеры по сравнению с аналогичными олигонуклеотидами обладают значительно более высокими гиперхромными эффектами при деградации их до моонуклеотидов.

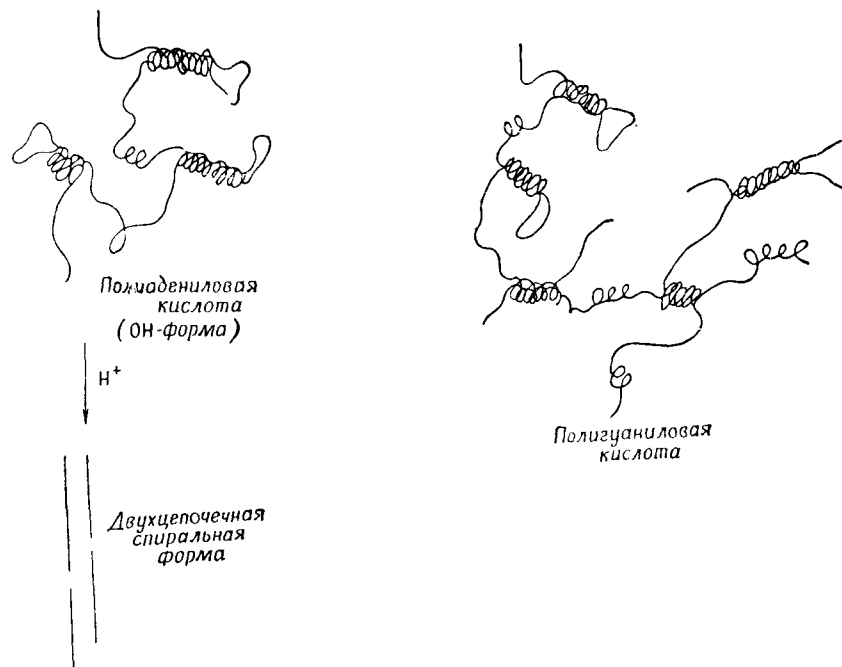
Так как величина гипохромного эффекта для этих гомополимеров (за исключением полиуридиловой кислоты) в значительной степени

Таблица 8-3

Кислота	Приблизительный гиперхромный эффект при $pH\ 7$, %
Полиадениловая [83]	54
Полицитидиловая [83]	40
Полигуаниловая [93]	32
Полиинозиновая [83]	62
Полириботимидиловая [106] . .	40
Полиуридиловая [83]	5 (получено также и более высокое значение 16% [107])

зависит от температуры, вероятно, что в одноцепочечных структурах имеется большое количество неупорядоченных водородных связей [83]. На случайную природу этих связей указывает изменение ультрафиолетового поглощения с изменением температуры. В отличие от относительно резких переходов, характерных для спиральных комплексов, состоящих из двух и более тяжелей, оптическое поглощение полиадениловой кислоты при $pH\ 7$ возрастает плавно и почти с постоянной скоростью в области выше 60° . Такое поведение свидетельствует о разрыве серии водородных связей, а не о кооперативном переходе [105]. Нерегулярная частично связанная водородными связями одноцепочечная структура со значительным количеством спиральных участков выявляется для полиадениловой кислоты также и из величины оптического вращения (меры упорядоченности спиральной структуры), которая, будучи меньше, чем величина оптического вращения таких двухспиральных агрегатов, как дезоксирибонуклеиновая кислота, полиаденилил-полиуридиловая кислота и *аци*-форма полиадениловой кислоты, превышает величину оптического вращения беспорядочно скрученных, не связанных водородными связями однотяжных цепей, таких, как полиуридиловая кислота [108, 109].

Спектры гомополимеров (за исключением полиуридилевой кислоты) претерпевают характерные изменения в концентрированных растворах мочевины, указывающие на частичный разрыв относительно слабых, более или менее случайных водородных связей. Ультрафиолетовое поглощение также является функцией ионной силы, и вполне возможно, что в некоторых случаях это может быть



Р и с. 8-11.

связано с подавлением эффективной ионизации фосфатных групп посредством образования ионных пар с уплотнением полинуклеотидной цепи вследствие понижения электростатического отталкивания между заряженными фосфатными группами [83, 110]. Это, вероятно, влияет на непосредственные межплоскостные взаимодействия и, вполне возможно, выражается также в изменении степени связывания водородными связями (рис. 8-11). В некоторых случаях, например для полиинозиновой кислоты, повышение ионной силы ведет к образованию многоцепочечных комплексов с соответствующим понижением ультрафиолетового поглощения. Можно заметить, что даже в бессолевых растворах полиинозиновая кислота обладает оптическим поглощением, которое возрастает при добавлении

мочевины (но понижается при добавлении солей). Это свидетельствует о том, что в этом случае (так же как и в случае химически синтезированных олиго- и полигуаниловых кислот) вторичные структуры, образованные водородными связями (случайными или какими-нибудь иными), могут легко возникать в отсутствие умеренной солевой среды. Ферментативно синтезированная полигуаниловая кислота сильно агрегирована в нейтральных растворах [93], и, действительно, это очевидно даже для химически синтезированных полигуаниловых кислот с длиной цепи примерно 10 нуклеотидов, что проявилось в их поведении при противоточном распределении и в большом сдвиге в значениях pK [22].

Получены доказательства существования спиральной структуры для полиуридилевой кислоты при пониженных температурах [111]. Так, в разбавленных солевых растворах при 2° наблюдается сильный гипохромный эффект: поглощение иногда уменьшается на 70% по сравнению с величиной, полученной для поглощения полимера при 23° . Одновременно происходит небольшой гипсохромный сдвиг максимума поглощения, который сопровождается значительным повышением оптического вращения (от $[\alpha]_D 11^\circ$ при 23° до $[\alpha]_D 290^\circ$ при $0,5^\circ$). Температура перехода, определенная по средней точке (т. е. при максимальной скорости изменения температуры), для изменений в ультрафиолетовом поглощении и оптическом вращении равна $5,8^\circ$.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КРАСИТЕЛЯМИ

Изучено взаимодействие синтезированных ферментативным путем полинуклеотидов с основными красителями, в частности с акридиновым оранжевым [112]. Обычно связывание красителей и конечные изменения в видимой части спектров поглощения могут зависеть от соотношения между имеющимися в наличии местами для связывания и количеством молекул красителя, а также от ионной силы среды. Можно ожидать, что при повышении температуры снижается степень связывания и, по-видимому, определение констант относительного связывания для различных красителей и гомополимеров может быть получено лишь при сравнении температур диссоциации, определенных в стандартных условиях.

В недавней работе, посвященной эффекту связывания небольших количеств акридинов (профлавин, акридиновый оранжевый или акридин) неденатурированной ДНК в растворах, было показано, что при этом могут происходить значительные структурные перестройки [113]. Вязкость заметно повышается, а седиментационный коэффициент уменьшается, в противоположность тому, что можно было бы ожидать из простой агрегации молекул красителя. Рентгенограммы нитей комплекса профлавин — ДНК свидетель-

ствуют о значительном изменении в двухспиральной структуре и о том, что по крайней мере для некоторых акридинов происходит сильное связывание в результате внедрения красителя между соседними плоскостями нуклеотидных пар путем растягивания и раскручивания дезоксирибозофосфатного стержня. Эффекты полностью

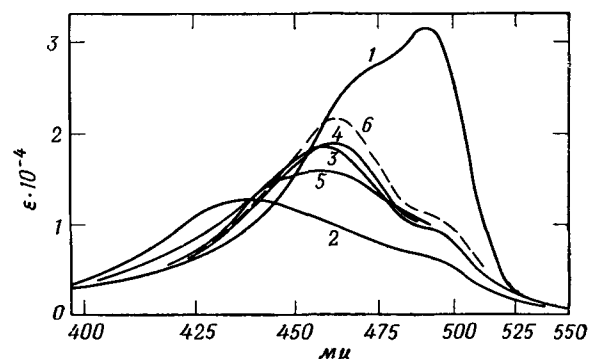


Рис. 8-12. Влияние полинуклеотидов [$3 \cdot 10^{-5}$ М (Р)] на спектр поглощения акридинового оранжевого ($3 \cdot 10^{-5}$ М) в 0,01 М ацетате аммония при рН 6,8.

1 — краситель; 2, 3, 4, 5, 6 — краситель + полиуридиловая, поли-5-хлоруридиловая, поли-5-бромуридиловая, поли-5-иодуридиловая и полиадениловая кислоты соответственно. Все полимеры были синтезированы ферментативным путем и обладали высоким молекулярным весом [125].

обратимы, и тот факт, что включение плоскости акридина происходит приблизительно в ту самую область, где находятся пурин-пиримидиновые пары оснований в двойной спирали ДНК, возможно, объясняет мутагенную активность некоторых акридинов [113]. Исследования рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами комплексами профлавинов — ДНК показывает, что изменения массы на единицу длины стержней и радиуса инерции как функции концентрации профлавина согласуются с механизмом процесса включения [114]. Этот тип прочного связывания, в котором на 2—5 пар оснований приходится до одной молекулы красителя, является, вероятно, существенным при взаимодействии красителей со спиральными комплексами, образованными ферментативно синтезированными полирибонуклеотидами.

Для акридинового оранжевого, связанного с нативной двухспиральной ДНК, также наблюдали аномальную дисперсию оптического вращения (рис. 8-12). Величина оптической активности, которой обладают такие комплексы (но не акридиновый оранжевый, связанный с денатурированной нагреванием беспорядочно скрученной ДНК), зависит от соотношения между красителем и нуклеотидом, и максимальный эффект Коттона (при $\lambda_{\text{макс}} 515$ мкм) проявляется

при соотношении одна молекула красителя на четыре молекулы нуклеотида (две пары оснований) [115]. При более высоком содержании красителя этот максимум замещается вследствие вторичного эффекта Коттона ($\lambda_{\text{макс}} 450$ мкм), величина которого возрастает вплоть до максимального связывания красителя (1 : 1).

Уменьшение ультрафиолетового поглощения, которым сопровождается взаимодействие полиадениловой кислоты с полиуридиловой кислотой, может быть использовано как мера связывания катионов полинуклеотидами, так как взаимодействие сильно зависит от ионного состава раствора. Используя этот метод, наблюдали сильное взаимодействие ионов магния с полиаминами, но не с аминокислотами [116]. Кондуктометрическое титрование показало, что связывание двухвалентных катионов полиаденилил-полиуридиловой кислотой происходит в том случае, когда на один фосфатный остаток приходится эквивалентное количество катиона. При добавлении полилизина образуется стехиометрически вполне определенный комплекс; в ходе реакции полилизин замещает эквивалентное количество двухвалентных катионов [117].

ГЕТЕРОПОЛИМЕРЫ

Изучены физические свойства сополимеров адениловой и уридиловой кислот [118, 119]. Титрование показывает, что рК урацила заметно смещено; в нейтральной же среде сополимеры проявляют большой гипохромный эффект. Нагревание или обработка формальдегидом приводят к увеличению ультрафиолетового поглощения и изменению поведения при титровании, и вероятно, что между остатками аденина и урацила существует сильное взаимодействие за счет водородных связей. Так как седиментационные и вискозиметрические измерения указывают на отсутствие изменений в молекулярном весе, можно думать, что эти водородные связи являются внутримолекулярными [118]. Исходя из физических свойств можно предположить, что в растворе сополимеры обладают компактной сильно скрученной структурой [120]. Однако они имеют упорядоченные спиральные участки, количество которых достигает максимума, когда сополимер содержит примерно равные количества остатков аденина и урацила, о чем можно судить по оптическому вращению образцов и гиперхромному эффекту при титровании в направлении значений рН, при которых большая часть остатков урацила ионизирована (что, предположительно, ведет к разрыву водородных связей и к потере упорядоченной структуры). Вообще, такие сополимеры обладают структурой, по-видимому сходной со структурой, предложенной для рибонуклеиновых кислот.

В тех случаях, когда двухцепочечные комплексы содержат эквимольные количества комплементарных и гомополимерных

остатков, имеет место максимальное взаимодействие между полиадениловой и полиуридилловой кислотами и сополимерами, содержащими различные количества двух нуклеотидов; некомплементарные основания или участки с несколькими основаниями, вероятно, укладываются в виде петель, выступающих из спирали [12]. Число неспаренных участков, допустимое для ДНК-подобной двойной спирали, довольно велико (30—40%), и имеющиеся данные позволяют предложить модель для РНК, состоящую из коротких спиральных участков с петлями, что создает третичную структуру, имеющую, по-видимому, определенное биологическое значение.

Описаны аналогичные исследования сополимеров адениловой кислоты и инозиновой или цитидиловой кислоты [122]. Постепенное введение инозиновых остатков в цепь полиадениловой кислоты приводит к исчезновению характерного структурного перехода при кислых значениях pH, снижению содержания спиральных участков, измеренному по ультрафиолетовому гипохромизму и оптическому вращению, и понижению температуры диссоциации комплекса с полиуридилловой кислотой. Оказалось, что с увеличением доли цитидиловой кислоты количество спиральных участков в сополимерах адениловой и цитидиловой кислот уменьшается в значительно меньшей степени. Оптическое вращение и зависимость гипохромного эффекта от температуры свидетельствует о значительном содержании спиральных участков также и в сополимерах цитидиловой и инозиновой кислот [123]. В противоположность этому оказалось, что сополимер уридилловой и инозиновой кислот по существу аморфен.

В отличие от полиуридилловой кислоты ее метилированный аналог — поли-N¹-метилуридилловая кислота (полученная ферментативным путем из N¹-метилуридин-5'-пирофосфата) — ни при каких условиях не образует спирализованной структуры, а также вообще не образует комплексов с полиадениловой кислотой [70]. Для вещества характерен 10%-ный гиперхромный эффект, который не может быть следствием наличия внутренних водородных связей. Сополимеры уридилловой и N¹-метилуридилловой кислоты проявляют черты вторичной структуры и могут образовывать комплексы с адениловой кислотой, что зависит от соотношения урацила и N¹-метилурацила в цепи. Этот результат вновь позволяет предположить, что метилурациловые остатки образуют петли, выступающие из упорядоченной комплементарно спирализованной структуры. Продукты гидролиза сополимеров рибонуклеазой соответствовали (качественно и количественно) по устойчивости к ферменту эфирам N¹-метилуридин-3'-фосфатов [70].

Описаны также гибридные полирибонуклеотид-полидезоксирибонуклеотидные комплексы. Тепловая денатурация ферментативно синтезированной двухцепочечной полидезоксидитидил-полидезо-

ксигуаниловой кислоты в присутствии полирибозитидиловой кислоты с последующей ренатурацией приводит к замещению полидезоксидитидиловой цепи и образованию значительно более устойчивого гибридного комплекса полирибозитидиловой и полидезоксигуаниловой кислот [69]. Помимо более высокой температуры диссоциации (на 18°), по данным равновесного центрифугирования в градиенте плотности новый комплекс имеет характеристическую плотность (1,86), более высокую, чем исходный комплекс (1,80). Более того, комплекс устойчив к гидролизу рибонуклеазой, дезоксирибонуклеазой или смесью этих ферментов.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В течение последних десятилетия представления о физических свойствах нуклеиновых кислот и интерпретация этих свойств с точки зрения размеров и конформаций макромолекул подвергались многочисленным изменениям. Последние достижения в этой области прояснили многие аспекты вторичной структуры, в особенности для дезоксирибонуклеиновых кислот.

МАКРОМОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Точная стереохимическая конфигурация для первичной ковалентной структуры нуклеиновых кислот как полимеров мононуклеотидов может быть выявлена с помощью методов рентгеноструктурного анализа. Первые рентгенограммы ориентированных нитей дезоксирибонуклеиновой кислоты показывали наличие сильного меридионального рефлекса при 3,4 Å, на основании чего заключили, что эти структурные характеристики указывают на направление укладки плоскости нуклеотидов примерно под прямым углом к оси нити [126, 127]. Кроме того, было ясно, что молекула имеет большую периодичность вдоль ее длины. Высокое отрицательное двулучепреломление ДНК также показывало, что молекулы имели большую длину и малую толщину [128], а поглощающие группы были ориентированы перпендикулярно к длинной оси. Это было подтверждено ультрафиолетовым дихроизмом (изменение поглощения с изменением направления электрического вектора излучения относительно плоскости или оси поглощающей системы) пленок ДНК, ориентированных растяжением [129]. Электрометрическое титрование дезоксирибонуклеиновых кислот показало, что если фосфатные группы могут быть оттитрованы обычным образом, то диссоциация аминогрупп и групп — NH — CO — протекает не

типично — очевидно, эти группы были замаскированы, если только нуклеиновая кислота не денатурировалась при этом из-за чрезмерно кислых или щелочных условий. Поэтому была выдвинута идея о наличии водородных связей между этими группами пуриновых и пиримидиновых оснований [130], а ДНК предложили рассматривать как агрегаты полинуклеотидных цепей [131], соединенных такими водородными связями. В соответствии с этим изменение вязкости (и двойного лучепреломления в потоке) с изменением pH говорило о дезагрегации тяжей на более мелкие субъединицы в пределах значений $\text{pH} < 5,6$ и $> 10,9$, непосредственно связанных с освобождением аминогрупп и групп $-\text{NH}-\text{CO}-$. При этих предельных значениях pH вязкость резко падала до очень низких величин по сравнению с теми, которые наблюдались для нейтральных растворов ДНК.

Рентгенографическое изучение кристаллической структуры цитидина показало также, что кольца гетероциклов и углевода фактически не копланарны, а почти перпендикулярны [132]. Были предложены соответственно видоизмененные одноцепочечные структуры для ДНК, в которых плоскости колец углевода были приблизительно параллельны длинной оси полинуклеотида [133]. Была рассмотрена также спиральная структура, включающая три скрученные нити с фосфатными группами, расположенными в центре, и радиально выступающими пуриновыми и пиримидиновыми остатками [134], но было найдено, что эта структура противоречит большей части имевшихся данных. Более совершенные рентгенограммы и изучение волокон дезоксирибонуклеатов натрия при различной влажности показали, что существуют две индивидуальные конформации — одна (при относительной влажности 75%), дающая четко выраженную ориентированную картину, характерную для кристаллической конформации, и другая (при более высокой влажности), дающая рентгенограмму, характерную для спиральных структур, обладающих более низкой степенью кристалличности [135]. Фосфатные группы как в кристаллической, так и в полукристаллической формах (которые обратимы) доступны для молекул воды и, следовательно, должны лежать на внешней поверхности структуры.

В 1953 г. Уотсон и Крик [136] предложили структуру для ДНК (рис. 8-13), которая находилась в соответствии с молярными соотношениями аденина и тимина, а также гуанина и цитозина, определенными из результатов анализа большого числа различных дезоксирибонуклеиновых кислот [137, 138] и не противоречила данным рентгеноструктурного анализа, накопившимся к тому времени [139—141]. Структура состоит из двух правых спиральных полинуклеотидных цепей (каждая закручена вокруг одной и той же оси), содержащих десять нуклеотидов на виток, с шагом

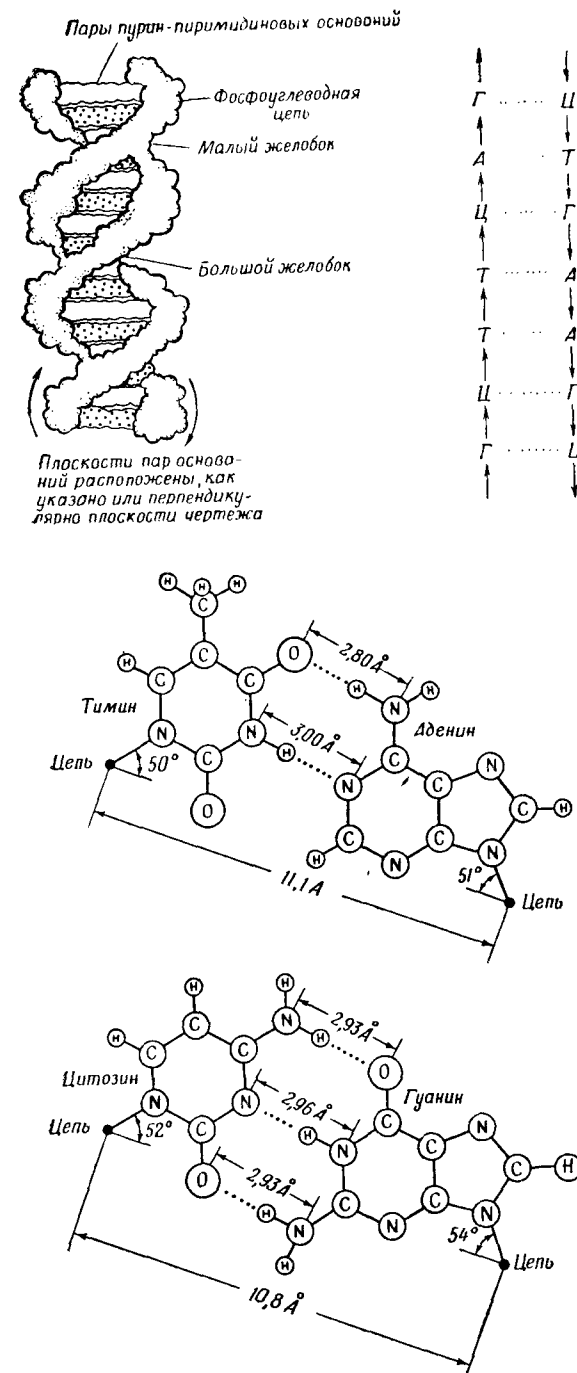


Рис. 8-13. Макромолекулярная структура двойной спирали ДНК [136, 139].

спирали 34 Å и диаметром 20 Å. Последовательность межнуклеотидных связей в двух цепях направлена в противоположные стороны (т. е. $3' \rightarrow 5'$ и $5' \rightarrow 3'$), но каждое пуриновое и пиримидиновое основание лежит перпендикулярно к оси спирали и связано водородными связями со специфическим комплементарным основанием в противоположной цепи, а именно аденин с тиминном, а гуанин с цитозином. Основания находятся внутри двойной спирали, фосфатные группы на внешней стороне, и вследствие специфического структурного соответствия вдоль всей оси нити достигается полная стереохимическая упорядоченность.

Более тонкие рентгенографические исследования [142—146] привели к незначительным изменениям первоначальной модели *, но ее основное положение в настоящее время хорошо доказано и применимо для многих препаратов ДНК. Нити солей ДНК со щелочными металлами дают разнообразные рентгенограммы, причем характер картины определяется металлом и относительной влажностью. Однако путем небольших изменений в основной структуре могут быть получены три различные, хотя и связанные между собой, конформации (которые и обуславливают три различные рентгенограммы). Так, форма «А» содержит 11,0 нуклеотидных пар (расположенных под углом 20° по отношению к перпендикуляр к оси нити) на один виток спирали, тогда как в форме «В» имеется 10,0 нуклеотидных пар (перпендикулярных к оси) на виток. В форме «С» литиевой соли ДНК шаг спирали изменен таким образом, что на 31 Å шага приходится около 9,3 пар оснований, а модель связана с формой «В» отклонением пар оснований примерно на 6° и смещением их на 1,5 Å вдоль пары таким образом, что узкий желобок становится более глубоким [146].

Детальное изучение инфракрасных спектров дезоксирибонуклеиновых кислот [147], включая использование ориентированных пленок ДНК и поляризованного инфракрасного света [148, 149], дало результаты, находящиеся в соответствии с конформациями, полученными при рентгенографических исследованиях. Полосы при 1680 и 1645 см^{-1} в растворе тяжелой воды, по-видимому, характеристичны для пар оснований, связанных водородными связями, так как при тепловой денатурации или при обработке нативной ДНК формамидом, щелочью или дезоксирибонуклеазой их интенсивность значительно понижается [150—152], а при 1660 и 1625 см^{-1} появляются новые полосы. Отмечен параллелизм в изменениях гиперхромизма при 1685 см^{-1} растворов рибо- и дезоксирибонуклеиновых кислот в тяжелой воде и аналогичных изме-

нений гипохромизма при 260 мμ при возрастании температуры [153]. Кривые зависимости обратной величины относительной интенсивности от температуры при 1685 см^{-1} имеют резкий переход для ДНК при приблизительно 85° ; для РНК это изменение растянуто от 30 до 70° . Наличие сильной полосы при примерно 1710 см^{-1} служит еще одним критерием, полученным из инфракрасных спектров, указывающим на спаривание оснований в нуклеиновых кислотах. Предполагают, что эта полоса является результатом переноса протона (от урацила или гуанина к аденину или цитозину), вызывающим локализацию электронов на связи $\text{C} = \text{N}$ [153]. Но это, по-видимому, маловероятно [405, 406].

Изучение с помощью ядерного магнитного резонанса показало [154], что молекулы воды, ассоциированные с ДНК в растворе, не образуют кристаллической решетки типа решетки льда [155, 156]; исследователи, которые ранее пришли к противоположным выводам, по-видимому, пренебрегали магнитной неоднородностью, вызванной слоями π -электронных систем. Суммарная гидратация молекул ДНК была изучена путем измерения диффузии молекул воды в растворах дезоксирибонуклеата натрия [157] и методом седиментационного равновесия в различных системах градиентов плотности [158]. Гидратация изменяется от 0,2 до 2 г воды на 1 г ДНК (т. е. от примерно 3 до 50 молекул воды на нуклеотид) в зависимости от растворителя [158]. В разбавленных солевых растворах ДНК, по-видимому, сильно гидратирована. Скорость дейтерирования литиевых и натриевых солей ДНК очень высока (требуется менее 2 мин для полного насыщения), и, следовательно, атомы водорода, участвующие в образовании водородных связей между основаниями, полностью доступны для протонов, а возможно, и для молекул воды [149].

Для препаратов рибонуклеиновых кислот не были получены рентгенограммы, строго сопоставимые с рентгенограммами ДНК, но это не исключает возможности существования спиральных структур (одно- или двухцепочечных) для этих полимеров; последние работы фактически свидетельствуют о том, что и в их структуре могут иметься значительные количества спирализованных упорядоченных участков (см. стр. 623). Следует также отметить, что не все дезоксирибонуклеиновые кислоты существуют в форме двойных комплементарных спиралей, так как описаны нативные препараты, которые состоят из одной цепочки (например, ДНК из бактериофага $\phi\text{X-174}$) [159]. Заметные морфологические отличия между двухспиральными дезоксирибонуклеиновыми и рибонуклеиновыми кислотами наблюдали с помощью электронной микроскопии [160, 161]. Дезоксирибонуклеиновые кислоты из ряда источников выглядят как гладкие тяжи с диаметром примерно 20 Å и длиной несколько микрон; денатурированные нагреванием образцы давали

* На основании цитируемых здесь работ Уилкинса и сотрудников была не только уточнена модель Уотсона — Крика, но и разработана окончательная трехмерная модель структуры ДНК. — *Прим. ред.*

аморфные обрывки. Рибонуклеиновые кислоты проявлялись как узловатые нити, в которых молекулы, по-видимому, закручены вокруг самих себя.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВЕС

Молекулярный вес нуклеиновых кислот можно определить рядом методов, такими, как седиментация в ультрацентрифуге, диффузия, характеристическая вязкость и светорассеяние [162]. Как константы седиментации, так и константы диффузии варьируют с изменением концентрации, и если принять во внимание несомненную гетерогенность [163, 164] многих препаратов нуклеиновых кислот, то точное реальное значение их молекулярного веса удастся определить довольно редко. Для дезоксирибонуклеиновых кислот с высоким молекулярным весом седиментационные и вискозиметрические измерения дают результаты примерно в 2—3 раза более высокие, чем значения, полученные методом светорассеяния, возможно, вследствие неприменимости теории светорассеяния к очень длинным палочкообразным молекулам [165]. Типичными величинами молекулярного веса дезоксирибонуклеиновых кислот являются $4 \cdot 10^6$ — $8 \cdot 10^6$, хотя в отдельных случаях были получены значительно более высокие значения. Действительно, результаты радиоавтографических измерений минимальной длины ДНК, выделенной из клеток *E. coli*, лизирующихся в чрезвычайно мягких условиях, указывают на то, что образец представляет собой комплекс длиной примерно 400 м, что соответствует молекулярному весу 10^9 и более [400].

Помимо обычных трудностей, присущих применяемым методам, истинные значения определяемых молекулярных весов и их связь с длинами цепей ДНК *in vivo* не могут быть легко определены вследствие легкого разрыва цепей крайне высокого молекулярного веса. Так, по существу монодисперсная ДНК была получена пропусканием раствора полимера через атомизатор. При этом денатурации не происходило, но молекулярный вес ДНК уменьшался, а распределение констант седиментации сужалось [166, 167]. Другие исследования влияния гидродинамического сдвига на ДНК показали, что в условиях перемешивания, которые обычно используются при выделении дезоксирибонуклеиновых кислот, легко происходит фрагментация ДНК путем разрыва двойной цепи, причем ее спиральная структура остается незатронутой [168—170]. Силы разрыва, вызывающие «разрезание» двойной спирали, были определены путем воздействия контролируемых сил гидродинамического сдвига на ДНК (меченную P^{32}) из бактериофага T2. Было найдено, что напряжение, созданное градиентом потока при критическом сдвиге, составляет приблизительно $11 \cdot 10^{-4}$ дин. Расчет показывает, что это напряжение сравнимо с прочностью связей

в ДНК (необходимо приблизительно $9 \cdot 10^{-4}$ — $18 \cdot 10^{-4}$ дин для того, чтобы разорвать одновременно обе цепи) [171]. Чем длиннее молекула, тем легче нарушается ее целостность при таких операциях, как перемешивание или отсасывание пипеткой. Аналогичная деградация протекает при обработке дезоксирибонуклеиновой кислоты ультразвуком [172—174]. Следовательно, молекулярный вес дезоксирибонуклеиновой кислоты *in vivo* может быть значительно выше, в особенности если между субъединицами ДНК имеются белковые мостики [175]. С другой стороны, существуют доказательства того, что уплотнение ДНК из зубной железы теленка в значительной мере стимулирует ее агрегацию, как, например, в осадках, полученных центрифугированием, при больших скоростях, а различные описанные в литературе молекулярные веса ($6 \cdot 10^6$, $12 \cdot 10^6$ или $18 \cdot 10^6$) могут отражать существование агрегатов, возможно артефактов, состоящих из субъединиц, имеющих по данным светорассеяния молекулярный вес $1 \cdot 10^6$ — $2 \cdot 10^6$ [176].

Недавно была изучена природа этой основной субъединицы для дезоксирибонуклеиновой кислоты, выделенной из *E. coli* [177]. Нуклеиновая кислота после экстрагирования и депротенинизации имела молекулярный вес $11 \cdot 10^6$ (светорассеяние). Нагревание вещества в растворе хлористого цезия снижало молекулярный вес до $5,6 \cdot 10^6$, в то время как обработка химотрипсином (или смесями хлороформ — октиловый спирт) давала полимер с молекулярным весом $2,4 \cdot 10^6$, который имел нормальную S-образную кривую зависимости оптической плотности от температуры с точкой перегиба при 92° . Нагревание этой последней нуклеиновой кислоты в хлористом цезии (7,7 М) понижало молекулярный вес до $1,3 \cdot 10^6$, но при этом образовывался двуцепочечный полимер, что было показано изучением кинетики ферментативного (дезоксирибонуклеаза II) гидролиза. В отсутствие обработки хлористым цезием тем же методом было показано наличие четырехцепочечных образцов, и, следовательно, можно было предположить, что исходная ДНК из *E. coli* представляет собой димер из параллельно связанных друг с другом двойных спиралей, причем каждая двойная спираль сохраняется незатронутой при делении клеток. Белковые связи, как, например, в агрегате с молекулярным весом $11 \cdot 10^6$, устойчивы к нагреванию в хлористом цезии, хотя эта обработка разрывает димеризующие связи между парами оснований в двухспиральных структурах [177]*.

* Белковые (пептидные) «сшивки» имеют, по-видимому, вообще большое значение для структурирования ДНК и дезоксирибонуклеопротеидов. Пептиды обнаружены в препаратах ДНК, выделенных из самых различных источников. Они связаны с полинуклеотидными цепями ковалентными связями. Пептидные мостики придают жестким двухтяжным молекулам ДНК необходимую гибкость, которая позволяет им укладываться в небольшом объеме. — Прим. перев.

При изучении понижения молекулярного веса под действием рентгеновского облучения как функции дозы рентгеновских лучей с использованием светорассеяния для определения молекулярного веса было получено дополнительное доказательство многоцепочечности ДНК [178]. В результате направленного воздействия были получены низкие значения для числа цепей, если принимали в расчет только минимальные величины. Так, для ДНК из зубной железы теленка $n = 1,5$, для ДНК из спермы морского ежа $n = 1,6$, но для ДНК из *Pneumococcus* было получено значение 3,2. (Кинетические исследования гидролиза дезоксирибонуклеазой II дали для этой же нуклеиновой кислоты $n = 4,2$ [179].) Эти результаты подтверждают вывод о том, что ДНК, выделенная из покоящихся клеток, имеет форму двойной спирали, тогда как ДНК из размножающихся клеток состоит из попарно связанных двойных спиралей [178, 180]. Наличие четырехтяжной структуры у ДНК из *Pneumococcus* в значительной мере подтверждается электрономикроскопическими исследованиями [181] как морфологии частиц, так и сравнением средневесового молекулярного веса ($1,6 \cdot 10^6$ на основании светорассеяния) со средневесовой длиной (4300 Å). Последний метод дает значение массы на 1 Å, равное 370, т. е. приблизительно вдвое большее, чем то, которое можно ожидать для двойной спирали (208). Электронные микрофотографии показывают также, что две двойные спирали не переплетены, а лежат одна возле другой [181].

Дополнительные подтверждения этой концепции были получены при изучении ДНК, выделенной из синхронизированной культуры мутанта *E. coli*, нуждающегося в тимине, в различные моменты времени. Вначале ДНК была четырехцепочечной и не отличимой от ДНК из клеток *E. coli*, находящихся в логарифмической фазе роста, но в момент начала синтеза ДНК ее молекулярный вес был вдвое меньше, а ДНК была двухцепочечной и обладала свойствами нативной двухспиральной ДНК, выделенной из покоящихся клеток. Отсюда был сделан вывод о том, что при репликации родительского четырехцепочечного комплекса спираль распадается наполовину, а при репликации двухспирального комплекса она сохраняется полностью [182].

Описана также ферментативная деградация ДНК на субъединицы. ДНК из зубной железы теленка (молекулярный вес $6,5 \cdot 10^6$), так же как и ДНК из эритроцитов цыпленка (молекулярный вес $8,0 \cdot 10^6$), разрушается экстрактами из эритроцитов до субъединиц с молекулярным весом $5,5 \cdot 10^5$. При этом не образуется никаких диализующихся продуктов, а в поглощении при 260 мμ существенных изменений не было отмечено [183]. Изучение гидролизата методом светорассеяния показало, что субъединицы имели форму палочек с молекулярным весом 200 ± 20 на единицу длины (Å), что находилось в хорошем соответствии с двухспиральной моделью.

Следовательно, субъединицы обладали более высокой степенью асимметрии, чем исходная ДНК (которая, находясь в свернутом состоянии, несомненно, отличается от субъединиц), а гибкие соединения (белок или неспаренные участки последовательности оснований) в надструктуре ДНК могут быть местом действия фермента. Кинетика ферментативного гидролиза указывает на одноцепочечный разрыв с образованием этих субъединиц (без индукционного периода), которые затем ведут себя как двухцепочечные молекулы [184].

Изучен молекулярный вес ДНК из бактериофага Т2. Скорость седиментации и другие свойства ДНК, выделенной без механического разрушения (избегая быстрого перемешивания, отсасывания пипетками и других операций, приводящих к гидродинамическому сдвигу), дали величину молекулярного веса $50 \cdot 10^6$ — $120 \cdot 10^6$ [185]. Анализ радиоавтограмм бактериофага, меченного P^{32} , или ДНК из вируса показал, что ДНК в каждой частице представляет собой единое структурное целое [186] и имеет форму неразветвленной палочки длиной примерно 52 м, что соответствует молекулярному весу $110 \cdot 10^6$ [187]. Дальнейшее развитие «молекулярного автордиографического метода» дало наиболее изящный метод для определения молекулярного веса [188]. Молекулы ДНК вкрапчивали в эмульсию, чувствительную к радиации; β-частицы, возникающие при распаде P^{32} , дают треки, которые, расходясь из точки, где находился источник, образовывали вспышки. Расчет среднего числа треков на вспышку давал число атомов P^{32} на частицу, и, следовательно, из специфической активности использованного фосфора можно было рассчитать общее содержание фосфора на молекулу ДНК. Этим путем было показано, что бактериофаг Т2 содержит одну единственную молекулу ДНК*, натриевая соль которой имеет молекулярный вес $130 \cdot 10^6$ — $160 \cdot 10^6$.

Контролируемое перемешивание растворов этой ДНК при различных скоростях дает продукты первого и второго уровней деградации со средним молекулярным весом, составляющим половину или четверть от исходного. Сравнение молекулярных весов, определенных описанным выше методом, а также по седиментационным и гидродинамическим свойствам показало, что последние методы давали результаты, которые были ниже более чем в 2 раза [188].

Из кристаллического цитохрома b_2 была выделена ДНК небольшого размера [189, 190]. Молекулярный вес ее равен примерно 10 000 (т. е. ДНК состоит приблизительно из 30 нуклеотидов), эта ДНК может служить подходящим исходным веществом для

* Бактериофаг Т3 также содержит одну неразветвленную молекулу ДНК, но с молекулярным весом (определенным методом электронной микроскопии) [411], равным $49 \cdot 10^6$.

определения последовательности нуклеотидов в природных дезоксирибонуклеиновых кислотах. Различные свойства ДНК (кривая плавления, влияние ионной силы на ультрафиолетовое поглощение, взаимодействие с формальдегидом и с диэстеразой *E. coli*, осаждение ионами свинца) показывает, что она состоит из одной цепочки [390].

Как и в случае дезоксирибонуклеиновых кислот, имеется ряд примеров изучения молекулярного веса рибонуклеиновых кислот. Наиболее изученной рибонуклеиновой кислотой является, по-видимому, РНК из вируса табачной мозаики; она имеет молекулярный вес $1,94 \cdot 10^6 \pm 0,16 \cdot 10^6$ по данным светорассеяния, седиментации и вискозиметрических измерений [191]. При растяжении или сжатии молекулы под действием тепла, а также при изменении ионной силы инфекционность РНК не изменяется, если ее молекулярный вес при этом не уменьшается. Вирус желтой мозаики турнепса (сферический вирус) также содержит высокомолекулярную РНК (приблизительно $2,3 \cdot 10^6$) [404], а многие из выделенных клеточных РНК имеют молекулярный вес $1 \cdot 10^6$ — $2 \cdot 10^6$ [192]. Как это было неоднократно показано, клеточные РНК состоят из двух основных компонентов, причем один из них имеет такой же высокий молекулярный вес, а молекулярный вес другого компонента составляет $3 \cdot 10^5$ — $7 \cdot 10^5$ *. Еще более низкий молекулярный вес найден для «растворимых» или транспортных РНК, которые содержат только 60—100 нуклеотидов.

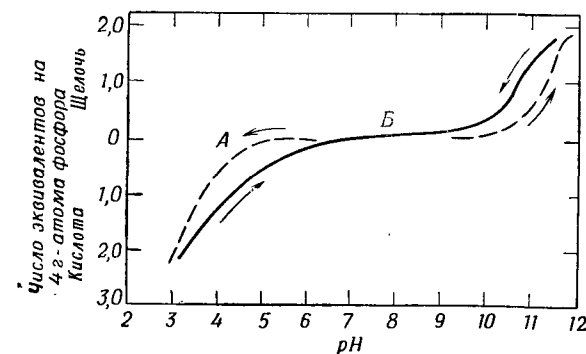
ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Первые результаты титрования ДНК [193, 194] и сделанные на основании их выводы можно в основном не принимать во внимание, поскольку использовались сильно деградированные нуклеиновые кислоты, хотя при этом и были получены некоторые указания на фактическое отсутствие вторичной диссоциации фосфатных групп (рК от 6 до 7) [195, 196]. Кривые титрования нативной дезоксирибонуклеиновой кислоты в прямом и обратном направлении (рис. 8-14) не идентичны, причем последующее титрование в обратном направлении, начиная с высоких или низких значений рН (от рН 12 или 2,5), дает кривые, которые смещены в направлении ней-

* Автор имеет в виду рибосомальные (микросомальные) РНК. Интересно, что сумма молекулярных весов большего и меньшего компонентов рибосомальных РНК, независимо от источника выделения, равна $1,7 \cdot 10^6$.—Прим. перев.

тральных значений рН при обычных условиях титрования [197—200]. Эти гистерезисные эффекты, возникающие в результате действия кислоты или щелочи на ДНК в очень мягких условиях, приписывались разрушению водородных связей в макромолекуле [200—202]. Однако при низких температурах ($-0,75^\circ$) титрование диссоциирующих групп, т. е. $-\text{CO}-\text{NH}-$ и аминок групп или циклических атомов азота в пуриновых или пиримидиновых основаниях, становится полностью обратимым [203—205]. Хотя ранее и было показано [200, 202], что кривые титрования денатурированной



Р и с. 8-14. Титрование ДНК из спермы сельдя при 25° (μ 0,05). А — титрование в прямом направлении; Б — титрование в обратном направлении [204].

ДНК в обратном направлении, начиная от высоких или низких значений рН, не совпадают, при использовании методов быстрого титрования установлено, что эти процессы полностью обратимы [201, 203—205].

Если титрование ДНК от нейтральных значений рН до рН 2,6 и в обратном направлении при 25° приводит к необратимому разрушению двухспиральной структуры, связанной водородными связями, как это ясно из гистерезиса, то при титровании до промежуточных значений рН получается ряд обратных кривых, из которых могла быть рассчитана доля разорвавшихся водородных связей [206]. Если происходит разрыв водородных связей только на 10—15%, то они могут заново образоваться при возвращении к нейтральным значениям рН, но разрушение водородных связей на 75% или более приводит к возникновению нестабильной структуры, которая быстро разрушается до беспорядочной денатурированной формы. Тепловая денатурация может сопровождаться также прогрессирующим смещением кривых при титровании в прямом направлении от рН 7 до 3. Быстрый необратимый разрыв водородных связей происходит при температуре выше 75° , а смещение кривых титрования

денатурированной ДНК совпадает с увеличением ультрафиолетового поглощения, которое находится в линейной зависимости от числа разрушенных водородных связей [207, 208]. Ионная сила оказывает влияние на обратимое электрометрическое титрование как нативного, так и денатурированного дезоксирибонуклеата натрия, причем кривые полностью смещаются в сторону более низких значений рН с увеличением концентрации соли [201].

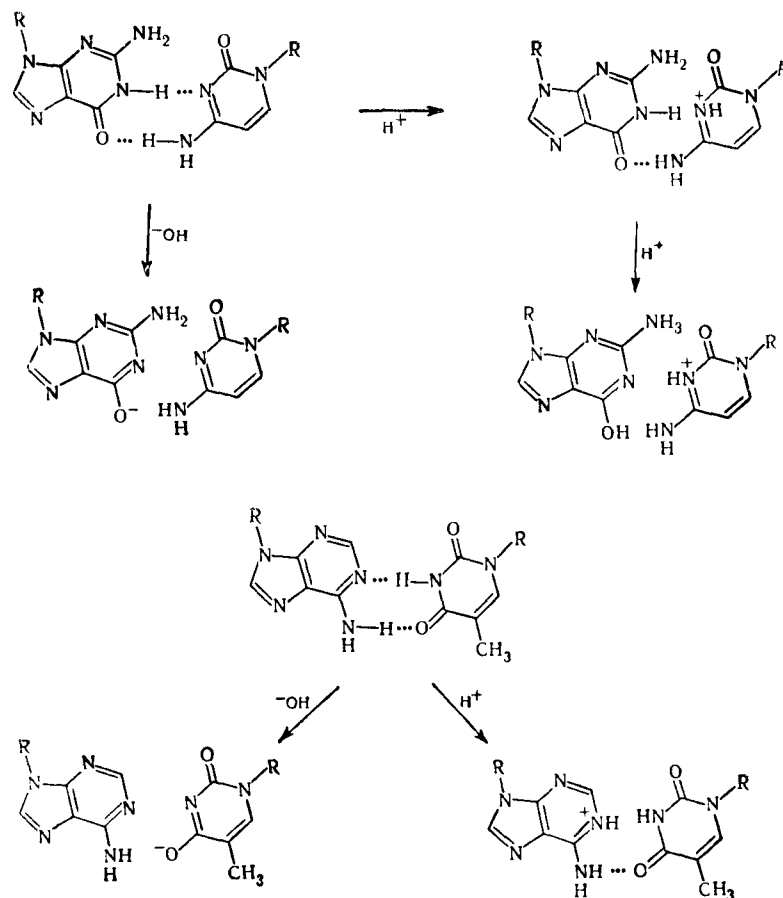
Влияние ионной силы на кажущиеся константы диссоциации гетероциклических оснований в ДНК легко проследить путем спектрофотометрического титрования [208—210]. В 0,01 М растворе хлористого натрия титрование ДНК кислотой приводит к резкому и необратимому увеличению оптического поглощения при рН 3,3, но в 0,1 М растворе хлористого натрия этого не происходит вплоть до рН 2,4. Такое увеличение оптического поглощения связано с протонированием остатков гуанина [209, 210]. Можно заметить, что кажущееся значение рК у оснований в ДНК сильно смещено относительно значений рК соответствующих мононуклеотидов [200, 209]. Зависимость этого смещения от ионной силы среды показана в табл. 8-4 [209].

Таблица 8-4

		Кажущиеся значения рК			
		в H ₂ O	в 0,01 М NaCl	в 0,1 М NaCl	мононуклеотида
Цитозин	Диссоциация основания	6,0	5,2	3,8	4,2
Гуанин	Диссоциация основания	4,0	3,7	2,7	2,4
Гуанин	Группа —NH—CO—	11,6	[<11,6	[<11,6]	9,3
Тимин	Группа —NH—CO—	11,6	[<11,6	[<11,6]	9,4

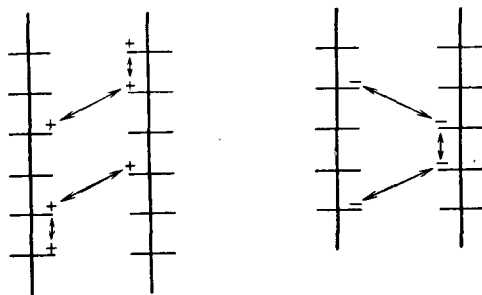
Как видно из смещения кривых электрометрического титрования при денатурации, значения рК оснований в денатурированной ДНК более близки к значениям рК мононуклеотидов, но, кроме того, являются функцией ионной силы. Диализ растворов ДНК против воды понижает рН до 2,6 и сопровождается денатурацией [211]. Разбавление [212, 213] или понижение ионной силы [210, 214] (диализом или другими способами) при рН 6,5 (но не при рН 8,0) приводит к денатурации вследствие смещения значений рК при низкой ионной силе [210]. На основании изменений значений рК с изменением ионной силы был сделан вывод, что эффекты внутреннего поля, обусловленные близким соседством заряженных фосфат-

ных групп в структурах, связанных водородными связями (возможно, в агрегатах двухспиральных структур), вызывают повышение значений рК присутствующих аминогрупп, в результате чего эти группы протонируются при низкой ионной силе, а водородные связи легко разрываются [209, 210].



При высокой ионной силе этот эффект, по-видимому, проявляется отчетливо благодаря защитному влиянию диссоциирующих фосфатных групп. Растворение нуклеиновой кислоты в концентрированном растворе (6 М) мочевины (которую обычно рассматривают как вещество, разрывающее водородные связи) повышает значение рН, при котором при любой данной температуре происходит кислотная денатурация [208].

Так как при подкислении необратимая денатурация происходит почти исключительно при тех значениях pH, при которых протонируются гуаниновые остатки, ясно, что протонирование остатков аденина или цитозина (возможно, по N₁-положению) [208, 215] не обязательно ведет к разделению двух цепей ДНК. Можно ожидать, что ионизация основных групп и тепловые эффекты при денатурации протекают совместно [201, 208], так как для того, чтобы вызвать денатурацию при повышенных температурах, необходимо меньше кислоты. Объяснение необратимой кислотной денатурации ДНК позволяет предположить, что протонирование гуаниновых остатков сопровождается таутомерным смещением от 6-кето- к 6-оксипурины с разрывом обеих водородных связей в гуанин-цитиновой паре [216]. Такое таутомерное смещение (рис. 8-15)



Р и с . 8-15.

может происходить независимо от начального места протонирования гуанинового остатка в ДНК, но в любом случае можно ожидать наличия электростатического отталкивания между протонированными гуаниновыми и цитозиновыми остатками.

Можно заметить, что при протонировании адениновых и цитиновых остатков (которое может происходить до протонирования гуанина) все же остается незатронутой одна водородная связь на одну пару оснований; следовательно, протонирование гуаниновых остатков является фактором, определяющим кислотную денатурацию. В отсутствие сил электростатического отталкивания между соседними заряженными основаниями в одной или в противоположных цепях протонирование аденина и цитозина должно увеличивать прочность соответствующих водородных связей, как и в общем случае протонирования аминов [217]. Может оказаться, что такие силы отталкивания, вызывающие отклонение и вторичную диссоциацию оснований, фактически играют важную роль в процессах кислотной или щелочной денатурации (ср. со свойствами синтетических олигонуклеотидов).

Депротонирование гуаниновых и тиминовых остатков в щелочной среде непосредственно приводит к разрыву только одной водородной связи. Однако вероятно, что таутомерное смещение, сопровождающееся ионизацией 6-кетогрупп, вызывает разрыв всех водородных связей. Кроме того, увеличение электростатического отталкивания между заряженными фосфатными группами при щелочных значениях pH, вероятно, ослабляет спиральную структуру.

Таким образом, процессы денатурации ДНК при действии кислот или щелочей в мягких условиях укладываются в общую структуру Уотсона и Крика. Некоторые водородные связи могут разрываться обратимо до начала денатурации (т. е. до разрушения двойной спирали), которая начинается, когда разрушено критическое число этих связей, — число, зависящее от температуры, ионной силы и природы растворителя [208]. Свойства растворов полимеров указывают на существенное взаимодействие между молекулами при понижении [211] pH до 2,6; аналогичный переход наблюдается при pH 11,7—11,9 [218]. ДНК, денатурированная таким путем, рассматривается как полимер, состоящий из беспорядочно переплетенных, очень подвижных цепей, содержащих ряд беспорядочно расположенных водородных связей (неразрушившихся или заново образовавшихся), со значительной свободой вращения на протяжении достаточно длинных участков цепей. В результате наличия упорядоченной структуры молекула нативной ДНК сильно вытянута и относительно жесткая (хотя она и может подвергаться слабому неупорядоченному скручиванию) [218]. В случае ДНК, денатурированной щелочью, понижение ионной силы среды сопровождается очень сильным растяжением молекулы, по-видимому вследствие отталкивания между высоко заряженными фосфатными группами. В противоположность этому конформация нативной ДНК относительно устойчива к изменениям ионной силы среды (в известных пределах) [218].

РИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Электрометрическое титрование бактериальной рибонуклеиновой кислоты также указывало на присутствие водородных связей, поскольку при этом наблюдался гистерезисный эффект при прямом и обратном титровании [219]. При этом заметного количества вторично диссоциирующих фосфатных групп обнаружено не было. Интерпретация [220] результатов титрования дрожжевой РНК, которая указывала на присутствие трех аминогрупп, двух групп —NH—CO—, одной вторичной и трех первичных фосфатных групп, представляет лишь исторический интерес.

СВОЙСТВА ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РАСТВОРЕ

ВЯЗКОСТЬ

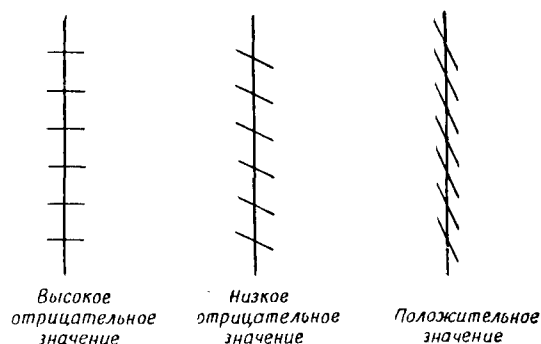
Уменьшение вязкости нейтральных растворов дезоксирибонуклеатов натрия при добавлении солей [221—223] может быть следствием экранирования заряженных фосфатных групп, что вызывает более сильное скручивание молекулы; кроме того, при этом, по-видимому, происходит небольшое сжатие всей двойной спирали. В растворах с очень низкой ионной силой макромолекула полностью вытянута за счет отталкивания диссоциированных остатков фосфорной кислоты [224]. На основании изменений вязкости при очень низких скоростях сдвига [225] (что позволяет экстраполицию к нулевому сдвигу) и изменений двойного лучепреломления в потоке с изменением ионной силы [226] была высказана противоположная точка зрения. Эти результаты позволяют предположить, что при добавлении солей сжатия молекулы не происходит, а изменение вязкости обусловлено электростатическим взаимодействием между ионами нуклеатов, которое уменьшается при повышении концентрации катионов [225]. Однако результаты многих из этих ранних исследований недостоверны, так как для работы использовалась ДНК, по крайней мере частично денатурированная при растворении ее в бессолевых средах. Изучение светорассеяния [227, 228], измерение дихроизма [210] и характеристической вязкости нативной ДНК в 10^{-3} М и 0,2 М растворах хлористого натрия [210] подтверждает тот факт, что ДНК может деформироваться, но уменьшение длины молекулы с увеличением ионной силы довольно мало и не сравнимо с тем, которое наблюдается у типичных полиэлектролитов или у денатурированной ДНК. В самом деле, из многих опытов могут быть рассчитаны изменения в гидратации двухспиральной ДНК при различных значениях ионной силы. Кривые изменения вязкости показывают, что зависящие от концентрации взаимодействия проявляются более резко при более низких значениях ионной силы. Остаточные взаимодействия, проявляющиеся в 1 М растворе хлористого натрия, по-видимому, являются результатом действия гидродинамических факторов, связанных с гибкостью структуры. Денатурация ДНК (кислотой, щелочью или нагреванием) сопровождается 10-кратным понижением характеристической вязкости и приблизительно 3-кратным понижением радиуса вращения (от 2600 до 900 Å) без значительных изменений в молекулярном весе (светорассеяние) [218]. Пониженная удельная вязкость денатурированной ДНК зависит от ионной силы в значительно большей степени, чем вязкость нативных препаратов [218]. В растворах с более низкой ионной силой также существенно возрастает радиус вращения молекулы. Со многих точек зрения, эти результаты легче

всего объяснить, если базироваться на слегка скрученной двухспиральной структуре нативной ДНК, так как сжатие двухцепочечной спирали должно быть ограничено (вследствие природы самой структуры), но это сжатие могут претерпевать молекулы с более жесткой структурой (двойное лучепреломление в потоке при этом возрастет), что мало отражается на средней длине макромолекулы вследствие уменьшения степени скрученности. Значительно больших деформаций можно ожидать для денатурированных ДНК. Слабую скрученность нативных ДНК можно предположить, кроме того, изучая длину молекул в растворе. По данным двойного лучепреломления в потоке [229] и светорассеяния [228, 230, 231], она равна приблизительно 6000—8000 Å. Так как размеры абсолютно жесткой двойной спирали с молекулярным весом $8 \cdot 10^6$ равны $40000 \text{ Å} \times 20 \text{ Å}$, ясно, что в водных растворах имеет место определенная степень скрученности молекул, что приводит к образованию значительно менее асимметричных частиц [227, 230].

ДИХРОИЗМ В ПОТОКЕ

Величина поглощения поляризованного ультрафиолетового света циклическими пуриновыми и пиримидиновыми системами достигает максимального значения, когда электрический вектор находится в плоскости цикла, и минимальна, когда он перпендикулярен плоскости системы. Дихроизм, выражаемый как оптическое поглощение при электрическом векторе, параллельном плоскости структуры, минус оптическое поглощение при векторе, перпендикулярном к структуре, может, таким образом, в зависимости от отношения молекулярной структуры к поглощающей системе быть величиной как положительной, так и отрицательной (рис. 8-16). Отношение этих двух величин оптического поглощения обычно называют дихроическим отношением. Дезоксирибонуклеиновая кислота из зубной железы, ориентированная растяжением, характеризуется отрицательным ультрафиолетовым дихроизмом [129], а для ориентированных пленок, приготовленных из вязкого геля [232], дихроические отношения составляют от 1,7 до 4,7. Влажность (а отсюда и гидратация образцов) заметно влияют на дихроизм ДНК, причем с повышением влажности до 93% были получены более высокие значения дихроических отношений. Эта зависимость может быть сопоставлена с различными конформациями ДНК, выявленными с помощью рентгеноструктурного анализа, и, таким образом, она отражает поворот плоскостей пуриновых и пиримидиновых оснований относительно оси спирали. Максимальный дихроизм проявляется тогда, когда плоскости перпендикулярны к этой оси; отклонение оснований понижает дихроизм [233].

В потоке растворов ДНК ее макромолекулы ориентированы, что весьма существенно для измерения дихроизма. Если молекулы полностью ориентированы, то дихроизм нативной ДНК в потоке непосредственно зависит от угла наклона плоскостей поглощающих структур к направлению потока [234, 235]. Измерения оптического поглощения растворов ДНК, беспорядочно ориентированной (в состоянии покоя) и ориентированной в потоке, с использованием излучения с длиной волны 260 мк, поляризованного параллельно направлению потока, показывают, что дихроизм зависит от ионной силы



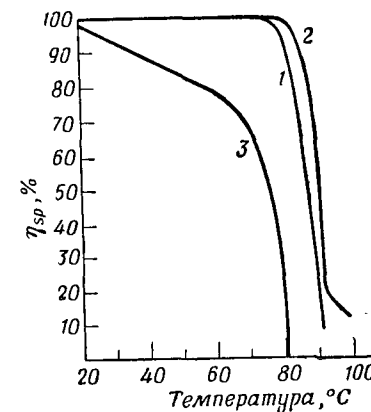
Р и с. 8-16. Ультрафиолетовый дихроизм.

раствора, причем в 10^{-3} М растворе хлористого натрия он выше, чем в 0,2 М растворе. Эти результаты позволяют предположить, что слабая скрученность нативной ДНК уменьшается в растворах с низкой ионной силой (благодаря отталкиванию между свободными фосфатными группами) и повышается в растворах с более высокой ионной силой, хотя определенное значение могут иметь также изменения угла наклона плоскости оснований к оси молекулы. Для денатурированных ДНК никакого дихроизма в потоке не наблюдалось, что и следовало ожидать для беспорядочно скрученной структуры, которая должна препятствовать ориентации в потоке. Уменьшение дихроизма происходит параллельно с процессом денатурации, например кислотной денатурации, но опережает возрастание оптической плотности, и, таким образом, этот метод более чувствителен для изучения ранних стадий денатурации. Это, вероятно, определяется увеличением скрученности двойной спирали при присоединении нескольких протонов к основным дезоксирибонуклеотидам, так как нарушение планарной упаковки оснований должно было бы немедленно выразиться в изменениях ультрафиолетового поглощения. Измерения вязкости также показывают, что в начальные

моменты денатурации происходит увеличение гибкости молекулы ДНК, которое опережает увеличение ее ультрафиолетового поглощения.

ТЕПЛОВАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ

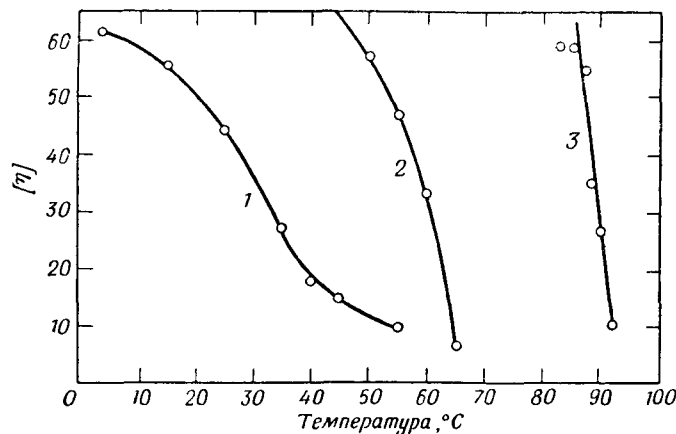
Выдерживание растворов дезоксирибонуклеата натрия при повышающихся температурах приводит к многочисленным изменениям в физических свойствах. Однако для нативных ДНК при возрастании температуры эти свойства изменяются не равномерно, а при



Р и с. 8-17. Влияние нагревания (в течение 1 час) на вязкость ДНК. 1 — ДНК человека в буферном растворе; 2 — ДНК быка в буферном растворе; 3 — ДНК быка в дистиллированной воде. Удельная вязкость (измеренная при 23°) выражена в процентах по отношению к максимальной вязкости [236].

относительно высоких температурах имеет место довольно резкий скачок. Область 75—90° является характеристической для нуклеиновых кислот [236]. Так, нагревание растворов ДНК человека в течение 1 час (в буферном растворе) мало отражается на вязкости раствора (измеренной после охлаждения), до тех пор пока температура не достигнет 81°. Выше этой температуры происходит резкое падение вязкости с точкой перегиба при 86° (рис. 8-17). Аналогичное воздействие на ДНК быка приводит к скачкообразному возрастанию вязкости с точкой перегиба при 89° (рис. 8-18). На основании уменьшения вязкости при нагревании можно заключить, что стабильность ДНК заметно зависит от ионной силы среды, а в бессолевом растворе вязкость при комнатной температуре изменяется плавно, а не скачкообразно, что согласуется с известным защитным действием ионов против разрушения двойной спирали.

Более детальное изучение [237] тепловой денатурации ДНК показало, что быстрое изменение вязкости происходит при специфической температуре «плавления» и сопровождается большим уменьшением средней непрерывной длины молекулы, однако, по данным светорассеяния, никаких изменений в молекулярном весе при этом не происходит. (Продолжительное нагревание, особенно в слабых растворах с низкой ионной силой, вызывает разрыв ковалентных связей и, следовательно, понижение молекулярного



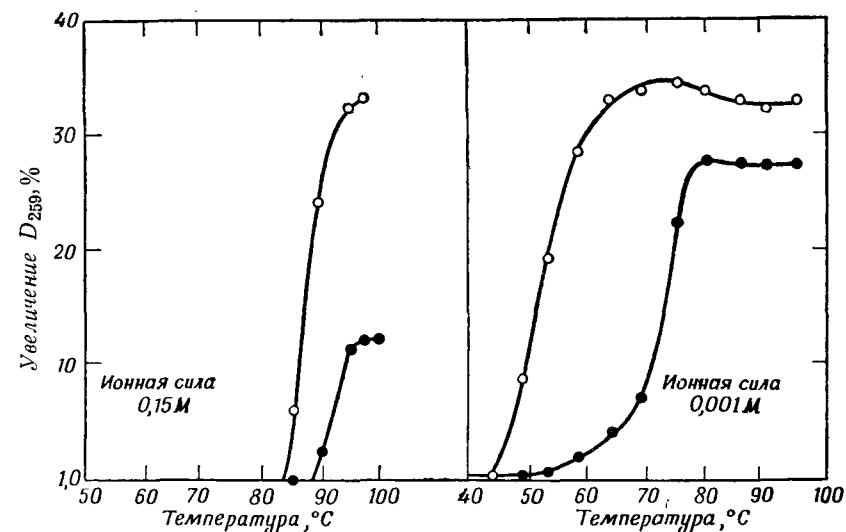
Р и с. 8-18. Изменение характеристической вязкости ДНК из спермы лосося, измеренной при 25° после нагревания раствора при указанных температурах и ионной силе [23].

1 — 0,0001 М фосфатный буфер, рН 7; 2 — 0,001 М NaCl; 3 — 0,2 М NaCl.

веса.) Денатурирующие агенты, такие, как 8 М раствор мочевины, не оказывают влияния на ДНК при комнатной температуре, но снижают ее температуру «плавления» на 10—20°. Внутри области температурного перехода вязкость достигает своего конечного значения примерно через 15 мин нагревания. Так как в условиях опыта этот процесс был практически необратимым, стали утверждать, что денатурация относится к процессам типа «все или ничего», т. е. ослабление любой части структуры облегчает быстрое разрушение всей структуры и никаких промежуточных состояний, соответствующих частично денатурированной ДНК, при этом не возникает. В дальнейшем пришли к выводу, что изменения, происходящие при нагревании, являются результатом «плавления» участков структуры ДНК, связанных водородными связями [237, 243], и что это разрушение упорядоченной нативной двойной спирали является кооперативным, так же как и в случае кислотной или щелочной денатурации [247]. Неудачные попытки наблюдать полную диссо-

циацию комплементарных цепей могут быть объяснены образованием случайных водородных связей при охлаждении растворов, особенно при тех концентрациях, которые использовались в описанных опытах.

Наиболее удобным методом, позволяющим проследить переход от нативной к денатурированной ДНК, является изучение изменений в ультрафиолетовом поглощении, происходящих при переходе от спиральной к беспорядочной структуре [238]. Характер кривой



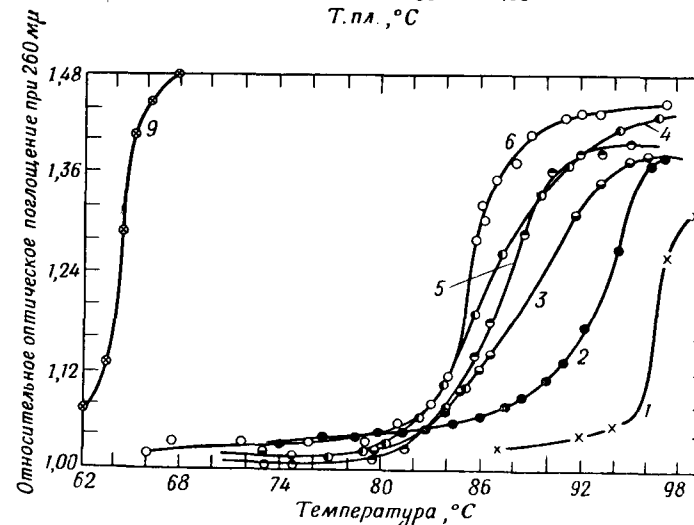
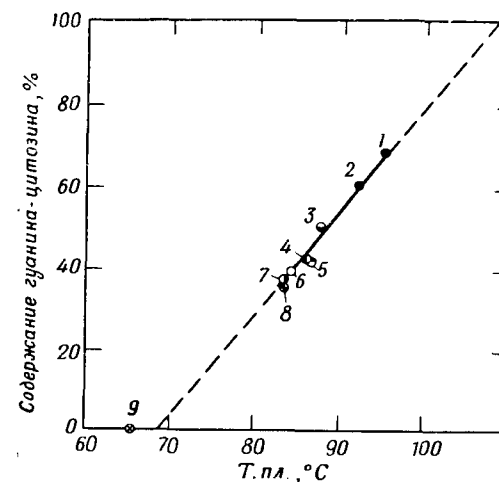
Р и с. 8-19. Изменение оптической плотности при 259 мμ ДНК из зубной железы телят в зависимости от температуры [238].

○ измерения при температуре окружающей среды; ● измерения при комнатной температуре.

и величина возрастания оптической плотности (рис. 8-19) различны, если измерение проводится после охлаждения до комнатной температуры или непосредственно в процессе повышения температуры, так как при понижении температуры происходит частичное восстановление водородных связей (что приводит к образованию коротких упорядоченных спиральных участков). Этот процесс частично обратим в растворах с высокой ионной силой, которая (так же как и в случае изучения изменения вязкости при денатурации) смещает температуру «плавления» в сторону более высоких значений. При этом ионы магния (и других двухвалентных катионов, таких, как Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+}) значительно более эффективны, чем одновалентные катионы. В противоположность этому ионы меди(II) понижают термическую устойчивость двуспи-

ральной ДНК (например, в присутствии Mg^{2+} температура плавления ДНК повышается от 63 до 80°, тогда как ионы Cu^{2+} снижают ее до 42°) и, кроме того, при охлаждении раствора ДНК уменьшения ультрафиолетового поглощения не происходит [391]. Эти эффекты возникают, по-видимому, в результате взаимодействия Cu^{2+} с электронодонорными группами оснований, что приводит к разрыву водородных связей и предотвращает их образование вновь, как это происходит при денатурации ДНК формальдегидом. (См. также в гл. 6 о стабилизирующем влиянии диаминов и полиаминов на вторичную структуру дезоксирибонуклеиновых кислот.) Зависимость оптической плотности от температуры для денатурированной ДНК имеет по существу обратимый характер, причем ультрафиолетовое поглощение плавно возрастает от 25 до 100°. Это указывает на низкую степень упорядоченности структуры, в состав которой входят короткие спиральные участки (различающиеся по длине и составу), разделенные участками, которые представляют собой либо единичные несвязанные участки, либо фактически неспаренные связанные беспорядочными связями фрагменты.

Несмотря на то что область температурного перехода для ДНК относительно узкая, она все же шире, чем можно было бы ожидать для длинной идеально уложенной спиральной структуры. Внутри этой области с помощью метода электронной микроскопии удалось обнаружить только полностью денатурированные или совершенно нативные структуры [239]. И вновь внутри этой области понижение вязкости быстро достигает предельного значения, а дальнейшее понижение вязкости происходит только при повышении температуры, что указывает на существование известного распределения специфических температур денатурации. Вполне обоснованное объяснение этого заключается в том, что вклад двух типов пар оснований в стабильность спирали различен. В таком случае тепловая денатурация должна была бы зависеть от относительного состава либо всей двуспиральной структуры, либо ее отдельных больших участков. Показано, что температуры плавления (т. е. точки перегиба на кривых зависимости оптической плотности от температуры), определенные в стандартных условиях (0,15 М хлористого натрия в 0,015 М цитрата натрия) для большого числа дезоксирибонуклеиновых кислот, различающихся по составу оснований, прямо пропорциональны содержанию гуанина и цитозина в нуклеиновой кислоте (рис. 8-20) [240]. Линейная зависимость температур плавления от содержания гуанин-цитозиновых пар исключительно точна, и поэтому измерение этих температур может быть использовано для определения нуклеотидного состава данной ДНК* [241,

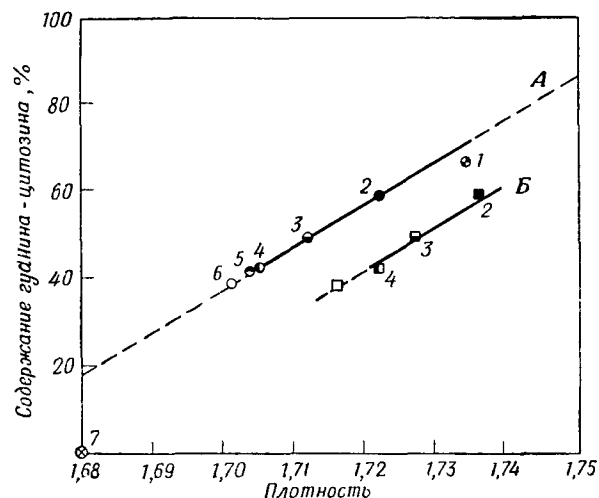


Р и с. 8-20. Соотношение между содержанием гуанина и цитозина и температурой денатурации различных ДНК в 0,15 М NaCl с добавкой 0,015 М цитрата натрия, измеренной по изменению оптического поглощения при 260 мμ [240].

1 — *M. Phlei*; 2 — *Serratia*; 3 — *E. coli*; 4 — зубная железа телят; 5 — сперма лосося; 6 — *Pneumococcus*; 7 — дрожжи; 8 — бактериофаг T4; 9 — поли-АТ.

* Для растворов ДНК в 0,2 М Na^+ т. пл. = $69,3 + 0,41 (ГЦ)$, где (ГЦ) — молярное процентное содержание гуанина и цитозина [413].

242]. Экстраполяция результатов для ДНК, содержащих 38—67% пар гуанин — цитозин (область т. пл. 84—96°), позволяет определить температуры плавления для двухспиральных структур, содержащих только одну из пар гетероциклических оснований. Для аденина — тимина эта температура равна 69°, а для гуанина — цитозина — 110°. Ферментативно синтезированный сополимер дезоксиадениловой и тимидиловой кислот, в котором каждая из двух цепей имеет противоположную последовательность адениновых



Р и с. 8-21. Соотношение между содержанием гуанина и цитозина и плотностью различных ДНК [245].

А — нативная ДНК; Б — денатурированная ДНК; 1 — *M. Phlei*; 2 — *Serratia*; 3 — *E. coli*; 4 — зубная железа телят; 5 — сперма лосося; 6 — *D. Pneumoniae*; 7 — поли-АТ.

и тиминовых остатков, плавится при 65° и имеет довольно ограниченную область перехода, тогда как температура плавления комплекса полидезоксигуаниловой и полидезоксцитидиловой кислот равна 104°. Небольшие различия между экспериментальными данными и результатами экстраполяции обусловлены, по-видимому, незначительными различиями в размерах спирали вследствие неполного соответствия пар оснований. (В этих случаях тепловая денатурация полностью обратима.)

Для ДНК зубной железы телят наблюдался значительный разброс по содержанию гуанин-цитозиновых пар (рис. 8-21), что было показано наличием более широкой области перехода. Фракционирование частично (примерно на 80%) денатурированного нагреванием образца осаждением стрептомицином дало фракцию

с кривой плавления, имеющей больший подъем, чем кривая плавления исходного образца. В свою очередь это дает простые способы фракционирования молекулярных образцов в препаратах ДНК. Для бактериальных ДНК наблюдался относительно небольшой разброс в распределении содержания гуанина и цитозина, и если принять во внимание большое разнообразие суммарного состава этих дезоксирибонуклеиновых кислот, то можно прийти к выводу, что состав молекул ДНК многих бактерий существенно не перекрывается [240]. Узкая область состава характерна не только для бактериальных ДНК. Сравнение форм кривых температурного перехода для ДНК из десяти нормальных и злокачественных тканей мышей показывает, что различие в составе для них значительно меньше, чем у ДНК из спермы лосося или ДНК из зубной железы телят, и в этом смысле эти ДНК вполне сравнимы с бактериальными ДНК, включая отсутствие перекрывания [244].

Что касается низкой гетерогенности бактериальных ДНК по составу (но не обязательно по последовательности), то она очевидна также из данных по определению плотности ДНК методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности [245, 246]. При изучении большого числа дезоксирибонуклеиновых кислот вновь была найдена линейная зависимость между плотностью ДНК и содержанием гуанина и цитозина. Экстраполирование этих результатов показало, что двойная спираль из аденин-тиминового полидезоксинуклеотида должна иметь плотность 1,662, а плотность соответствующего гуанин-цитозинового полимера должна быть 1,764. Если известна плотность нативной ДНК и ее величина укладывается между этими крайними значениями, то это позволяет точно определять состав ДНК*. Соответствующие денатурированные ДНК имеют плотность на 0,015 выше. Если гетерогенность двух препаратов ДНК из животных тканей удалось выявить по увеличению ширины полос, то бактериальные нуклеиновые кислоты характеризуются узким распределением по составу (половина ширины полосы соответствует 3—5 мол. % гуанина + цитозина по сравнению с 11% для ДНК из зубной железы телят), а распределение по составу ДНК бактериофага настолько узко, что его не удалось измерить. Избирательная тепловая денатурация ДНК из зубной железы телят (с низким содержанием гуанин-цитозиновых пар) дает фракцию нативного препарата с более высокой плотностью, чем плотность исходного препарата, из которого она была выделена [245].

Равновесное центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия является исключительно чувствительным методом для

* Содержание суммы гуанина и цитозина (в молекулярных процентах) определяется из уравнения [411] $\rho = 1,660 + 0,098 (\text{ГЦ})$, где ρ — плотность в хлористом цезии. В отличие от температуры плавления, плотность зависит от присутствия глюкозидных и других остатков.

характеристики бактериальных нуклеиновых кислот, меченных N^{15} (при выращивании бактерий в качестве источника азота используют $N^{15}H_4Cl$) или дейтерием (бактерии выращивают в D_2O) или и тем и другим изотопом одновременно. Довольно характерные данные были получены для ДНК из *Escherichia coli* [247]:

	Плотность
Нормальная ДНК	1,709
N^{15}	1,725
H^2	1,736
$N^{15} + H^2$	1,752
Денатурированная ДНК, $N^{15} + H^2$. . .	1,767

Деградация ДНК с молекулярным весом $8 \cdot 10^6$ до препаратов с молекулярным весом $6,2 \cdot 10^5$ при обработке ультразвуком (при этом происходит рассечение двойной цепи, а не разрыв водородных связей) выражается лишь в слабом расширении как области температурного подъема, так и полосы распределения плотности. Оказалось, что распределение по составу сохраняется по крайней мере на одну десятую от распределения в исходном препарате.

Характер зависимости ультрафиолетового поглощения от температуры для многоцепочечного спирального комплекса, образованного ферментативно синтезированными полирибонуклеотидами, находится в полном соответствии с двуспиральной структурой ДНК [238]. Был изучен ряд всевозможных комбинаций, и все они обладали относительно узкими областями структурных переходов, характерными для кооперативного процесса тепловой денатурации. Двухцепочечный комплекс из полиадениловой и полиуридиловой кислот в тех условиях (0,15 М раствор хлористого натрия), которые использовали для тепловой денатурации дезоксирибонуклеиновых кислот, имел т. пл. 61° . И в этом случае ионная сила очень сильно влияла на температуру тепловой денатурации; в 1 М растворе хлористого натрия температура плавления для полиаденилил-полиуридилового комплекса повышалась приблизительно до 82° .

Теоретический расчет электронной структуры пурин-пиримидиновых пар в ДНК методом молекулярных орбит указывает на значительные количественные различия во многих электронных свойствах [248]. Расчеты показывают, что как общая резонансная энергия, так и отдельные ее части, отражающие стабилизацию структуры в результате образования водородных связей, для пары гуанин — цитозин должны быть выше, чем для аденин-тиминовой пары. Далее, распределение электрических зарядов в парах оснований позволяет предположить, что определение положения про-

тонирования основных дезоксинуклеозидов в ДНК путем экстраполирования результатов, полученных для мономеров, не может считаться обоснованным, так как наличие водородных связей может изменять средство протона к различным атомам азота в гетероциклах. Аксиальное взаимодействие расположенных друг над другом оснований, по-видимому, также будет оказывать некоторое влияние. В основном же результаты, полученные при изучении субмолекулярной электронной структуры нуклеиновых кислот методами теоретической квантовой химии (методами молекулярных орбит) согласуются с основными химическими и физико-химическими свойствами этих полимеров [249].

При изучении кристаллической структуры пурин-пиримидинов пришли к выводу, что цитозин и гуанин должны образовывать три водородные связи, причем третья водородная связь связывает 2-аминогруппу гуанина с 2-кетогруппой цитозина [250]. Это подтверждается в известной степени большей стабильностью водородных связей между гуанином и цитозином по сравнению со связями между аденином и тиминном, но изучение реакции азотистой кислоты с нативной и денатурированной ДНК с последующим гидролизом полученных продуктов до свободных оснований приводит к иному выводу [251]. По сравнению с полимером, денатурированным нагреванием, в нативной ДНК из зубной железы наблюдалось ингибирование реакции 6-аминогрупп цитозина и аденина с азотистой кислотой, что, по-видимому, является результатом наличия водородных связей (хотя определенное значение могут иметь и стереохимические факторы); в то же время в случае аминогруппы гуанина подобного эффекта не наблюдалось. Результаты титрования ДНК также позволяют предположить, что аминогруппа аденина не участвует в образовании водородной связи, но и это доказательство не является убедительным [197, 202]. Осциллографическая полярография высокополимерной ДНК указывает на то, что 2-аминогруппа гуанина, а не цитозиновый остаток, участвует в реакции [252]. Однако в апуриновой кислоте цитозин дает осциллополярографическую волну.

Тепловая денатурация ДНК влияет, кроме того, на ее поведение при хроматографии на целлюлозных анионообменных материалах [253, 254]. При этом заметное защитное действие оказывают соли; кроме того, установлено, что различные молекулы в препарате ДНК ведут себя неодинаково, причем некоторые из них более устойчивы, чем другие.

Несмотря на то что обратимость при тепловой денатурации ДНК можно не принимать в расчет при быстром охлаждении растворов с низкой ионной силой, при понижении температуры при высокой ионной силе все же вновь происходит образование спиральных участков. Так как высокая вязкость нативной ДНК не восстано-

вливаются, эти области, по-видимому, являются короткими по сравнению с длиной нитей. Однако при медленном охлаждении достигается спаривание оснований в большей части длины цепи, и ДНК в основном ренатурирует, что показано восстановлением плотности, гидродинамических свойств, характера зависимости ультрафиолетового поглощения от температуры и трансформирующей активности [255, 256]. Кроме гомологической ренатурации бактериальной ДНК, может происходить образование гибридных двойных спиралей при медленном охлаждении гетерологичных нитей ДНК из родственных штаммов бактерий (но не из генетически не связанных штаммов). Таким образом, при температуре денатурации казалось бы происходит фактически полное разделение полидезоксирибонуклеотидных цепей, что могло бы быть обнаружено при определении молекулярного веса ДНК при повышающихся температурах. Однако при охлаждении может происходить далеко не полное спаривание комплементарных цепей, особенно если концентрация ДНК высока. При ренатурации путем медленного охлаждения может реконструироваться до 75% спиральных структур, что следует из измерения скорости седиментации, характеристической вязкости и понижения плотности. Так, нативная ДНК из *Diplococcus pneumoniae* имеет плотность 1,700. После тепловой денатурации плотность быстро охлажденных препаратов равна 1,716, а медленно охлажденных — 1,704. При исследовании с помощью методов электронной микроскопии ренатурированная ДНК почти не отличима от нативной ДНК.

Ясно, что ренатурация может быть легко достигнута для более однородных образцов ДНК (например, для тех препаратов, которые дают достаточно узкие зоны при ультрацентрифугировании в градиенте плотности), так как в растворах совершенно гомогенной ДНК после ее денатурации будет наибольшая концентрация комплементарных цепей. Таким образом, наиболее полно будут ренатурировать ДНК бактериофагов, в несколько меньшей степени бактериальные ДНК и в значительно меньшей степени ДНК из животных тканей (например, из зубной железы телят), которые весьма гетерогенны по составу (см. также стр. 601, где денатурация и ренатурация обсуждаются более детально).

Необходимо различать два механизма тепловой инактивации трансформирующей активности ДНК [257, 258]. Один из них соответствует быстрому процессу, протекающему при критической температуре (не более чем за 5 мин), который характерен не только для изучаемой бактериальной ДНК генетического маркера. Этот процесс соответствует переходу спираль — клубок и разрушению упорядоченной структуры, сопровождающемуся потерей 93—98% активности. Исследования трансформирующей активности ДНК из пневмококков, содержащей ряд маркеров по устойчивости

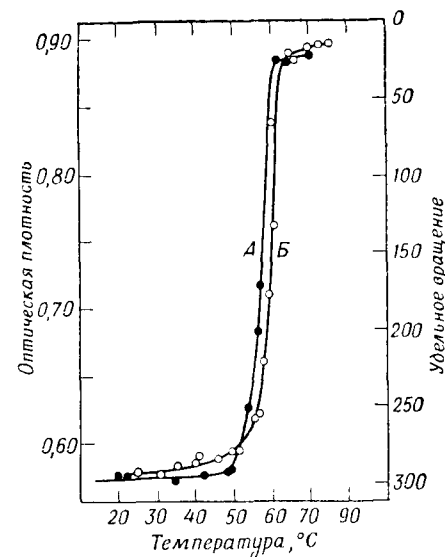
к лекарственным препаратам, показали, что генетически связанные маркеры имеют одну и ту же температуру инактивации, в то время как различные маркеры могут иметь довольно широкие различия (например, на 4°) в температурах инактивации. Подъем кривой зависимости инактивации от температуры происходит исключительно резко в пределах $\pm 0,2^\circ$ по сравнению с подъемом кривой зависимости ультрафиолетового поглощения от температуры (в пределах $\pm 2^\circ$). Различия в температурах инактивации (например, 88° для устойчивости к микрококцину, 90° для сульфамида, стрептомицина и канамицина и 91° для аметоптерина в 0,15 М растворе хлористого натрия; можно заметить, что при 88° более стабильные маркеры совсем не инактивируются), возможно, обусловлены не только гетерогенностью по содержанию гуанин-цитозиновых пар в ДНК-маркере, но и гетерогенностью распределения этих пар в ДНК. Участки большой длины, состоящие из гуанина или цитозина с соответствующими промежутками из аденина или тимина, по-видимому, более устойчивы, чем построенные прямо противоположным образом аденин-тиминовые структуры с гуанин-цитозиновыми промежутками, хотя общий состав маркера или ДНК может быть одним и тем же. Измерения светорассеяния показывают, что при тепловой инактивации происходит уменьшение эффективной молекулярной длины от 9000 Å до менее чем 1000 Å, но не молекулярного веса (приблизительно $4 \cdot 10^6$) [257, 258]. Однако это может быть и следствием случайной агрегации.

Потеря трансформирующей активности может происходить не только при критических температурах, но также при длительном нагревании при температурах, близких к критическим. В то время как разные маркеры в одном и том же образце имеют различные температуры, при которых происходит нарушение структуры, зависимость процессов инактивации от температуры при температурах, близких к критической, примерно одна и та же для всех маркеров, если только при этом не происходит их деградации. Инактивация при температурах, близких к критическим, протекает как простой процесс, она соответствует реакции первого порядка и происходит, по-видимому, лишь для пар оснований, водородные связи у которых разрушились при нагревании; поэтому при температурах, приближающихся к критическим, происходит аномально быстрое увеличение скорости [257]. Процесс сильно ускоряется при pH 5,4, а более крупные генетические участки более чувствительны к инактивации при субкритических температурах [258]. Почти наверняка при этом происходит разрыв гликозидной связи в пуриновых дезокси-нуклеозидах [257, 258]. Зная скорость разрушения пуриновых дезокси-нуклеозидов, удалось рассчитать, что маркер, определяющий устойчивость к стрептомицину, состоит примерно из 430 пар оснований [257].

ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ

Оптическая активность нативных дезоксирибонуклеиновых кислот заметно выше оптической активности составляющих их мононуклеотидов [259]. Удельное вращение мономеров (появляющееся благодаря наличию остатка сахара) лежит в области от $+50^\circ$ до -50° со средним значением около 0° для эквимольных количеств основных нуклеотидов. Для дезоксирибонуклеиновых кислот $[\alpha]_D$ лежит между $+100^\circ$ и $+150^\circ$, а типичная величина $[M_r]_D$ (молярное вращение, рассчитанное по числу фосфатных остатков) равна приблизительно $+42000^\circ$. Величины удельного вращения для ди- и олигонуклеотидов позволяют предположить, что изменения, которых можно ожидать в результате этерификации мононуклеотидфосфата, весьма малы [260, 261]. Например, соответствующая величина $[M_r]_D$ для тимидилил-5':3'-тимидин-5'-фосфата составляет в нейтральном растворе $+2800^\circ$. Однако для спиральных структур значительная часть общей оптической активности может определяться особыми и некомпенсированными взаимодействиями, которые возможны благодаря соответствующим конформациям этих структур. Таким образом, разрушение упорядоченной спиральной структуры должно приводить к снижению оптической активности препарата [238]. Было найдено, что дело обстоит именно так. Далее, изменение оптического вращения ДНК в зависимости от температуры можно непосредственно сравнивать с ранее описанной зависимостью ультрафиолетового поглощения от температуры. Для ДНК из зубной железы телят $[\alpha]_D$ уменьшается от $+126^\circ$ при комнатной температуре до $+28^\circ$ при 92° , причем температура тепловой денатурации, определенная в этом случае по точке перегиба кривой перехода, очень близка к значению, полученному из соответствующих опытов по изучению изменения ультрафиолетового поглощения.

Корреляция двух кривых перехода (рис. 8-22) является дополнительным доказательством того, что упорядоченные водородные связи в ДНК существуют лишь в ее спиральной структуре, так как изменение оптического вращения отражает конформационные переходы и непосредственно не связано с количеством водородных связей в молекуле ДНК. Можно предположить, что образование водородных связей между основаниями практически не оказывает прямого влияния на удельное вращение, хотя оптическая активность мононуклеотидов зависит от природы оснований. Аналогичное совпадение в изменении оптической плотности и удельного вращения (от $+300^\circ$ до $+25^\circ$) наблюдалось при нагревании двухцепочечного полиаденилил-полиуридилового комплекса, что указывает на прямую связь между разрывом водородных связей и переходом спираль — клубок [238]. Оказалось, что при ренатурации денатуриро-



Р и с. 8-22. Изменение удельного вращения (А) и оптической плотности (Б) растворов двухспирального комплекса полиуридиловой и полиадениловой кислот в 0,15 М NaCl с добавкой 0,015 М цитрата натрия при pH 7 с изменением температуры [238].

ванной нагреванием ДНК оптическое вращение, по-видимому, в значительной степени восстанавливается. Как и в случае ультрафиолетового дихроизма, изменения оптического вращения более тесно связаны с характером упорядоченной вторичной структуры, чем изменения ультрафиолетового поглощения [34].

ПРОТИВОИОННАЯ АКТИВНОСТЬ

При тепловой денатурации ДНК происходит резкое необратимое увеличение активности ионов натрия. Изменение степени связывания катионов в очень узком интервале температур совпадает с аналогичными изменениями оптической плотности и оптического вращения. Это можно объяснить уменьшением плотности зарядов макроиона ДНК при денатурации вследствие появления коротких и растянутых участков в беспорядочно скрученной структуре, что ведет к увеличению контурной длины (но уменьшению радиуса вращения) молекулы ДНК, сопровождающему переход спираль — клубок [262].

УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫЕ СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Ультрафиолетовое поглощение нуклеиновых кислот зависит от ряда факторов, среди которых не последнее место занимает характер предварительной обработки препарата. Современные методы выделения рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот позволяют избежать большей части условий, которые вызывают денатурацию, например, низких или высоких значений pH, низкой ионной силы или высоких температур, ведущих к необратимым изменениям в спектрах поглощения [263—267]. Для так называемой нативной ДНК значение экстинкции ($\epsilon_{\text{макс}}$), отнесенное к числу фосфатных остатков (т. е. средняя величина экстинкции, приходящейся на один нуклеотид) в 10^{-3} М (или выше) растворе хлористого натрия и нейтральном значении pH, лежит между 6000 и 6500. В бессолевом растворе даже при pH 7 происходит глубокая денатурация и между pH 6,5 и 7,5 изменения в ультрафиолетовом поглощении достаточно велики [265], по-видимому, за счет смещения значений pK в результате протонирования адениновых и цитозиновых остатков в этой области значений pH. Экстинкция соответствующей смеси моонуклеотидов должна быть равна приблизительно 10500, и, следовательно, для ДНК характерны значительные гипохромные эффекты. Существенно, что изменения ультрафиолетового поглощения полинуклеотидов в результате изменений pH, температуры и ионной силы отражают большие или малые конформационные изменения (несомненно, наряду с другими физическими свойствами), которые увеличивают или уменьшают гипохромный эффект.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

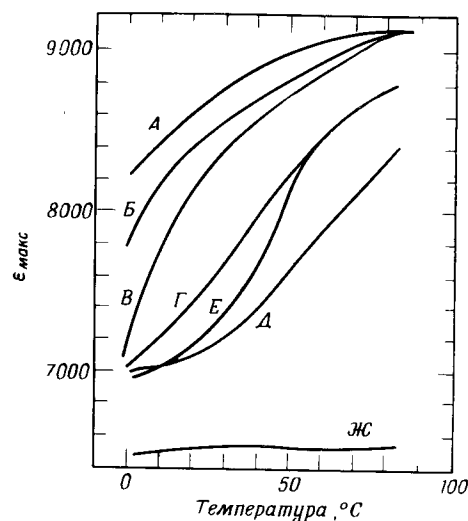
Как уже упоминалось ранее, повышение температуры растворов нативной ДНК приводит к «плавлению» участков, удерживаемых водородными связями между парами оснований. Тепловая денатурация есть кооперативное разрушение упорядоченной структуры в узком температурном интервале [264]. Для растворов большинства ДНК в нормальных условиях критическая температура плавления превышает 75° [240]. Ниже этой температуры оптическое поглощение фактически постоянно от 0° до температуры «плавления», причем ультрафиолетовое поглощение измерялось непосредственно при данной температуре [267]. Далее, во всей этой области температур оптическая плотность не зависит также от ионной силы (от 10^{-3} М до 1 М хлористого натрия), хотя с понижением ионной силы критическая температура плавления также понижается. При этой и более высоких температурах происходит сильное увеличение

оптического поглощения, и $\epsilon_{\text{макс}}$ достигает величины, составляющей примерно 90% (по сравнению с 60—65% для нативной ДНК) от оптической плотности, вычисленной для моонуклеотидов, из которых состоит ДНК. Величина гиперхромного эффекта при тепловой денатурации (измеренная при повышенных температурах) является также функцией содержания гуанин-цитозиновых пар в нуклеиновой кислоте [240]. Эта величина колеблется от 44% (для ДНК, содержащей 38% гуанина + цитозина) до 34% (для ДНК, содержащей 67% гуанина + цитозина). Тепловая денатурация ферментативно синтезированного сополимера дезоксиаденилил-тимидиловой кислоты (двойная спираль с чередующимися остатками аденина и тимина в каждой цепи) приводит к 52%-ному увеличению ультрафиолетового поглощения при $\lambda_{\text{макс}}$. Экстраполирование этих результатов показывает, что спиральный комплекс полидезоксигуанилидовой и полидезоксигуанилидовой кислот при денатурации должен характеризоваться увеличением оптического поглощения на 25%*. Таким образом, образование упорядоченных структур, в состав которых входят остатки аденина и тимина, вызывает более эффективное снижение ультрафиолетового поглощения, чем образование связей между гуанином и цитозином, хотя стабильность при нагревании определяется главным образом этой парой.

При охлаждении оптическое поглощение понижается до более низкого значения, причем окончательная величина $\epsilon_{\text{макс}}$ зависит от скорости охлаждения и ионной силы. При этом полной обратимости обычно не наблюдается, а величина оптического поглощения у ДНК, полностью денатурированной нагреванием, составляет 70—80% (а не 60%) от вычисленной величины, т. е. $\epsilon_{\text{макс}}$ приблизительно равна 7500—8500 [264, 266]. Вследствие того, что это увеличение оптической плотности происходит при тепловой денатурации, кривые для критических температур денатурации могут быть также получены путем нагревания растворов ДНК в течение 1 час с последующим охлаждением до комнатной температуры и определением оптического поглощения, хотя этот метод и менее изящен [264]. Тем не менее в ранних работах, в которых использовался этот метод, было показано, что дезоксирибонуклеиновые кислоты из различных источников (зобная железа телят, лягушка и оболочка морской звезды) различаются по своей чувствительности к нагреванию и что увеличение концентрации соли (от 10^{-2} М до 1 М хлористого натрия) оказывает защитное влияние против денатурации при 100° . С полной очевидностью было показано также, что при температурах вплоть до температуры денатурации оптическая плотность ДНК остается постоянной [264].

* Экспериментально определенная величина равна примерно 23% [410].

В противоположность этому оптическое поглощение денатурированной нагреванием ДНК (которая содержит пары оснований, связанные водородными связями, заново образовавшимися случайным или каким-то иным путем) постоянно и сильно зависит от температуры в интервале от 0 до 100° [267]. Повышение температуры приводит к возрастанию значения $\epsilon_{\text{макс}}$, измеренного при



Р и с. 8-23. Изменение $\epsilon_{\text{макс}}$ денатурированной ДНК с изменением температуры и концентрации соли.

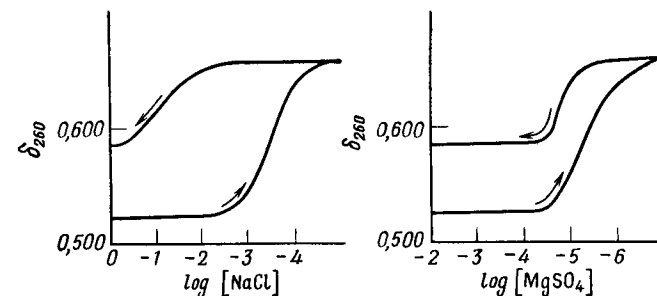
А — в воде; Б — в 0,001 М NaCl; В — в 0,01 М NaCl; Г — в 0,1 М NaCl; Д — в 1 М NaCl; Е — в 0,001 М MgCl_2 ; ЖС — нативная ДНК в 0,01 М или 0,1 М NaCl [267].

данной температуре (рис. 8-23). Далее, при любой температуре $\epsilon_{\text{макс}}$ зависит от концентрации солей и природы присутствующих катионов. Увеличение концентрации солей понижает оптическое поглощение, а катионы двухвалентных металлов, например магния, почти в 100 раз более эффективны, чем катионы одновалентных металлов (имеется в виду их молярная концентрация).

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ

Как уже выше было установлено, оптическое поглощение нативной ДНК не зависит от концентрации ионов в области концентрации хлористого натрия от 1 до 10^{-3} М. В растворах с более низкой ионной силой, чем 10^{-3} М, или в бессолевых водных растворах при рН 6,7 и комнатной температуре наблюдается возрастание величины $\epsilon_{\text{макс}}$ до 8000—8800, что указывает на денатурацию [264—266].

Эти изменения необратимы, что следует из того факта, что кривые обратного и прямого спектрофотометрического солевого титрования не совпадают, а получающееся при этом значение коэффициента экстинкции не ниже, чем у нативной ДНК [264] (рис. 8-24). Как и в случае кислотной, щелочной или тепловой денатурации, денатурация в нейтральных водных растворах совершенно не обязательно сопровождается значительным изменением в молекулярном весе [265].



Р и с. 8-24. Солевое титрование ДНК морской звезды [264].

При низких значениях ионной силы увеличение оптического поглощения является функцией концентрации ДНК. Вполне возможно, что это обусловлено увеличением ионной силы за счет противоионов и следов солей в препаратах ДНК, так как при более низких концентрациях ДНК происходит более сильное увеличение оптической плотности. Концентрированные растворы дезоксирибонуклеата натрия относительно устойчивы и без добавления солей [265]. Фактически для разбавленных (10^{-4} М или менее) растворов ДНК удаление солей понижает температуру денатурации от т. пл. 75—85° до комнатной температуры. Однако оказалось, что при 0° даже разбавленные растворы ДНК стабильны в отсутствие солей.

Измерения подвижности и электропроводности также показывают, что при разбавлении растворов ДНК до концентрации соли ниже критической происходит ее денатурация. Скачок в удельной электропроводности (в зависимости от концентрации ДНК) происходит при той же концентрации (приблизительно $2 \cdot 10^{-4}$ М ДНК по отношению к фосфату в бессолевых препаратах), при которой происходит аналогичный скачок в ультрафиолетовом поглощении. По крайней мере частично этот процесс необратим и не сопровождается изменением молекулярного веса, определенного методом светорассеяния [268]. При денатурации ДНК обработкой кислотой, щелочью или нагреванием или понижением ионной силы никаких изменений в ее молекулярном весе не происходит

(по сравнению с молекулярным весом, определенным при высокой ионной силе), и вполне возможно, что при этих условиях не происходит быстрого разрушения денатурированных двойных спиралей ДНК, хотя такой процесс энергетически возможен. Образование неспецифических водородных связей могло бы ограничить полное разделение единичных цепей; существенное значение может иметь также случайная агрегация.

Сравнение изменений удельной электропроводности с изменением концентрации (выше и ниже критической концентрации) у нативной и денатурированной нагреванием ДНК показало, что эффекты, возникающие при разведении действительно соответствуют денатурации, а не обратимой дезагрегации тяжелей, состоящих из ряда двухспиральных субъединиц [268]. Однако в других исследованиях влияния противоионов на конформационную стабильность ДНК в растворе наблюдали два скачка на кривой титрования. В отсутствие солей изменение как коэффициента активности ионов натрия (определенного с помощью мембранного электрода), так и удельной электропроводности характеризовалось двумя скачками (примерно $2 \cdot 10^{-4}$ и $4 \cdot 10^{-4}$ М, ДНК) на кривых зависимости от концентрации ДНК. Была сделана попытка интерпретировать эти данные как результат агрегации двухспиральных структур в концентрированных растворах; разведение до более высоких критических значений вызывает диссоциацию на отдельные двухспиральные структуры [269].

Разрушение водородных связей можно приписать [265] смещению значений pK (до примерно 7) у нуклеозидов, содержащих аминогруппы, которые протонируются при pH 6,7. В соответствии с этим, как было показано определением коэффициента экстинкции ($\epsilon_{\text{макс}}$ 6300) и измерением вязкости и дихроизма [265], в бессолевом растворе при pH 8 денатурация ДНК не происходит. При кислотном титровании такого раствора наблюдаются два резких скачка в ультрафиолетовом поглощении, один при pH 7, а другой между pH 5,0 и 4,5, что указывает на макромолекулярные структурные переходы. Таким образом, при денатурации в нейтральном водном растворе, так же как и при денатурации кислотой, происходит протонирование ДНК.

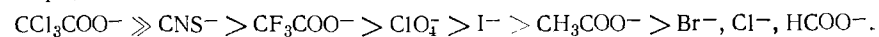
Выше мы уже кратко объясняли причины этого смещения значений pK . При высокой ионной силе заряженные фосфатные группы экранируются находящимися рядом с ними противоионами, вследствие чего электростатические эффекты не имеют особого значения, а локальная концентрация ионов натрия и электрическое поле существенно не изменяются. Таким образом, диссоциирующие группы основного характера (и — NH — CO —) находятся под влиянием поля с постоянным электростатическим потенциалом вдоль всей длины молекулы. Это состояние (основные значения pK

равны примерно 4,5) достигается при концентрации хлористого натрия 10^{-3} М, т. е. при более высокой концентрации, чем та концентрация противоионов, при которой дезоксирибонуклеат начинает денатурировать при нейтральных значениях pH ; дезоксирибонуклеат натрия при ионной силе выше 10^{-3} М и значениях pH выше 2,6 не денатурирует. Увеличенное экранирование фосфатных групп при ионной силе выше 10^{-3} М является однородным и асимптотическим, поэтому вызвать смещение pK в сторону более низких значений можно лишь постоянно увеличивая концентрацию соли. Однако при низкой ионной силе вследствие диффузии противоионов в направлении от периферийных фосфатных групп двойной спирали появляются участки, в которых неэкранированные фосфатные группы могут создавать очень сильное поле. Можно ожидать, что с уменьшением концентрации ионов число и размеры таких участков будут увеличиваться. Это неоднородное распределение зарядов, которое усиливается вследствие довольно жесткой двухспиральной структуры, препятствующей разделению соседних заряженных фосфатных групп в одной и той же или в противоположных цепях, способствует повышению значений pK аминоксодержащих нуклеозидов до 7. Кроме того, можно ожидать, что протонирование ДНК, оказывающее влияние на прочность водородных связей и ослабляющее спиральную структуру вследствие увеличения электростатического отталкивания при понижении степени экранирования противоионами, будет сопровождаться разделением двух цепей и последующим разрушением структуры. С этой интерпретацией согласуется более сильное экранирующее влияние двухвалентных противоионов, например магния, по сравнению с ионами натрия. Если денатурация разбавленных растворов ДНК (приблизительно 10^{-4} М в расчете на фосфатные остатки), которую можно проследить по возрастанию $\epsilon_{\text{макс}}$, начинается при понижении концентрации хлористого натрия до 10^{-3} М, то в случае сульфата магния денатурация начинается только при понижении его концентрации до 10^{-5} М. Таким образом, двухвалентные катионы в значительно большей степени препятствуют денатурации ДНК в нейтральных водных растворах. Однако и в этом случае в той области значений ионной силы, при которых ДНК остается нативной, т. е. при 10^{-5} М и более высокой молярности раствора, сульфат магния не оказывает влияния на величину ультрафиолетового поглощения нативной ДНК [264].

При высоких концентрациях солей (2—8 М) оптическое поглощение нативной ДНК линейно возрастает с увеличением концентрации соли [270]. Однако в этом случае при удалении избытка соли гиперхромный эффект полностью обратим. Солевой гиперхромный эффект наиболее отчетливо проявляется в растворах бромистого натрия, в меньшей степени — в растворах других галогенидов

щелочных металлов и полностью отсутствует в растворах хлористого лития (фактически же при концентрации выше 6 М и эта соль вызывает гипохромный эффект). Увеличение оптического поглощения (приблизительно на 12%) в очень концентрированном солевом растворе сопровождается уменьшением удельного вращения (от 110° до 65°), что указывает на значительные нарушения спиральной структуры, ответственной за высокое положительное вращение нативной ДНК [270]. Объяснение этих обратимых эффектов, возможно, заключается в том, что некоторое ограниченное число водородных связей, например между аденином и тиминном, разрушается, и в двухспиральной структуре появляются дефекты, которые могут быть ликвидированы после удаления соли, благодаря наличию стабильных гуанин-цитозиновых участков. Эти факты можно объяснить также раскручиванием двойной спирали без разрыва водородных связей. Так, увеличение шага спирали по отношению к линейной конформации (увеличение числа пар оснований на виток) может приводить к более низкому удельному вращению. Изменение же электростатического поля вокруг пуриновых и пиримидиновых оснований наряду с изменением угла наклона плоскости пар оснований к оси спирали и возможным увеличением расстояния между плоскостями вполне может вызвать увеличение ультрафиолетового поглощения (т. е. понижение гипохромизма). Рентгенографические исследования показали, что тонкая структура волокон ДНК в высшей степени зависит от относительной влажности, т. е. от гидратации (и от природы щелочного металла, образующего соль). Аналогичные изменения в шаге спирали и наклоне плоскости оснований у ДНК в растворе вполне могут происходить в различных условиях и в особенности в тех условиях, которые в большей или меньшей степени влияют на гидратацию ДНК (что определенно можно ожидать в концентрированных растворах бромистого натрия). Если исключить электростатическое отталкивание фосфатных групп путем образования большого количества ионных пар, то это может привести к увеличению гибкости макромолекулы и к ее более беспорядочному свертыванию, чем обычно. Этим можно объяснить наблюдаемое уменьшение вязкости, хотя это явление можно легко объяснить и снижением гидратации ДНК.

Детально изучено влияние на стабильность ДНК одновалентных анионов в высокой концентрации [398]. При нейтральных значениях рН температура плавления ДНК в присутствии 4–7 М соли понижена на 60°, причем анионы располагаются в следующем порядке:



Зависимость устойчивости ДНК к нагреванию от нуклеотидного состава более отчетливо выражена в 7,2 М растворе перхло-

рата натрия (по сравнению с 0,15 М раствором хлористого натрия), и, действительно, обычно узкие области структурного перехода у вирусных ДНК в этом случае заметно расширены. Можно показать, что частичная денатурация является обратимым процессом, протекающим с большой скоростью; вполне вероятно, что в таких условиях для каждой молекулы ДНК переход спираль — клубок при нагревании происходит в относительно широкой области температур, что вызвано внутримолекулярной гетерогенностью ее нуклеотидного состава и последовательности. Такие денатурирующие вещества рассматривают обычно как агенты, расщепляющие «гидрофобные связи», которые благодаря своему влиянию на структуру воды [398], по-видимому, изменяют суммарную гидратацию макромолекулы.

При любой данной температуре ионная сила среды заметно влияет на ультрафиолетовое поглощение денатурированной ДНК. При увеличении концентрации хлористого натрия от 10^{-3} до 1,0 М значение $\epsilon_{\text{макс}}$ (для денатурированной нагреванием ДНК) понижается и при комнатной температуре; при 0° эффективная область смещена в сторону более низких значений ионной силы (10^{-5} – 10^{-2} М). Такие двухвалентные катионы, как магний, кальций или барий, примерно в 100–1000 раз более эффективны, чем моновалентные ионы [267–271]. Двухвалентные катионы оказывают максимальное влияние на оптическое поглощение при соотношении 0,7 эквивалента катиона на один фосфатный остаток. Изучение электропроводности также указывает на то, что двухвалентные катионы связываются прочнее, чем одновалентные ионы. Тем не менее двухвалентные катионы связываются с ДНК обратимо и могут быть вытеснены избытком ионов натрия [261]. Так, величина ϵ_{260} для денатурированной нагреванием ДНК из зубной железы теленка (в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М в расчете на фосфатные остатки) в $4 \cdot 10^{-5}$ М растворе Mg^{2+} равна 7300, но при добавлении хлористого натрия до концентрации 10^{-2} М ϵ_{260} возрастает до 8600. Увеличение концентрации ионов натрия до 10^{-1} М понижает оптическое поглощение обычным образом до $\epsilon_{260} = 7800$. При рН 12 ионная сила (вплоть до 1 М хлористого натрия) не оказывает влияния на оптическую плотность денатурированной ДНК [271]. По-видимому, при этом значении рН все водородные связи разрушаются, и упорядоченная вторичная структура полностью исчезает.

Если в солевом растворе при комнатной температуре мочевины в концентрации 6 М не влияет на оптическое поглощение нативной ДНК (но понижает ее температуру плавления), то она значительно повышает оптическое поглощение денатурированной ДНК, что указывает на разрушение слабых неспецифических водородных связей [272] или относительно коротких упорядоченных участков.

Уменьшение оптического поглощения с увеличением ионной силы при нейтральных значениях pH, возможно, является результатом образования более упорядоченной структуры (структуры, поддерживаемой водородными связями) и последующего уменьшения суммарного заряда ДНК, причем особенно эффективными являются двухвалентные катионы. Можно заметить, что соли (вплоть до 1 М хлористого натрия) не влияют на оптическое поглощение химически синтезированных полиадениловой, полицитидиловой или полиуридилловой кислот с короткой цепью (с беспорядочными 2'—5'- и 3'—5'-связями и со средней длиной цепи приблизительно 9 нуклеотидов) [261]. Однако химически синтезированная полигуаниловая кислота даже с малой длиной цепи легко образует агрегаты, связанные водородными связями, и ее оптическое поглощение в солевом растворе ниже, чем в чистой воде (в 0,1 М растворе хлористого натрия ниже на 2,5%, в 1 М растворе хлористого натрия — на 6,5% и в 0,1 М растворе сульфата магния — на 6%). И в этом случае величина ионной силы оказывает заметное влияние на значение рК (11,65 в воде, 10,3 в 1 М растворе хлористого натрия; 2,70 в воде и 2,20 в 0,01 М растворе сульфата магния). Таким образом, денатурированную ДНК можно рассматривать как агрегат, состоящий из полидезоксинуклеотидных цепей, содержащих участки, связанные (специфическими или какими-то другими) водородными связями, за счет которых эти цепи, по-видимому, удерживаются одна возле другой; эти участки имеют непрерывный ряд температур плавления от 0 до 100°. Беспорядочные водородные связи и упорядоченные участки различной длины, обладающие различной устойчивостью, разрушаются не кооперативно, вследствие чего с увеличением температуры ультрафиолетовое поглощение непрерывно возрастает.

ВЛИЯНИЕ pH

Ранее мы уже рассматривали изменение ультрафиолетового поглощения олигонуклеотидов по сравнению с изменением ультрафиолетового поглощения их мононуклеотидных компонентов (т. е. явление гипохромизма) при ионизации оснований. В случае же нативных ДНК при предельных значениях pH происходят еще большие изменения и становится ясным, что гиперхромный эффект связан главным образом с разрушением двухспиральной структуры, происходящим вследствие разрыва водородных связей. Кривые прямого и обратного спектрофотометрического титрования ДНК (рис. 8-25) не совпадают, причем гистерезисный эффект обусловлен ее денатурацией в щелочном или кислотном растворе. И в этом случае ионная сила среды сильно смещает значения pH, при которых происходит резкое возрастание оптического поглоще-

ния, причем при увеличении ионной силы происходит смещение кажущихся значений рК в сторону более низких величин [263, 265, 266]. Двухвалентные катионы, например магний или барий,

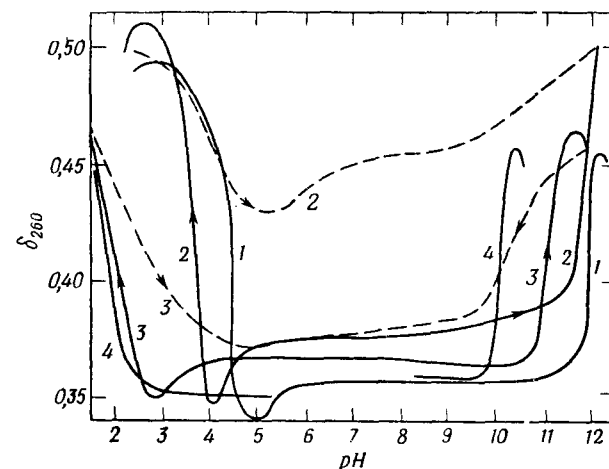


Рис. 8-25. Спектрофотометрическое титрование ДНК из зубной железы телят.

— титрование в прямом направлении от pH 7; — — — титрование в обратном направлении. 1 — в 0,001 М NaCl; 2 — в 0,01 М NaCl; 3 — в 1 М NaCl; 4 — в 4,5 М LiCl [261].

вызывают аналогичный эффект при значительно более низкой концентрации ионов. В табл. 8-5 приведены приблизительные значения

Таблица 8-5

Концентрация NaCl, М	pH _{1/2}
0 (H ₂ O)	7,2
10 ⁻³	4,7
10 ⁻²	4,1
0,2	3,1
1,0	2,8

pH_{1/2} (т. е. тех значений pH, которые соответствуют точке перегиба на кривой зависимости оптического поглощения от pH) при кислотном титровании ДНК из зубной железы телят при различных концентрациях хлористого натрия.

Дальнейшее изучение спектрофотометрического кислотного титрования ДНК (из зобной железы телят) показало, что изменения в ее спектрах до начала денатурации (т. е. до начала быстрого возрастания оптического поглощения), которые происходят при рН 2,59 и 0° и при рН 3,32 и 30°, обусловлены протонированием цитозиновых остатков [273]. Был сделан вывод, что при 0°, когда каждый адениновый и цитозиновый остатки протонированы, структура стабильна, а поэтому титрование обратимо вплоть до этой точки; но в том случае, когда протонируются гуаниновые остатки, происходит денатурация (что находится в соответствии с ранними наблюдениями). Контролируемые изменения рН или температуры, приводящие к частичной денатурации, указывают на гетерогенность ДНК [273]. Однако определение области значений рН, при которых происходит денатурация, и изучение изменений значений $pH_{1/2}$ (рН, при которых денатурация происходит на 50%) для ДНК, содержащих различные количества гуанина и цитозина, указывали на то, что, хотя кислотная денатурация при высокой ионной силе происходит скачкообразно, ее все же нельзя отнести к процессам типа «все или ничего». Гетерогенность по составу сама по себе еще не объясняет расширения области структурного перехода при кислотной денатурации [274]. Можно ожидать, что, для того чтобы вызвать денатурацию при более низких температурах, необходима более высокая степень протонирования, причем кривые должны быть смещены в сторону более низких значений рН. Так, при 30° $pH_{1/2}$ равен 3,07 (для ДНК из зобной железы телят, $\mu = 0,1 M$), а при 0° это значение снижается до 2,25. Увеличение содержания гуанин-цитозиновых пар также понижает рН, при которых происходит денатурация, но это смещение относительно мало [274].

Денатурированные кислотой, щелочью или нагреванием дезоксирибонуклеиновые кислоты при спектрофотометрическом титровании ведут себя совершенно иным образом. Оптическая плотность увеличивается значительно меньше, это увеличение происходит в более широкой области значений рН, и как кислотная, так и щелочная ионизация смещены в сторону значений рН, более близких к нейтральным, чем у нативной ДНК при той же ионной силе. Титрование в значительной мере обратимо, так же как и кривые обратного титрования от рН 2,5 или рН 12 после титрования (или денатурации) нативной ДНК при комнатной температуре.

Необычная крутизна и асимметричная форма кривых прямого титрования нативной ДНК, по-видимому, обусловлены одновременным разрывом большого числа водородных связей, что приводит к сильным конформационным изменениям. С другой стороны, при титровании денатурированной ДНК разрыв водородных связей происходит более или менее равномерно, что указывает на наличие

широкого распределения коротких участков, связанных водородными связями, различных по своему составу и устойчивости по отношению к ионизации. Структура нативной ДНК такова, что местные электростатические поля, возникающие вследствие ионизации неэкранированных фосфатных групп, играют основную роль в смещении значений рК оснований. Поэтому влияние возрастающей ионной силы должно быть меньше при тех значениях рН, при которых происходит сильное увеличение оптического поглощения, связанное с ионизацией оснований и разрушением структуры. При любой данной ионной силе местный электростатический потенциал ионизированных фосфатных групп будет стремиться к равномерному распределению вдоль структуры, но если ДНК нативна, то размазывания потенциала не происходит. Протонирование некоторых из оснований вызывает эффекты, также связанные только с местными электростатическими потенциалами, а значения рК остаются постоянными до тех пор, пока структура остается не нарушенной. В случае денатурированной ДНК благодаря компактной клубкообразной структуре влияние свободных фосфатных групп равномерно распределено по всей области, которую занимает полимер, а основной электростатический потенциал не зависит от локализации зарядов и имеет постоянную величину на протяжении всей молекулы [275]. Влияние протонирования некоторых отдельных оснований (или ионизации групп — NH — CO —) также равномерно распределено по всей молекуле, вследствие чего значения рК являются постоянной функцией рН (так как местный электростатический потенциал является постоянной функцией протонирования или ионизации), а резкие спектроскопические изменения больше не происходят. При увеличении концентрации ионов местный электростатический потенциал, а следовательно, и значения рК понижаются.

РАСТВОРЫ ДНК В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

Соли полинуклеотидов с аминами с длинной алкильной цепью, например с три-*n*-октиламином, растворимы в ряде органических растворителей, включая этиловый спирт, диоксан и диметилформамид [261]. Четвертичные аммониевые соли ДНК и РНК, полученные с помощью бромистого цетилтриметиламмония [276], нерастворимы в воде, но растворимы в диметилформамиде или этиловом спирте [277]. Вообще, для того чтобы соль ДНК заметно растворялась в неводном растворителе, необходимо наличие, по крайней мере, одной алкильной цепи в амине (участвующем в образовании соли), содержащей более 12 атомов углерода. При добавлении концентрированных растворов хлористого натрия к спиртовому раствору четвертичной аммониевой соли нуклеиновой кислоты

нуклеат натрия выпадает в осадок [277, 278]. При растворении в этиловом спирте и последующем осаждении в виде натриевой соли РНК из вируса табачной мозаики не теряет своей инфекционности [279], а транспортные РНК сохраняют свою биологическую активность [318].

Дезоксирибонуклеат натрия сам по себе растворим в формамиде и диметилсульфоксиде [261, 280], однако ни одно из этих веществ не может быть использовано в качестве растворителя. Дело в том, что растворение ДНК (или РНК) в формамиде или диметилсульфоксиде приводит к ее денатурации. На исчезновение вторичной структуры указывает низкое удельное вращение (которое не зависит от температуры) нуклеиновой кислоты в этих растворителях, а после выделения нуклеиновой кислоты из раствора ее оптические и гидродинамические свойства сходны со свойствами препаратов, денатурированных нагреванием [281]. Противоположное направление оптического вращения, обнаруженное при изучении дисперсии оптического вращения нуклеиновых кислот (но не мононуклеотидов) в воде и органических растворителях, также указывает на переход спираль — клубок [281, 282]. Денатурация ДНК из пневмококков формамидом при данной ионной силе и температуре происходит при критической концентрации (около 60% по объему) формамида и сопровождается потерей трансформирующей активности. При удалении формамида диализом ренатурация ДНК не происходит, и для восстановления биологической активности необходима последующая тепловая обработка ДНК (при температурах ниже температуры плавления) [283]. С помощью центрифугирования в градиенте плотности было показано, что при растворении в формамиде происходит разделение меченных N^{14} — N^{15} -цепей гибридной ДНК из *E. coli*. При использовании диметилформамида денатурация ДНК происходит при значительно меньшей концентрации органического растворителя в водном растворе, чем в случае формамида [284, 402].

Спиртовые растворы дезоксирибонуклеата натрия легко получить диализом его водных растворов против этилового спирта со все возрастающей концентрацией [285]. Приблизительно в 65%-ном этиловом спирте происходит довольно резкое увеличение скорости седиментации, а радиус инерции макромолекулы уменьшается примерно втрое, хотя никаких существенных изменений в молекулярном весе (светорассеяние) не наблюдается. Эквивалентная электропроводность растворов ДНК в 95%-ном этиловом спирте составляет примерно 1% от электропроводности в водном растворе, по-видимому, вследствие образования большего числа ионных пар между ионами натрия и фосфатными группами [286]. С помощью диализа одноцепочечной ДНК из фага ϕ X-174 против водных растворов диметилформамида или 2-метоксиэтанола также было

показано, что в растворах с низкой диэлектрической проницаемостью суммарный заряд ДНК близок к нулю [287]; полинуклеотиды с длиной цепи больше 10 нуклеотидов в обычных условиях и в водном растворе не проходят через полупроницаемую перегородку даже при высокой концентрации соли.

Физические свойства растворов ДНК в этиловом и метиловом спиртах (полученных градиентным диализом) были детально изучены [288]. При этом макромолекулярные и оптические критерии (повышенная скорость седиментации, пониженная вязкость, уменьшенный радиус вращения, высокое оптическое поглощение) указывают на денатурацию. И хотя разрушение вторичной структуры, судя по макромолекулярным и оптическим критериям, протекает, по-видимому, полностью, денатурация в метанольном растворе происходит быстро, а при добавлении воды легко происходит ренатурация. При нагревании растворов с высоким содержанием метилового спирта также наблюдаются необратимые структурные переходы, но и в этом случае при добавлении воды происходит ренатурация. Таким образом, оказалось, что в метанольном растворе могут быть получены две формы «денатурированной» ДНК, причем обе они отличаются от ДНК, денатурированной в водном растворе [284]. Если денатурация ДНК многими органическими растворителями (включая диметилформамид) легко обратима при добавлении водных растворов электролитов, то денатурация в диметилсульфоксиде протекает необратимо [402].

Добавление этилового (или метилового) спирта к водным растворам ДНК в присутствии электролитов понижает ее температуру плавления [288]. Считается, что уменьшение стабильности двойной спирали ДНК в этиловом и метиловом спиртах, формамиде, диметилформамиде [402] и в других органических растворителях (аналогичные результаты получены для растворов в этиленгликоле и глицерине) [289] подтверждает концепцию о том, что стабильность спирали в водном растворе обеспечивается главным образом «гидрофобными взаимодействиями» между относительно неполярными остатками в макромолекуле. Такие «взаимодействия» являются следствием, в первую очередь, более высокой стабильности, свойственной раствору, в котором степень взаимодействий типа растворитель — растворитель достигает максимальной величины [288]. Предполагалось также существование гидратированных противоионов между заряженными фосфатными группами, так как можно было ожидать, что этанол должен разрушать любую кристаллическую решетку гидратной оболочки [290].

Однако если в водном растворе ДНК несомненно гидратирована молекулами воды, связанными с ней водородными связями, то не существует никаких доказательств, что (выше 0°) имеется оболочка, построенная из молекул воды, образующих ледообразную

решетку, настолько упорядоченная, чтобы она сохранялась вплоть до температуры плавления (85—95°). Хотя гидратация играет здесь определенную роль, как это видно, например, из увеличения чувствительности ДНК к денатурации в 6—8 М растворе мочевины (мочевина не денатурирует ДНК, но может «денатурировать» синтетические полимеры, в которых образование водородных связей, по-видимому, невозможно вследствие блокирующего влияния гидратной оболочки [291]); другими причинами жесткости двухспиральной структуры могут быть прямое взаимодействие между гетероциклическими основаниями в одной и той же цепи вдоль оси, а также наличие водородных связей, перпендикулярных (или наклоненных на 10—20°) оси спирали. Еще одной причиной жесткости нативной ДНК в водном растворе является отталкивание свободных ионизированных фосфатных групп вдоль оси. Фактически полное исчезновение таких растягивающих сил при образовании ионных пар в органическом растворителе, которое, возможно, сопровождается отклонением плоскости оснований и изменением шага двойной спирали, может привести к сильному увеличению гибкости, если не к разрушению макромолекулы. Кроме того, растворители с диэлектрической проницаемостью, отличающейся от диэлектрической проницаемости воды, должны оказывать влияние и на другие факторы. Так, растворители с низкой диэлектрической проницаемостью должны существенно влиять как на прочность водородной связи, так и на π -электронное взаимодействие между молекулами, независимо от блокирующего влияния гидратной оболочки. Легкая обратимость процесса «денатурации» в метиловом спирте указывает на то, что фактически цепи не разделяются и что физические эффекты просто отражают сильное увеличение скрученности. Нет смысла сопоставлять здесь гиперхромизм с разрывом водородных связей (существует ошибочное представление, что образование водородных связей само по себе понижает оптическое поглощение). Так как в любом случае в результате влияния диэлектрической проницаемости среды на π -электронное взаимодействие ультрафиолетовое поглощение будет изменяться, вполне может оказаться, что образцы остаются в значительной степени связанными водородными связями, но двойная спираль довольно сильно «раскручивается» с образованием значительно более гибких «линейных» двойных спиралей, способных беспорядочно свертываться. В связи с этим желательно было бы иметь данные о свойствах мононуклеотидов (в виде три-*n*-бутиламмониевых солей) в органических растворителях.

Спиртовой раствор денатурированной нагреванием ДНК можно легко получить путем медленного прибавления горячего спирта к водному раствору дезоксирибонуклеата натрия, нагретому выше температуры плавления ДНК [261]. Высокое оптическое погло-

щение этих растворов (ϵ_{260}^p 9800 у денатурированной ДНК из зобной железы теленка в 98%-ном спирте) указывает на то, что упорядоченная структура отсутствует, хотя вращение вокруг межнуклеотидных связей все еще продолжает оставаться затрудненным. При растворении препаратов в воде ϵ_{260}^p понижается до 8650, а в 0,1 М растворе хлористого натрия было получено значение 7800.

Были получены метанольные растворы полиадениловой кислоты, синтезированной ферментативно. Как это видно из табл. 8-6, в этих растворах сильно возрастает константа седиментации, понижается

Таблица 8-6

Характеристика	Полиадениловая кислота	
	в воде (0,001 М CH ₃ COONa)	в метиловом спирте (0,001 М CH ₃ COONa)
Константа седиментации	6,9	50
Характеристическая вязкость	16,8	0,26
Оптическое вращение $[\alpha]_D$	+100°	—25°
ϵ_{260}^p при 20°	9 500	13 600
ϵ_{260}^p при 50°	12 400	13 600

ϵ_{260} для адениловой кислоты в воде = 15 000

характеристическая вязкость, уменьшается оптическое вращение и увеличивается оптическое поглощение. Можно заметить, что остаточный гипохромный эффект в метанольном растворе полиадениловой кислоты составляет примерно 10%, что указывает на некоторую остаточную упорядоченную укладку адениновых остатков, но и в этом случае для сравнения было бы желательно иметь данные о величине $\epsilon_{\text{макс}}$ мономера в метиловом спирте.

НАТИВНАЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНАЯ ДНК

В то время как большинство выделенных дезоксирибонуклеиновых кислот обладают комплементарной двухцепочечной спиральной структурой, в некоторых источниках, например в вирусе оспы [293] и бактериофаге S13 [294], были найдены одноцепочечные ДНК. Впервые наличие таких ДНК было обнаружено при изучении свойств ДНК из бактериофага ϕ X-174 [287]. Этот фаг представляет собой частицы с молекулярным весом $6,2 \cdot 10^6$ и содержит 25 вес.% ДНК с молекулярным весом $1,7 \cdot 10^6$, причем в одной

вирусной частице содержится одна молекула ДНК [295]. Нуклеотидный состав ДНК, выделенной из этого фага фенольной экстракцией, не характерен для нуклеиновых кислот, состоящих из двух комплементарных цепей; эта ДНК осаждалась ионами свинца и реагировала с формальдегидом, что указывало на отсутствие структуры, связанной прочными водородными связями, в образовании которых принимают участие 6-аминогруппы пуриновых и пиримидиновых оснований. Далее, ультрафиолетовое поглощение этой ДНК зависит от температуры в области от 20 до 60° и от ионной силы в пределах от 10^{-3} до 1 М. Оптическое поглощение ДНК в 0,2 М растворе хлористого натрия ($\epsilon_{\text{макс}}$ 8000) значительно выше, чем у нативной двухцепочечной ДНК, а ее свойства напоминают свойства обычных ДНК после тепловой денатурации [287]. Исследования методом светорассеяния показали, что ДНК из бактериофага ϕ X-174 является исключительно гибкой и ее конформация сильно зависит от ионной силы раствора. Было найдено, что в 0,02 М растворе хлористого натрия при 37° радиус инерции молекулы составляет 1140 Å, а в 0,2 М растворе хлористого натрия он уменьшается до 440 Å. Ионы магния при такой концентрации значительно более эффективны. При гидролизе полимера панкреатической дезоксирибонуклеазой средний молекулярный вес ДНК уменьшается в такой зависимости, которую можно было ожидать для одноцепочечной молекулы.

Только что описанный метод — изучение кинетики ферментативного гидролиза полинуклеотидов — применяется в основном для определения числа цепей в структуре [296, 297]. Метод основан на том, что одноцепочечная структура будет расщепляться при гидролизе хотя бы по одной межнуклеотидной связи, в то время как для расщепления двухцепочечной структуры необходимо, чтобы разрыв произошел, по крайней мере, в двух местах. Если предположить, что существование индукционного периода при понижении молекулярного веса не является результатом первоначального разрыва водородных связей в особых участках молекулы, то с помощью кинетики гидролиза можно различить одно-, двух-, трехцепочечные структуры или структуры с большим числом цепей. Далее, результаты, полученные при действии панкреатической ДНК-азы на ДНК из зубной железы теленка, показали, что минимальное число нуклеотидов между разрывами в двух цепях, при котором сохраняется двухтяжная структура, равно примерно шести. Отсюда ясно, что для того чтобы молекулярный вес ДНК уменьшался, ферментативное расщепление каждой из цепей должно происходить внутри участка из шести нуклеотидных пар (рис. 8-26).

В случае фосфодиэстеразы *E. coli* устойчивость двухспиральных структур к ферментативной атаке проявляется также отчетливо. Фермент лишь очень слабо действует на нативную двухспиральную

ДНК, но очень быстро гидролизует ДНК, денатурированную нагреванием, или ДНК из бактериофага ϕ X-174 до дезоксинуклеозид-5'-фосфатов [298].

Были сделаны попытки обнаружить одноцепочечные ДНК в препаратах из животных источников, причем в качестве теста использовали осаждение ионами свинца. Если двухспиральная нативная ДНК не образует нерастворимого комплекса со свинцом, то денатурированная (нагреванием, кислотой или щелочью) ДНК легко осаждается ионами свинца в виде гранул [299]. Из нативных ДНК гели дезоксирибонуклеатов свинца были получены центрифугированием; ДНК, регенерированная из такого геля, обнаруживает свойства, характерные для одноцепочечного полимера [300].

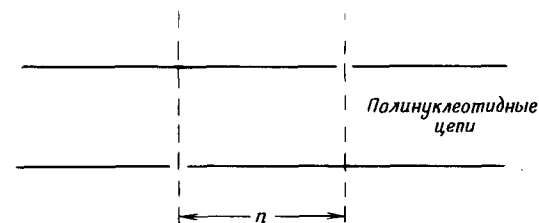


Рис. 8-26. Схема ферментативного расщепления ДНК.
 $n = 6$ или более нуклеотидов; двухцепочечная структура при комнатной температуре сохраняется. $n < 6$ нуклеотидов; происходит разделение цепей.

Одноцепочечную ДНК, кроме того, можно отделить от двухспиральных образцов (и от РНК) с помощью электрофореза [301].

Для того чтобы различить одноцепочечные и двухцепочечные полинуклеотиды *in vivo*, был использован метод, основанный на более высокой чувствительности к ультрафиолетовому облучению пиримидинов по сравнению с пуриновыми основаниями. Экспериментально было найдено, что спектры ультрафиолетового излучения, вызывающего инактивацию бактериофагов ϕ X-174 (содержит однотяжную ДНК) и T2 (содержит двухспиральную ДНК), значительно различаются. В первом случае спектр весьма сходен со спектром ультрафиолетового поглощения смеси дезоксицитидина и тимидина с минимумом при 240 мμ; в случае бактериофага T2 спектр излучения имеет минимум при 230 мμ, как и в спектре поглощения ДНК [302]. Возможное теоретическое объяснение этого явления заключается в том, что в случае двухспиральной структуры перенос поглощенного кванта от пуринов к пиримидинам приводит к примерно равной эффективности всех квантов, независимо от того, поглощены ли они пурином или пиримидином. Благодаря этому спектры излучения, действующего на молекулу, напоминают ультрафиолетовые спектры поглощения

ДНК, а не спектры поглощения пиримидиновых компонентов [302]. Описаны также аналогичные опыты по изучению спектров излучения, действующего на трансформирующую ДНК (из *Neomophilus influenzae*) при температурах выше и ниже ее температуры плавления [303].

ДЕНАТУРАЦИЯ И РЕНАТУРАЦИЯ*

Свойства растворов ДНК находятся в полном соответствии с двухспиральной структурой, в которой относительная жесткость молекулы поддерживается за счет образования параллельных водородных связей между основаниями, а также π -электронных взаимодействий между пуриновыми и пиримидиновыми циклами, упакованными один над другим. В определенных условиях существенное, но не слишком большое значение для стабильности структуры может иметь гидратная оболочка, образованная молекулами воды, связанными водородными связями. Гибкость этой структуры (по сравнению с клубкообразной структурой других полиэлектролитов) весьма мала, но все же ясно, что и в этом случае молекулы слегка скручены. По-видимому, степень этой скрученности зависит от величины электростатических сил отталкивания между фосфатными группами, т. е. от степени экранирования фосфатных групп противоионами, находящимися в окружающей среде. Можно ожидать, что комплексы ДНК с многоосновными аминами, например с полилизинном или спермином (полученными в условиях, в которых исключены поперечное связывание и агрегация), будут обладать повышенной гибкостью, что приводит к большей степени скрученности и меньшему радиусу вращения молекул, как у дезокси-нуклеогистонов.

Обычно денатурация ДНК отражает разрушение упорядоченной вторичной структуры, которое происходит в результате разрыва водородных связей. Этот разрыв может происходить при увеличении температуры, при обработке ДНК кислотой или щелочью, а также при уменьшении концентрации ионов (включая и противоионы) до величины, ниже критической. По-видимому, для начала денатурации ДНК необходим разрыв нескольких водородных связей, но далее этот процесс протекает кооперативно, т. е. разрушение более слабых участков двойной спирали (в случае тепловой денатурации эти участки могут состоять в основном из адениновых и тиминовых остатков) уменьшает стабильность соседних участков и ведет к быстро прогрессирующему разрушению структуры. Таким образом, различия в степени денатурации данного препарата отражают гетерогенность образцов ДНК по составу

* См. также статью: Мармур Д., Раунд Р. и Шильдкраут К. в сб. «Нуклеиновые кислоты», Изд. «Мир», М., 1965. — Прим. перев.

(и, возможно, по последовательности нуклеотидов), а денатурация на молекулярном уровне есть процесс типа «все или ничего», который приводит к образованию смеси полностью денатурированных и нативных молекул. Такой процесс характеризуется обратимостью образования водородных связей. Вследствие этого (если еще не наступил тот момент, когда происходит разрушение всей структуры) вторичная структура относительно коротких разрушенных участков может заново восстанавливаться, если исключить условия, вызвавшие денатурацию.

Тем не менее на основании длины спирали ДНК можно заключить, что частичная денатурация вполне возможна, если последовательность нуклеотидов содержит довольно длинные участки, состоящие из гуанин-цитозиновых пар, и соответствующие промежутки, которые содержат в основном аденин-тиминовые пары. Микрофотографии ДНК, денатурированной при разбавлении ее растворов [304], подтверждают это заключение. Нативные ДНК выглядят как длинные и довольно прямые нити, тогда как денатурированная нуклеиновая кислота образует аморфные «узлы». Иногда, однако, удается наблюдать [160, 304] остатки нитей, на концах или в центре которых находятся «узлы», что указывает на то, что процесс денатурации может приостанавливаться на относительно устойчивых участках цепи.

Хотя при денатурации вследствие разрыва водородных связей и происходит разрушение спиральных структур до беспорядочно свернутых образований, при этом далеко не всегда наблюдается двукратное уменьшение молекулярного веса, которое соответствует разделению двух цепей. Однако необходимо помнить, что определение молекулярного веса часто проводится в условиях, в которых может происходить денатурация (высокая температура, предельные значения pH, концентрация ДНК и ионная сила ниже 10^{-4} М), и, по-видимому, причина отсутствия изменения в молекулярном весе кроется в том, что при быстром разрушении структуры в какой-то момент была достигнута критическая точка денатурации. В результате этого небольшие участки молекулы, связанные водородными связями, могли «переплестись» и образовать беспорядочно скрученную структуру, что препятствовало дальнейшему ее разрушению. Из свойств олигонуклеотидов, синтезированных химическим или ферментативным путем, ясно, что участки, состоящие из 3—6 пар оснований, связанных водородными связями, имеют достаточные размеры, чтобы препятствовать диссоциации двух цепей. В тех случаях, когда денатурированная ДНК сильно вытянута (низкая ионная сила), диссоциация возможна. Недавними работами показано, что в 0,2 М солевом растворе тепловая денатурация ДНК сопровождается внутримолекулярной ассоциацией, а также возникновением большого числа разнообразных конфор-

маций цепей ДНК. Однако в 0,01 М растворе соли и при низкой концентрации нуклеиновой кислоты (менее 0,1 г/л) денатурированная ДНК ведет себя как одноцепочечная структура [305]. Измерения молекулярного веса ДНК из *E. coli* до и после денатурации показывают, что в этих условиях он уменьшается от $10,5 \cdot 10^6$ до $5 \cdot 10^6$.

То, что после тепловой денатурации ДНК является однотяжной, было показано также несколько иным методом. Была изучена кинетика теплового разрушения ДНК (при 95°) и РНК (при 80°), причем контроль за денатурацией осуществляли путем измерения вязкости препаратов [306]. В случае РНК из опухоли Леттрэ — Эрлиха наклон кривой (0,86) указывал на наличие однотяжной структуры; в случае ДНК в течение первых 30 мин наклон кривой был 1,1, а затем уменьшался, но двухцепочечной структуры при 95° для ДНК вообще не было обнаружено. Следует заметить, что изучение кинетики ферментативного гидролиза ДНК, денатурированной нагреванием, может привести к ошибочным выводам. Действительно, двухспиральные структуры, которые заново образуются при охлаждении (либо из одной и той же, либо из различных цепей), могут оказаться достаточно устойчивыми, и кинетика их гидролиза будет сходна с кинетикой гидролиза двухцепочечной ДНК дезоксирибонуклеазой.

При обращении условий денатурации значительная часть водородных связей реконструируется. В концентрированных растворах ДНК это, по-видимому, приводит к поперечному сшиванию и агрегации и отсюда — к образованию гелей. В менее концентрированных растворах такая реконструкция, вероятно, происходит даже при быстром охлаждении, и, кроме беспорядочных водородных связей, при этом возникают спиральные участки из комплементарных пар оснований. Это происходит, по-видимому, в результате локального «зондирования» и выбора наиболее устойчивой конформации, так как участки каждой из цепей должны обладать достаточной свободой передвижения относительно друг друга. Денатурированная ДНК характеризуется значительным гиперхромизмом при нагревании, что и указывает на такую реконструкцию. Натриевые соли ДНК, денатурированной нагреванием, дают диффузные рентгенограммы В-типа, но интенсивность рентгенограмм показывает, что большая часть спиральных структур образовалась заново беспорядочным образом [307]. Для денатурированной ДНК водородные связи могут образовываться самыми различными способами, но основными, по-видимому, будут пары оснований с водородными связями между 6-амино- и 6-кетогруппами, т. е. цитозин-тиминовые и аденин-гуаниновые комбинации наряду со специфическими аденин-тиминовыми и гуанин-цитозиновыми.

Определены оптимальные условия ренатурации ДНК после ее тепловой денатурации [308]. Концентрация ионов натрия должна быть выше 0,4 М, а температура на 25° ниже температуры плавления. Так как переход спираль — клубок воспроизводим (в отношении физических свойств и тепловой инактивации биологических маркеров), при охлаждении образуется та же вторичная структура, а сколько-нибудь заметного образования неспецифических водородных связей не происходит. Полнота ренатурации увеличивается с увеличением молекулярного веса ДНК и, как и следовало ожидать, заметно зависит от гомогенности препарата. Степень реконструкции вторичной структуры убывает в последовательности для ДНК из бактериофага > мелких бактерий > животных тканей, и этот порядок отражает изменение числа различных молекул ДНК и различие нуклеотидного состава, которыми характеризуется каждый из источников ДНК [308]. Как было показано фракционированием ренатурированной трансформирующей ДНК при помощи ультрацентрифугирования в градиенте плотности, ренатурация не относится к процессам типа «все или ничего», а образование двойной спирали вновь после разрушения может происходить в различной степени [309]. В основном это есть результат случайного расщепления ковалентных связей в полинуклеотидной цепи при нагревании. При стандартных условиях тепловой денатурации и последующего охлаждения можно рассчитать, что в каждой цепи ДНК с молекулярным весом 10^7 может происходить в среднем по три разрыва. Поэтому в процессе ренатурации будут участвовать комплементарные цепи с длиной, различающейся на $1/4$ — $1/2$, что понижает ренатурацию на 20—30% [310]. Действительно, на микрофотографиях часто наблюдаются клубки на одном или на обоих концах ренатурированных цепей, которые соответствуют выступающим концам однотяжных цепей.

Процесс полного разделения и рекомбинации цепей с последующим образованием гибридных молекул ДНК, в которых каждая из цепей выделена из различных источников, был детально изучен [310]. Использование N^{14} — N^{15} биологической «гибридной» ДНК (в которой N^{15} мечена только одна из цепей) в сочетании с равновесным центрифугированием в градиенте плотности показало, что кинетика разделения этой ДНК на две одноцепочечные субъединицы (которую можно было измерить по исчезновению гибридной полосы или по появлению полос однотяжных структур, причем каждый компонент обладал характеристической плотностью) находится в соответствии с рассчитанной [311] скоростью расплетания двойной спирали со сравнимой длиной цепей, внутри которой отсутствуют связи, удерживающие эти цепи вместе. При 100° в 0,15 М растворе хлористого натрия, содержащем 0,015 М цитрата натрия, разделение цепей ДНК заканчивается за 60 сек. В соот-

ветствии с теоретическим предсказанием [312] это время удлиняется с увеличением вязкости раствора как за счет использования концентрированных растворов сахарозы, так и растворов ДНК более высоких концентраций. Ренатурация бактериальной ДНК (в приблизительно 0,3 М растворе хлористого натрия, содержащем 0,03 М цитрата натрия) происходит практически полностью примерно за 3 часа при 68°. Вполне возможно, что ренатурация более гомогенной ДНК из бактериофага протекает значительно быстрее.

Мы уже упоминали об однотяжных участках, которые выступают наружу по концам молекул ренатурированной ДНК. При изучении образования гибридных молекул ДНК *in vitro* эти аномальные неспаренные однотяжные участки необходимо отделить, так как они будут способствовать беспорядочной агрегации. Это легко сделать, обработав препарат фосфодиэстеразой *E. coli* (которая избирательно гидролизует одноцепочечную ДНК); при этом небольшие различия (например, в плотности) между нативной и ренатурированной ДНК уменьшаются. Когда смесь, состоящую из полностью меченной тяжелым изотопом (N^{15} или H^2) бактериальной ДНК и обычной ДНК, сначала денатурировали, а затем, ренатурировали (тепловая диссоциация, охлаждение и, наконец, обработка диэстеразой), то после центрифугирования в градиенте плотности в растворе хлористого цезия наблюдались три полосы, одна из которых соответствовала тяжелым (ренатурированным), другая «гибридным», а третья — легким (денатурированным) молекулам ДНК. Как и следовало ожидать, вследствие случайного спаривания количество гибридных молекул было вдвое больше, чем количество легкого и тяжелого компонентов. Поэтому цепи, которые спариваются при ренатурации, не есть те же цепи, которые были связаны друг с другом в молекулах нативной ДНК, а являются комплементарными цепями, первоначально находившимися в разных клетках [310].

Те же пропорции тяжелых «гибридных» и легких молекул ДНК были получены, когда «гибридная» ($H^1 + N^{14} : H^2 + N^{15}$) молекула ДНК была сначала денатурирована, а затем ренатурирована. Что же касается образования гибридов для дезоксирибонуклеиновых кислот из различных бактерий (за их образованием легко проследить, если взять нормальную ДНК из одного источника и тяжелую из другого), то оно возможно только в том случае, когда два препарата ДНК имеют одинаковый общий нуклеотидный состав. Но это само по себе еще не является достаточным для гибридизации, так как для образования гибрида необходимо и значительное сходство в последовательности расположения нуклеотидных остатков. Параллелизм в генетической совместимости и образовании гибридных ДНК *in vitro* привел к пред-

положению, что организмы, ДНК которых способны давать гибридные молекулы, связаны между собой генетически и таксономически [310].

Образовавшиеся «гибридные» ($N^{14} - N^{15}$) молекулы ДНК после денатурации всеми известными методами (нагревание, обработка формамидом, кислотой, щелочью или концентрированной мочевиной при 50—70°) дают две различающиеся по плотности полосы (например, нативная $N^{14} - N^{15}$ -ДНК с плотностью 1,717 дает легкую N^{14} -полосу, соответствующую плотности 1,717, и тяжелую N^{15} -полосу, соответствующую плотности 1,740; кроме того, при увеличении плотности происходит изменение конформации), что указывает на разделение цепей. Однако в противоположность результатам, полученным с этиловым и метиловым спиртами, было обнаружено, что если удалить агент, разрушающий водородные связи, то ренатурации не происходит, и что вообще это возможно только в случае тепловой денатурации. Вероятно, при комнатной температуре броуновское движение участков цепей настолько ограничено, что они не могут найти соответствующие комплементарные участки и образовать «центры» ренатурации. Кроме того, значительная часть участков молекулы «законсервирована» в виде хаотических переплетений [310], или, что более вероятно, короткие участки цепей спарены ошибочным образом (т. е. не с теми участками цепей, с которыми они должны быть связаны в нативной молекуле ДНК). («Ренатурация» полирибонуклеотидных комплексов, например полиаденилил-полиуридилевой кислоты, при комнатной температуре происходит очень быстро.)

Процесс ренатурации ДНК можно подразделить на медленный процесс, который необходим для преодоления относительно высоких барьеров после полной денатурации, и процесс быстрой ренатурации вокруг остаточных «центров» первоначальной конформации. Считается, что второй процесс может происходить при частичной денатурации, когда разрушено до 95% пар оснований [313]. Эти центры — участки, построенные, по-видимому, из 10—20 гуанин-цитозиновых пар — составляют лишь небольшую часть пурин-пиримидиновых пар оснований; дополнительная стабильность, связанная с остаточной вторичной структурой, варьирует у ДНК, выделенных из различных источников. При температурах, близких к температуре начала плавления двойной спирали, число и размеры несвязанных участков колеблются. Количество таких разрушенных фрагментов быстро возрастает при температуре, близкой к критической [257, 314]. Это можно легко проследить при нагревании ДНК в присутствии формальдегида [314 315] (оксиметилирование основных нуклеозидов предшествует разрушению водородной связи), который снижает температуру структурного перехода примерно на 10°. Это понижение, по крайней

мере частично, можно отнести за счет того, что оксиметилирование аминокрупп нуклеозидов препятствует установлению равновесия между нативной и денатурированной ДНК [314]. Таким образом, при температурах, при которых не наблюдается заметных гиперхромных эффектов, реакция ДНК с формальдегидом может быть проконтролирована спектрофотометрически, по изменению вязкости в зависимости от температуры и по изменению антигенной активности (которая зависит от количества оснований, не связанных водородными связями). На микрофотографиях ДНК, обработанной формальдегидом, видны размытые денатурированные участки полинуклеотидов, присоединенные к структурно незатронутым линейным цепям [316]. При диализе раствора оксиметилированной ДНК в буферном растворе при pH 8,5 восстанавливается ультрафиолетовое поглощение, характерное для нативной ДНК, т. е. при удалении оксиметильных групп происходит ренатурация. Ренатурацию можно также доказать иммунохимически; при ренатурации антигенная активность восстанавливается на 30%, что указывает на определенные остаточные нарушения, которые не удается проследить спектрофотометрически [314].

Описаны аналогичные опыты по иммунологическому изучению тепловой денатурации и ренатурации ДНК из бактериофага T4 [317]. Глюкозилированные оксиметилцитозиновые остатки, по крайней мере частично, отвечают за образование антител. Эти детерминирующие группы вполне доступны в денатурированной ДНК, но не в нативной или ренатурированной ДНК. Таким путем удалось показать, что процесс ренатурации ДНК является бимолекулярным, зависит от ионной силы и характеризуется оптимумом температуры при 55°. Доказана также и гетерологическая ренатурация ДНК из фагов T2 и T6 [317].

Формальдегид сильно препятствует образованию водородных связей в денатурированной ДНК [395—397], стабилизируя довольно вытянутую конформацию ее молекул; это приводит к уменьшению устойчивости по отношению к ферментативному гидролизу и намного увеличивает эффективность образования комплексов антиген — антитело [396]. На микрофотографиях ДНК, обработанной формальдегидом, видны длинные тонкие нити с диаметром, значительно меньшим, чем у нативной ДНК [397]. Очень удачные микрофотографии были получены для денатурированной ДНК, обработанной диазониевой солью 8-амино-1,3,6-нафталин-трисульфокислоты (связывающейся, по-видимому, с C₈ гуаниновых остатков) с последующим прокрашиванием уранилацетатом в разбавленном растворе формальдегида. Маркер отчетливо виден на микрофотографии, и вполне вероятно, что этот метод может быть использован для электронномикроскопического определения последовательности оснований в нуклеиновых кислотах [397].

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Тогда как большинство дезоксирибонуклеиновых кислот обладают спиральной структурой, образуемой двумя комплементарными цепями, физические свойства рибонуклеиновых кислот указывают на то, что они представляют собой однотяжные полинуклеотиды. Среди РНК довольно редко встречаются препараты с комплементарным составом, у которых бы отношение урацила к аденину и гуанина к цитозину равнялось единице. У многих РНК сумма 6-аминонуклеозидов равна сумме 6-кетонуклеозидов, но этот показатель является менее специфическим. Тем не менее рибонуклеиновые кислоты обладают несомненной вторичной структурой, хотя оказалось, что их конформации менее устойчивы, чем конформация дезоксирибонуклеиновых кислот. В случае рибонуклеиновых кислот делать какие-либо обобщения очень рискованно, поэтому в настоящее время все известные РНК можно подразделить лишь на три основных класса. Во-первых, это вирусные РНК с высоким молекулярным весом (порядка $2 \cdot 10^6$), во-вторых, микросомальные РНК (включая информационные РНК) также с высоким молекулярным весом ($1 \cdot 10^6$ — $2 \cdot 10^6$ и $6 \cdot 10^5$) и, наконец, так называемые «растворимые», или транспортные, РНК, которые имеют молекулярный вес около 25000 и состоят примерно из 75 нуклеотидов. Все они обладают физическими свойствами, которые во многих, но не во всех отношениях можно непосредственно сравнивать со свойствами денатурированной ДНК. Для того чтобы рассчитать процент спиральных структур в рибонуклеиновых кислотах при различных условиях обычно пользуются мало обоснованной экстраполяцией от таких физических свойств, как гиперхромные эффекты и изменения оптического вращения. Поскольку еще не на много больше известно и о конкретных конформациях РНК и о влиянии этих конформаций на их физические свойства (в отличие от таких комплементарных двухспиральных структур, как ДНК), точность таких расчетов весьма сомнительна.

РИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

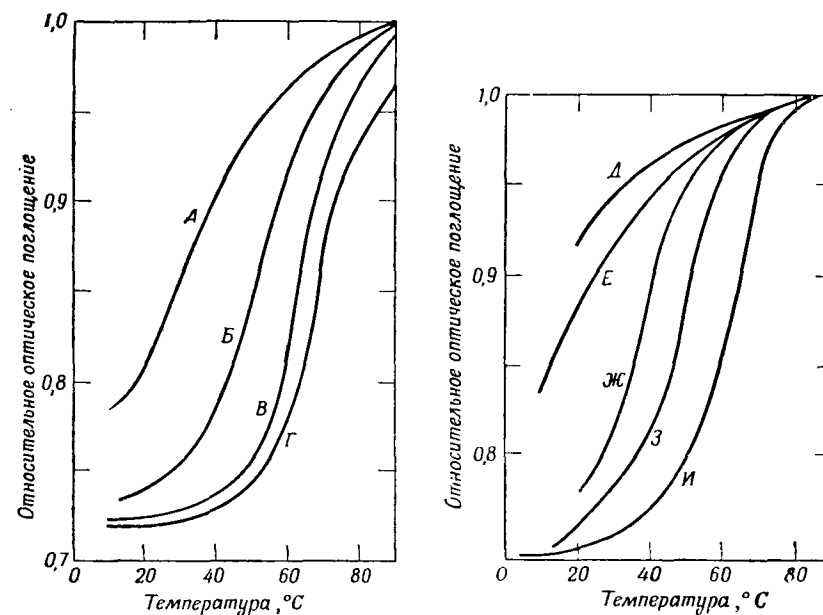
Рибонуклеиновая кислота, выделенная мягкими методами из вируса табачной мозаики (ВТМ) [319, 320], изучена очень широко, поскольку она является одним из немногих препаратов нуклеиновых кислот, который с полным основанием можно считать гомогенным. Инфекционность таких препаратов и легкая потеря ими инфекционности являются хорошим критерием целостности и других свойств РНК по сравнению с ее свойствами в интактном вирусе. Кроме того, в этом случае инфекционность с определенностью показывает, что изменения во вторичной структуре, которые не приво-

дят к деградации РНК, оказывают лишь небольшое влияние на ее биологическую активность.

Гидродинамически в 0,1 М буферном растворе фосфата натрия с рН 6,8 вирусная рибонуклеиновая кислота ведет себя как однородная беспорядочно свернутая цепь [321] с молекулярным весом около $2 \cdot 10^6$ и радиусом вращения (определенным измерением светорассеяния и вязкости) около 400 Å. При комнатной температуре происходит медленная перестройка РНК в более компактную структуру (возрастание коэффициента седиментации и понижение вязкости), при повышенных температурах этот процесс идет быстрее. Нагревание РНК также приводит к потере инфекционности, по-видимому, вследствие гидролиза фосфодиэфирных связей [322]. Против этого объяснения был выдвинут ряд возражений [321, 323], однако те физические методы, которые при этом использовались, конечно, не были настолько чувствительными, чтобы с их помощью можно было обнаружить отделение концевой нуклеотида или другого относительно небольшого остатка. При температуре вплоть до 50° никаких изменений в вязкости инфекционной РНК в 0,1 М буферном растворе не происходило, но между 50 и 60° вязкость заметно возрастала. Это увеличение вязкости особенно заметно в 6 М растворе мочевины, которая, кроме того, понижает температуру структурного перехода до 40° (и сужает область перехода). Увеличение вязкости сопровождается уменьшением константы седиментации, что указывает на раскручивание клубкообразной структуры и резкое увеличение асимметрии молекул при высоких температурах [324].

Результаты изучения скорости реакции формальдегида с аминогруппами полинуклеотида при различных температурах [238, 325] позволяют выявить структуры, связанные водородными связями. Формальдегид в мягких условиях не влияет на структуру нативной ДНК благодаря наличию в ней прочных водородных связей [325]. Аналогичным образом РНК из ВТМ при 25° реагирует с формальдегидом очень медленно. Однако при 45° скорость реакции возрастает в 19 раз, т. е. аминогруппы становятся вполне доступными. Изучение кинетики этой реакции показало, что действие формальдегида на полинуклеотиды протекает в две стадии: сначала денатурация, а затем уже реакция со свободными аминогруппами [326]. В соответствии с этим температура плавления полиинозиновой кислоты в 1%-ном растворе формальдегида понижена примерно на 18°. (Помимо чисто физических эффектов, атака формальдегидом атома N₁ пуринового кольца может уменьшить стабильность структуры; с такой атаки, по-видимому, начинается реакция формальдегида с остатками аденина.) Результаты, полученные с РНК из ВТМ, показали, что она содержит спирализованные участки, в которых основания связаны водородными связями, количество таких

спирализованных участков в условиях опыта достигало 60%. Оказалось, что в образовании водородных связей участвуют все аминогруппы оснований, включая и аминогруппу гуанинового остатка [326]. Для этой РНК наблюдалось также более редкое, чем обычно, увеличение скорости ферментативного гидролиза (РНК-азой или полинуклеотидфосфорилазой) при повышении температуры. Этот



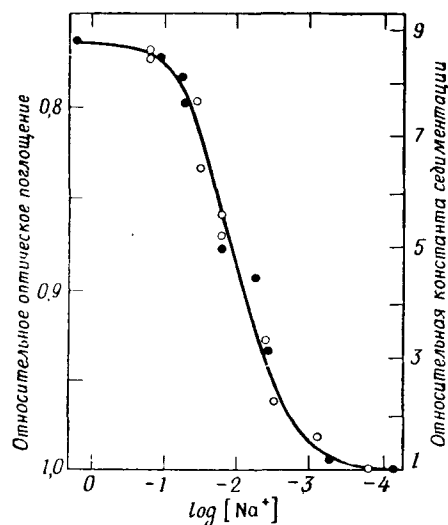
Р и с. 8-27. Влияние ионов магния и натрия на характер зависимости ультрафиолетового поглощения РНК из вируса табачной мозаики от температуры.

А — 10^{-6} М Mg^{2+} ; Б — 10^{-5} М Mg^{2+} ; Б' — 10^{-4} М Mg^{2+} ; Г — 10^{-3} М Mg^{2+} ; Д — $6 \cdot 10^{-5}$ М Na^{+} ; Е — $17 \cdot 10^{-5}$ М Na^{+} ; Ж — $34 \cdot 10^{-3}$ М Na^{+} ; З — $15 \cdot 10^{-2}$ М Na^{+} ; И — 1,4 М Na^{+} . Концентрация РНК ~ 15 г/мл [321].

факт находится в соответствии с возрастанием оптического поглощения при повышенных температурах, и все это указывает на разрушение упорядоченной структуры, которому предшествует разрыв водородных связей [238, 327].

Характер кривых зависимости ультрафиолетового поглощения от температуры у РНК из ВТМ и у нативной ДНК различен. Несмотря на гомогенность РНК, ее температуру плавления точно определить не удастся, причем увеличение оптического поглощения (до 32%) происходит в довольно широкой области температур (от комнатной до 90° в 0,1 М или менее концентрированном рас-

воре хлористого натрия). Увеличение ионной силы понижает оптическое поглощение, т. е. задерживает структурный переход [321, 328, 329], но некоторый гипохромизм (относительно максимального поглощения) наблюдается даже при нагревании в бессолевых растворах при комнатной температуре [321]. Ионы магния примерно в 25000 раз более эффективны, чем ионы натрия, причем максимальный гипохромный эффект наблюдается при соотношении



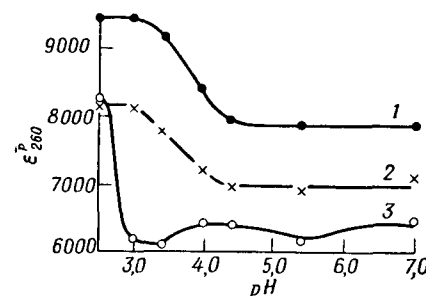
Р и с. 8-28. Изменение относительного оптического поглощения (при 258 мμ) и констант седиментации РНК из вируса табачной мозаики с изменением концентрации ионов при 21°.

● относительное оптическое поглощение; ○ относительная константа седиментации [321].

один ион магния на три фосфатных остатка (рис. 8-27) [321]. Добавление 6 М мочевины примерно на 25% смещает кривую структурного перехода в область более низких температур, вызывая увеличение ультрафиолетового поглощения при комнатной температуре [329], а максимальное поглощение достигается уже при 70° [238, 330].

Хотя ионы магния более эффективно понижают оптическое поглощение РНК, чем ионы натрия, в действительности Mg^{2+} связывается с фосфатными группами обратимо и может быть вытеснен достаточно большим избытком ионов натрия. Это приводит к понижению точки перегиба на температурных кривых растворов РНК, которые содержат 10^{-3} М Mg^{2+} и $1,5 \cdot 10^{-2}$ М Na^{+} по сравнению с растворами, содержащими только ионы магния (10^{-3} М),

несмотря на более высокую общую концентрацию ионов в первом случае. Однако даже при таких высоких концентрациях хлористого натрия, при которых добавление ионов магния не сказывается на температуре плавления РНК, область температурного перехода значительно сужена [321]. Аналогичный эффект наблюдался и для ДНК из зубной железы телят, денатурированной нагреванием [261].



Р и с. 8-29. Спектрофотометрическое титрование РНК из вируса табачной мозаики (1), денатурированной ДНК (2) и нативной ДНК (3) (все опыты проводили при $\mu = 0,1$) [329].

Так как оптическое поглощение РНК из ВТМ при комнатной температуре зависит от концентрации ионов, возможно, что величина гипохромного эффекта и константа седиментации коррелируют между собой. При изменении концентрации ионов натрия от $2 \cdot 10^{-4}$ до $1,5 \cdot 10^{-1}$ константа седиментации возрастала в 9 раз (рис. 8-28), и существенно, что это возрастание было в общем параллельно увеличению гипохромизма (т. е. понижению ультрафиолетового поглощения). Хотя молекулярные взаимодействия несомненно отражаются на общем поведении полиэлектролитов, структурный переход у РНК из ВТМ слишком велик и происходит в слишком узком интервале ионной силы, чтобы его можно было объяснить только одним электростатическим отталкиванием [321]. Распределение констант седиментации было одинаково узкое при различных ионных силах, что еще раз подчеркивает гомогенность препаратов.

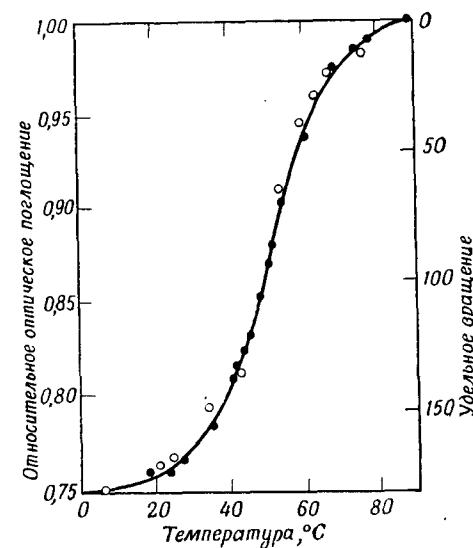
Спектрофотометрическое титрование РНК (рис. 8-29) отличается от титрования нативной ДНК и очень напоминает титрование денатурированной ДНК [329]. По сравнению со значением ϵ_{260} у нативной ДНК оптическое поглощение вирусной РНК никогда не бывает ниже $\epsilon_{260} \approx 7500$ —7800, даже при оптимальных условиях для образования водородных связей. (Не говоря уже о структурных соображениях, нуклеотидный состав будет непосред-

ственно влиять на оптическое поглощение вследствие различных значений ϵ у мономеров; этот эффект для большинства, но не для всех нуклеиновых кислот, по-видимому, не велик.)

Как и в случае денатурированной ДНК (но в противоположность нативной ДНК), все описанные изменения в физических свойствах вирусной РНК (отражающие макромолекулярные переходы) полностью обратимы и, если при этом не затрагивается первичная структура, мало отражаются на ее инфекционности. Эти свойства показывают, что в структуру РНК входит ряд фрагментов, связанных водородными связями и различающихся по своей устойчивости, в связи с чем разрыв водородных связей происходит некооперативно. Оказалось, что РНК из ВТМ состоит из однотяжной гибкой цепи, которая в соответствующих условиях скручивается в компактные частицы, связанные водородными связями, которые, однако, нельзя охарактеризовать какой-нибудь одной конформацией. При изучении изменений в оптическом вращении, которые происходят при определенных воздействиях на РНК, было установлено, что образование водородных связей приводит к изменению или происходит параллельно с изменением количества и степени спиральных конформаций [238, 321, 330]. При ферментативном гидролизе величина удельного вращения вирусной РНК падает от $[\alpha]_D = +180^\circ$ и $[\alpha]_{546 \text{ мк}} = +220^\circ$ до $[\alpha]_D = +20^\circ$ и $[\alpha]_{546 \text{ мк}} < +30^\circ$, что указывает на разрушение спиральной конформации. Важное значение имеет также и тот факт, что при частичном гидролизе РНК-азой, когда происходит разрыв одной межнуклеотидной связи на 20 нуклеотидных остатков, удельное вращение понижается и ультрафиолетовое поглощение увеличивается на 15% [332]. Сравнение кривых зависимости оптического поглощения и оптического вращения от температуры (рис. 8-30) [330] показало, что при выборе подходящего масштаба эти две кривые могут совпадать [238, 321]. Таким образом, как и в случае ДНК, изменения оптического поглощения и оптического вращения с изменением температуры являются веским доказательством того, что спиральные конформации поддерживаются водородными связями. В дальнейшем было получено указание на то, что эти связи слабые, так как при действии 6 М раствора мочевины на РНК оптическое вращение уменьшается [330], а оптическое поглощение возрастает. Расчеты, основанные на сравнении оптических свойств РНК со свойствами двухспирального полиаденилил-полиуридилового комплекса (при нагревании которого оптическое поглощение возрастает на 51%, а оптическое вращение изменяется от $[\alpha]_D = +300^\circ$ до $[\alpha]_D = +25^\circ$; аналогичный комплекс из полицитидиловой и полигуаниловой кислот характеризуется приблизительно 25%-ным гиперхромизмом) и на предельных значениях гиперхромизма и оптического вращения, обычно указывают на то, что 60% полинуклео-

тидных цепей РНК из ВТМ (в 0,1 М буферном растворе фосфата натрия) находятся в спирализованном состоянии. (Оказалось, что эти расчеты неприменимы в случае нативной ДНК из зубной железы телят.) При концентрации 10^{-4} М Na^+ количество спиральных участков в РНК из ВТМ составляет 21,5%, что было показано точным методом [321].

РНК из ВТМ обладает набором конформаций, каждая из которых характеризуется определенной константой седиментации,



Р и с. 8-30. Изменение относительного оптического поглощения при 258 мк (●) и удельного вращения при 589 мк (○) с изменением температуры у РНК из вируса табачной мозаики в 0,1 М растворе фосфата натрия [321].

удельным вращением и оптическим поглощением. Изменения в этих свойствах, вызываемые изменением внешних условий, полностью обратимы и отражают структурные переходы между конформациями, характеризующимися различным количеством водородных связей и спиральных участков в молекуле (рис. 8-31). Оказалось, что при комнатной температуре конформации РНК занимают промежуточное положение между совершенно упорядоченными и полностью беспорядочными. Точная форма спиральных участков, по-видимому, аналогична форме двух спиральных комплементарных комплексов со специфическими водородными связями между цепями с антипараллельной последовательностью оснований. Результаты электрономикроскопического изучения [333] РНК из ВТМ в различных условиях хорошо объясняются с точки зрения

обратимых переходов спираль — клубок. В воде РНК представляла собой глобулы или агрегаты из глобул, но в солевых растворах наблюдались палочкообразные частицы с размытыми границами длиной около 1200 Å и диаметром приблизительно 30 Å. Кроме того, наблюдались длинные узкие тяжи длиной до 50000 Å и диаметром около 10 Å.

Путем измерения электрического ультрафиолетового дихроизма РНК из ВТМ удалось получить некоторые данные о третичной

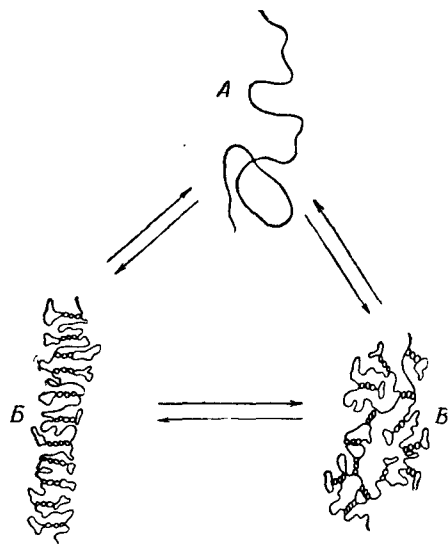


Рис. 8-31. Возможные конформации и переходы между ними для РНК из вируса табачной мозаики.

А — беспорядочный клубок в отсутствие солей или при высокой температуре; Б — компактная палочка при низкой температуре и при низкой ионной силе; В — компактный клубок при низкой температуре и высокой ионной силе [334].

структуре РНК в растворах с низкой (0,01 М) ионной силой [334]. При комнатной температуре дихроизм имеет положительный знак (в противоположность нативной ДНК). В этих условиях макромолекула не является беспорядочным клубком, так как дихроическое отношение (+1,2) указывает на то, что плоскости многих оснований ориентированы параллельно длинной оси частицы (и, по-видимому, перпендикулярно к направлению цепи фосфодиэфирных связей). На основании этих результатов предложена модель, в которой двухспиральные тяжи, связанные неспирализованными участками, уложены в палочкообразную частицу. Повышение температуры мгновенно приводит к исчезновению дихроизма

(при 40°), а затем к появлению отрицательного дихроизма (—1,1 при 50°). Это изменение знака дихроизма при нагревании обратимо. Результаты электрономикроскопических исследований подтверждают существование этих различных конформаций и их взаимопревращений [335].

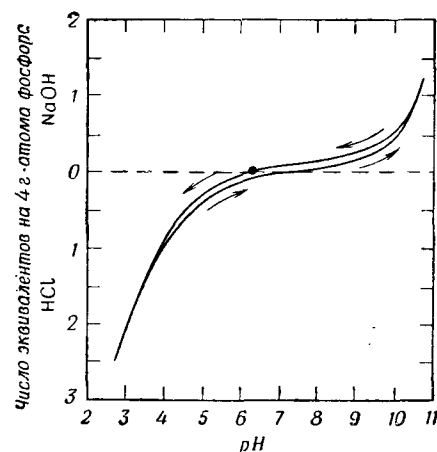
МИКРОСОМАЛЬНАЯ РИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА*

Свойства высокомолекулярных РНК из дрожжей [336], *Escherichia coli* [337, 338] и микросом печени теленка [339] в растворе весьма близки к свойствам РНК из ВТМ. То, что ультрафиолетовое поглощение и оптическое вращение дрожжевой РНК изменяются при изменении ионной силы или при добавлении мочевины [336], показывает, что в ее структуру входят спирализованные фрагменты, связанные водородными связями. При более детальном изучении высокомолекулярной РНК из *E. coli* было установлено, что она представляет собой свернутую однотяжную молекулу с по крайней мере частично упорядоченной структурой, поддерживаемой водородными связями. Если растворы нативной ДНК благодаря нечувствительности двухспиральной структуры к растяжению или сжатию под влиянием противоионов обладают характерической вязкостью, которая практически не зависит от ионной силы (при значениях ионной силы выше тех, которые вызывают денатурацию), вязкость РНК из *E. coli* заметно понижается при увеличении ионной силы раствора в области от 10^{-3} до 10^{-2} М хлористого натрия. Это указывает на то, что РНК обладает гибкой структурой, которая может сильно растягиваться в растворах с низкой ионной силой вследствие электростатического отталкивания между свободными фосфатными группами. Как и в случае денатурированной ДНК, ионы магния понижают вязкость растворов РНК гораздо более эффективно, чем ионы натрия.

Исчезновение двойного лучепреломления в потоке с увеличением ионной силы также указывает на существование структуры, способной сокращаться. Двойное лучепреломление растворов РНК в воде имеет положительный знак (в противоположность отрицательному двойному лучепреломлению в потоке у ДНК), но в 0,2 М растворе хлористого натрия это довольно небольшое двойное лучепреломление полностью исчезает (ср. влияние соли на вязкость). Потенциометрическое титрование РНК (рис. 8-32) в основном обратимо, хотя между кривыми титрования в области рН от 2,8 до 10,8 имеется небольшая, но вполне заметная гистерезисная

* Вопросы макромолекулярной структуры РНК более подробно рассмотрены в книге: С п и р и н А. С. «Некоторые проблемы макромолекулярной структуры рибонуклеиновых кислот», Изд. АН СССР, 1963.— *Прим. перев.*

петля [337, 340]. При $0,4^\circ$ гистерезисный эффект значительно усиливается; при $38,5^\circ$ после предварительной обработки РНК кислотой во всех случаях имеется одна-единственная кривая, но при последующем титровании при $0,4^\circ$ вновь был обнаружен гистерезис. Это указывает на то, что при титровании кислотой или щелочью

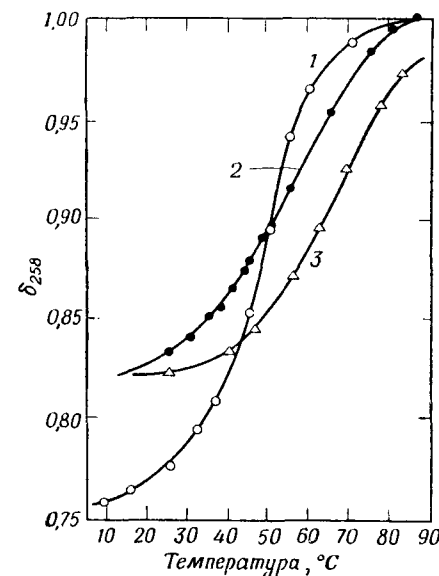


Р и с. 8-32. Потенциометрическое титрование микросомальной РНК [337].

при $38,5^\circ$ происходит конформационный переход к более беспорядочной структуре, но при охлаждении до $0,4^\circ$ «упорядоченная» конформация восстанавливается.

Так как структура РНК поддерживается довольно слабыми водородными связями, ее ультрафиолетовое поглощение заметно зависит от ионной силы (ϵ_p 8700 в воде, 8160 в 10^{-3} М растворе хлористого натрия и 7450 в 0,2 М растворе хлористого натрия) [337], а в 8 М растворе мочевины наблюдается значительный гиперхромный эффект ($\sim 26\%$) [341]. Увеличение оптического поглощения с повышением температуры (рис. 8-33) происходит более или менее непрерывно от 25 до 75° , причем максимальный гиперхромный эффект составляет 31%. Однако полный гиперхромный эффект при щелочном гидролизе равен примерно 59% (ϵ_{260} в 1,0 М растворе фосфата натрия при pH 7,1 равен 7290; ϵ_{260} продуктов гидролиза в тех же условиях составляет 11600), причем точно такое же увеличение наблюдается при полном фосфорилизе РНК полинуклеотидфосфорилазой [337]. Эти же данные показывают, что некоторый «остаточный» гиперхромизм нуклеиновых кислот, не связанный со специфической вторичной структурой, может быть довольно большим.

Как и в случае ДНК, изучение инфракрасных спектров рибосомальной РНК из *E. coli* позволяет предположить, что полоса при 1680 см^{-1} в растворе в D_2O (или для недеютерированных остатков оснований при 1710 см^{-1}) является критерием спаривания



Р и с. 8-33. Изменение оптического поглощения (при 258 мμ) с изменением температуры растворов РНК вируса табачной мозаики, микросомальной РНК и ферментативно синтезированного сополимера АЦГУ в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7.

1 — РНК вируса табачной мозаики (20% Г); 2 — сополимер АЦГУ (25% Г); 3 — микросомальная РНК (31% Г); в скобках приведено процентное содержание гуанина [238].

оснований (возможно, как результат концентрирования π -электронной плотности в районе водородных связей), так как интенсивность этой полосы уменьшается при нагревании РНК и (или) при гидролизе ее РНК-азой [343]. Рентгенограммы * РНК из рибосом *E. coli* сильно напоминают рентгенограммы неориентированных двухспиральных ДНК в В-конформации, что указывает на то, что большая часть РНК имеет аналогичную двухспиральную структуру [342]. Электрономикроскопические исследования показали, что эта РНК характеризуется теми же тремя конформациями, что и РНК из ВТМ. Рибосомальная РНК состоит из двух фрагментов

* Недавние опыты по изучению рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами показали, что высокомолекулярная РНК состоит из коротких двухспиральных палочкообразных участков (длиной 50—150 Å), соединенных небольшими гибкими фрагментами [420].

с различным молекулярным весом, и никаких доказательств существования более мелких «субъединиц» не было получено [335].

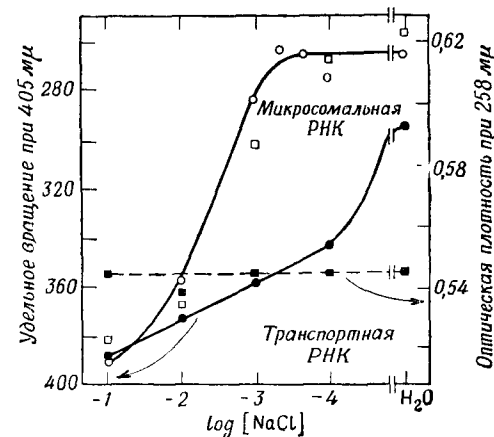
Физические свойства РНК из микросом печени теленка (выделенной фенольной депротеинизацией) были изучены достаточно детально [339]. Как и РНК из *E. coli*, она состоит из двух основных компонентов. Эти компоненты были относительно гомогенными, хорошо разрешались при седиментации и имели молекулярный вес $1,3 \cdot 10^6$ и $6 \cdot 10^5$ соответственно. Нагревание растворов РНК вызывало деградацию ее до «субъединиц» (с молекулярным весом около $1,2 \cdot 10^5$), которые при седиментации давали один относительно узкий пик, указывавший на специфическую диссоциацию высокомолекулярной РНК, хотя при этом не была исключена возможность разрыва ковалентных связей*. Эта РНК имела сходную кривую температурной зависимости оптического поглощения с аналогичной кривой РНК из ВТМ, а 6 М мочевины при всех температурах вызывала гиперхромный эффект. Изменение оптического поглощения было полностью обратимым, что указывало на реконструкцию вторичной структуры. Гиперхромный эффект при нагревании равнялся примерно 27%; общее оптическое поглощение при полном щелочном гидролизе РНК возрастало на 39% (значительно меньше, чем у РНК из *E. coli*). Изучение скорости реакции РНК с формальдегидом при различных температурах и различной ионной силе также показало, что при нормальных условиях структура РНК поддерживается водородными связями. Сравнение скорости реакции (которую определяли спектрофотометрически) РНК при 25° со скоростью реакции, найденной для нуклеотидов, позволило установить, что 60% аминогрупп в нуклеиновой кислоте участвуют в образовании водородных связей (в 0,05 М фосфатном буфере). Изучение оптического вращения и оптического поглощения показало, что около 40% нуклеотидов в РНК из микросом печени теленка участвует в образовании водородных связей.

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТРАНСПОРТНЫЕ РИБОНУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Несмотря на относительно небольшие размеры рибонуклеиновых кислот, которые в клетке осуществляют перенос аминокислот в микросомы, определение их молекулярных весов дает результаты, которые изменяются в довольно широких пределах от 18000 до 50000. Такой разброс, по-видимому, отражает различия в методах, как в физических, так и в химических (определение содержания

* В настоящее время достоверно показано, что каждая молекула РНК представляет собой единую полинуклеотидную цепь и не содержит «субъединиц», связанных нековалентными связями. — Прим. перев.

концевых групп) [344, 345], а также различия в изученных препаратах. Однако некоторые вариации могут быть обусловлены простой агрегацией. Хотя при нагревании и последующем быстром охлаждении разбавленных растворов «растворимой» РНК из *E. coli* никаких изменений в молекулярном весе не происходит, в случае концентрированных растворов средний молекулярный вес почти удваивается [346]. Это позволяет предположить, что в одном случае



Р и с. 8-34. Изменение удельного вращения (при 405 мμ) и оптической плотности (при 258 мμ) растворов микросомальной РНК (□ и ○) и низкомолекулярной транспортной РНК (■ и ●) при изменении концентрации хлористого натрия при 25°.

□ и ■ оптическая плотность; ○ и ● удельное вращение [352].

водородные связи связывают отдельные участки одной и той же цепи, а в другом — различные цепи связываются водородными связями. Анализ концевых групп препаратов «растворимой» РНК из одного и того же организма [345] показал, что ее молекулярный вес равен приблизительно 18500, а физическими методами (диффузия и седиментация) было получено значение 35000. Молекулярный вес «растворимой» РНК из дрожжей [347, 348] и из *E. coli* [349], определенный достаточно достоверно, равен примерно 25000, что соответствует 75 нуклеотидам в полимерной цепи, если молекула состоит из одной полинуклеотидной цепи [344]*. Близкие к этим величины были получены и для индивидуальных растворимых РНК из *E. coli*. При щелочном гидролизе РНК, специфичных для треонина и фенилаланина, освобождается 1,5 мол. % аденозина,

* Аланиновая транспортная РНК из дрожжей, последовательность нуклеотидных звеньев в которой расшифрована Холли и сотр., состоит из 77 нуклеотидных остатков. — Прим. перев.

откуда следует, что цепи состоят из 67 нуклеотидных остатков [350]. Растворимые РНК из животных тканей (печень крысы) имеют, по данным седиментации и определения коэффициента диффузии, молекулярный вес 27000 [351].

За исключением влияния молекулярного веса на вязкость, седиментацию и связанные с ними физические свойства [347—349], транспортные рибонуклеиновые кислоты по своему поведению сходны с микросомальными нуклеиновыми кислотами (рис. 8-34), хотя их нуклеотидный состав совершенно различен. Изменения коэффициента экстинкции и оптического вращения с изменением температуры вновь указывают на существование структуры, связанной водородными связями [344, 349, 352], и это подтверждается низкой скоростью реакции с формальдегидом [349]. То, что их структура несколько более стабильна и более упорядочена, чем у микросомальных РНК, видно из того факта, что они имеют более высокую температуру плавления и характеризуются более резким подъемом температурной кривой (т. пл. примерно 60° в $0,1\text{ M}$ растворе хлористого натрия, причем возрастание оптической плотности начинается с 40°). Повышение или понижение ионной силы увеличивает или уменьшает температуру плавления, а мочевины в высокой концентрации заметно влияют на оптическое поглощение даже при комнатной температуре, что обусловлено понижением температуры плавления [349]. Увеличение оптического поглощения в бессолевоом растворе фактически достигает того же значения, что и при максимальной температуре (24%). Эти изменения вновь полностью обратимы, и действительно, при нагревании до 70° при $\text{pH } 6,8$ ($\mu = 0,2$) РНК не теряет своей биологической активности [344]. Хотя «остаточным» гипохромизмом зачастую можно пренебречь, особенно в случае ДНК, можно заметить, что в случае «растворимой» РНК из печени крысы [351] структурный (после нагревания или прибавления 6 M мочевины) гиперхромизм составляет приблизительно 21%, а гиперхромизм при щелочном гидролизе равен 49%. Это показывает, что и в отсутствие вторичной структуры с ее водородными связями значительная часть оснований остается в таком состоянии, что их плоскости параллельны. (Ср. с соответствующими данными для рибосомальной РНК из *E. coli*.)

В солевых растворах при 25° «растворимые» рибонуклеиновые кислоты содержат значительное количество упорядоченных спиральных участков, хотя в то же время многие ее свойства характерны для беспорядочно свернутых гибких цепей. Величина удельного вращения ($[\alpha]_D +134^\circ$ в $0,1\text{ M}$ растворе хлористого натрия) для РНК из *E. coli* указывает на то, что около 45% ее оснований входят в спиральные участки [352].

Мы уже упоминали о том, что структура низкомолекулярной РНК из *E. coli* более устойчива, чем структура микросомальных

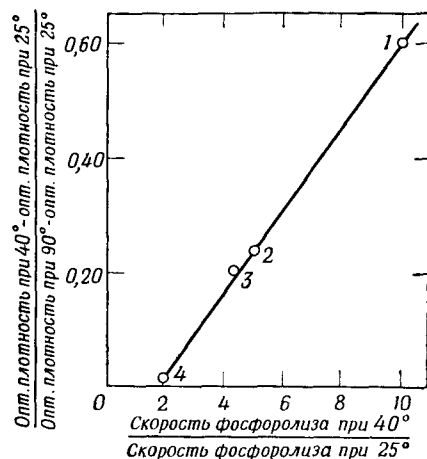
рибонуклеиновых кислот. Вследствие более высокой температуры плавления транспортной РНК различия у этих нуклеиновых кислот наблюдаются при комнатной температуре, так как зона плавления у высокомолекулярной, но не низкомолекулярной РНК, захватывает эту температуру [352]. Так, ионная сила (при комнатной температуре) мало влияет на оптическую плотность «растворимой» РНК (вплоть до той точки, после которой происходит «денатурация в воде»); кроме того, наблюдалось, что у этой РНК, в противоположность микросомальной РНК*, вязкость также не зависит от ионной силы. Однако известный интерес представляет тот факт, что если у микросомальной РНК кривые зависимости удельного вращения и оптического поглощения от ионной силы фактически идентичны, то оптическое вращение «растворимой» РНК при уменьшении концентрации хлористого натрия от $0,1$ до 10^{-4} M значительно уменьшается (от $[\alpha]_{405} = +390^\circ$ до $[\alpha]_{405} = +345^\circ$), а ее ультрафиолетовое поглощение остается постоянным [352]. Мы уже упоминали о том, что изменения во вторичной структуре легко сказываются на оптическом вращении, но не на ультрафиолетовом поглощении. Увеличение электростатического отталкивания наряду с изменениями гидратации, по-видимому, вызывает изменение величины шага спирали.

Резкое уменьшение величины оптического вращения происходит при концентрациях солей ниже 10^{-4} M . Что же касается микросомальной РНК, то ее оптическое вращение резко уменьшается уже при переходе от 10^{-2} до 10^{-3} M хлористого натрия, что еще раз подчеркивает более высокую стабильность растворимой РНК. Возможно, причина этого заключается в том, что в низкомолекулярной РНК количества гуанина и цитозина (и аденина и урацила) близки между собой [352]. Однако с точки зрения ширины зон различных структурных переходов определенное значение может иметь и гетерогенность по составу. Присутствие в растворимой РНК «минорных» оснований и особенно псевдоуридина также может иметь существенное значение в отношении вторичной и третичной структуры.

Сведения об относительной стабильности конформаций различных рибонуклеиновых кислот можно получить при сопоставлении относительных скоростей фосфоролиза их полинуклеотидфосфорилазой (рис. 8-35). При 37° эти скорости уменьшаются в следующем порядке: РНК из ВТМ > высокомолекулярные микросомальные РНК > растворимые РНК [327]. Действительно, в случае растворимой РНК реакция происходит на 20—30%, причем фосфоролизу

* Оказалось, что, по крайней мере, частичное увеличение стабильности транспортной РНК обусловлено следами ионов многовалентных металлов, прочно связанных с ней [421].

подвергаются только отдельные фрагменты полинуклеотидных цепей [353]. В противоположность этому после минимального гидролиза (менее чем на 5%) транспортной РНК фосфодиэстеразой змеиного яда, т. е. после отделения концевых групп, она теряет способность связываться с активированными аминокислотами [353, 354]. Повышенная устойчивость многотяжных спиральных комплексов из синтезированных ферментативным путем полинуклеотидов по сравнению с устойчивостью неспирализованных структур позволяет



Р и с. 8-35. Соотношение между относительным гиперхромизмом и температурной зависимостью скорости фосфоролита для растворов РНК из вируса табачной мозаики (1), микросомальной РНК (3), ферментативно синтезированной полиуридилевой кислоты (4) и сополимера АЦГУ (2) [327].

предположить, что разные скорости фосфоролита различных нуклеиновых кислот, по крайней мере частично, определяются количеством спирализованных участков в их структуре [327]. Заметные различия имеются также во влиянии температуры на скорость фосфоролита, что в свою очередь помогает определять относительную устойчивость различных конформаций. Так, увеличение скорости при повышении температуры от 25 до 40° очень заметно у РНК из ВТМ и значительно менее заметно у микросомальных РНК. Таким образом, увеличение скорости отражает разрушение спиральных участков, так как отношение скоростей фосфоролита при 40 и 25° прямо коррелирует с отношением гиперхромного эффекта, проявляющегося в этой области температур, к полному гиперхромному эффекту (25—90°) [327].

Недавно проведенные рентгенографические исследования растворимой РНК из *E. coli* подтверждают вторичную структуру, вклю-

чающую довольно большое количество спиральных участков [346]. Анализ кривых дисперсии оптического вращения нативной РНК в ультрафиолетовой области также показал, что значительная часть ее полинуклеотидной цепи имеет относительно упорядоченную вторичную структуру [355]. Описаны также результаты рентгенографического изучения кристаллической транспортной РНК из дрожжей (полученной медленным выпариванием водного раствора ее натриевой соли) [403]. Полученные при этом рентгенограммы оказались более удачными, чем полученные для РНК ранее, и напоминают рентгенограммы ДНК А-типа. Эти результаты показали, что транспортная РНК представляет собой сложенную вдвое полинуклеотидную цепь (по-видимому, обе ее половины комплементарны от начала до конца, за исключением трехнуклеотидного участка, который образует изгиб), причем эта спираль в точности соответствует двойной спирали ДНК*. Кроме того, можно считать установленным наличие антипараллельных участков, связанных водородными связями. Молекула имеет длину около 100 Å и содержит около 3,5 витков спирали, причем величина шага спирали изменяется с изменением влажности от 28 до 30 Å; плоскости пар оснований отклонены приблизительно на 20° от перпендикуляра к оси спирали. Препарат в виде высушенных пленок характеризуется отрицательным двойным лучепреломлением, что указывает на то, что молекулы имеют палочкообразную форму и ориентированы параллельно поверхности. Величина двойного лучепреломления (0,07) сопоставима с величиной, полученной для волокон из полностью спирализованных молекул, сходных с А-формой ДНК. Это подтверждается свойствами различных жидких кристаллических форм, которые образуются в концентрированных растворах транспортной РНК. Оказалось, что общее количество спиральных участков в твердом состоянии выше, чем в разбавленном растворе, а три нуклеотида, которые при складывании цепи остаются несвязанными, обуславливают адапторные свойства РНК. Рентгеноструктурный анализ единичного кристалла очищенной РНК, специфичной только для одной аминокислоты, возможно, позволит определить полную первичную структуру этого полимера [403].

Оказалось, что способность растворимых РНК связывать аминокислоты не зависит от ее вторичной структуры, так как нагревание, а затем быстрое охлаждение растворов такой РНК не ска-

* Более распространенной в настоящее время является модель Фреско, который исходит из случайного распределения нуклеотидных остатков в молекуле транспортной РНК. Согласно этой модели, транспортные РНК состоят либо из двух спиральных сегментов, соединенных аморфным участком, либо они представляют собой двойную спираль с выступающими наружу «петлями» (F r e s c o J., Informational macromolecules, N. Y. and L., p. 121, 1963). — Прим. перев.

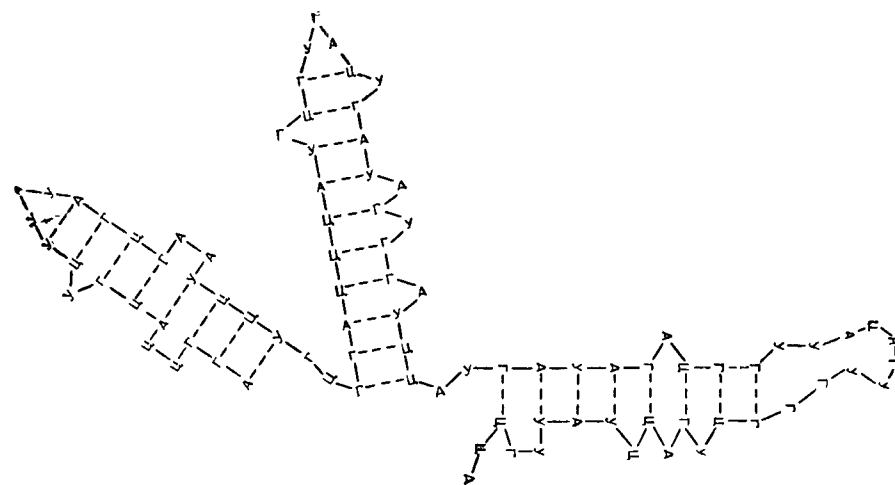
зывалось на ее активности [344, 346, 351]. Специфическое связывание аминокислот может происходить без участия конца цепи с 5'-фосфатной группой, и возможно, что участок нуклеотидной последовательности, определяющей специфичность, находится где-то недалеко от Ц — Ц — А-конца. Ни нагревание, ни обработка мочевиной не приводят к необратимой потере транспортирующей активности растворимой РНК, и оказалось, что для осуществления этой функции вторичная структура также не является необходимой, если, конечно, целостность первичной структуры при этом не нарушена [351]. Можно заметить, что даже отделение аминокислоты от растворимой РНК (при pH 10) вызывает изменение ее вторичной структуры, так как этот процесс сопровождается увеличением константы седиментации (примерно от 3,0 до 4,0) [346].

КОНФОРМАЦИЯ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Различные физические свойства РНК указывают на существование в нейтральном солевом растворе при низких температурах частично спирализованной структуры. Так как препараты являются одноцепочечными и не содержат эквимольных количеств комплементарных оснований, то был сделан вывод, что каждая полинуклеотидная цепь состоит из ряда несовершенных двухспиральных участков (соединенных одним концом), по своему характеру сходных с двойной спиралью ДНК, причем эти участки соединяются гибкими фрагментами, лишенными какой бы то ни было определенной конформации [238]. Среди многих возможных пар оснований наиболее стабильными оказались пары, в которых аденин связан водородными связями с урацилом, а гуанин — с цитозином, и эти пары, по-видимому, единственные, которые могут обеспечить образование правильной спиральной структуры. Внутри таких структур все другие пары оснований либо разделены слишком большими расстояниями, либо структурно не соответствуют друг другу. В соответствии с этой точкой зрения была обнаружена линейная зависимость между температурой плавления данных РНК и содержанием в них гуанин-цитозиновых пар [356].

Другие исследования образования двойных спиралей из гомополимеров и сополимеров адениловой и уридилевой кислот показали, что благодаря наличию некомплементарных оснований в спиральных структурах образуются выступающие наружу петли, так как оптимальное спаривание происходит только тогда, когда число комплементарных остатков в гомополимере и сополимере одинаково [357]. Как и следовало ожидать, двойная спираль с петлями менее устойчива, чем идеальная комплементарная структура, во-первых, вследствие уменьшения длины нормально спаренных участков молекулы, во-вторых, вследствие

напряжения, создаваемого петлями в соседних участках цепи, и, наконец, вследствие увеличения сил электростатического отталкивания в районе петель. Взаимодействие олигонуклеотидов с комплементарными высокомолекулярными гомополинуклеотидами дает спиральные структуры, устойчивые при 25°, если олигонуклеотид содержит не менее четырех нуклеотидных остатков [358], и поэтому в структуре РНК можно предположить существование относительно коротких участков из комплементарных пар оснований, связанных водородными связями (с минимальной длиной 3—4 нуклеотидных пары), которые разделены петлями [359].



Р и с. 8-36. Возможная вторичная структура рибонуклеиновых кислот [359].

Следует напомнить, что, для того чтобы предотвратить распад двухтяжной молекулы ДНК, необходимо, чтобы между двумя разрывами в противоположных цепях было примерно шесть нуклеотидов [297].

Благодаря дополнительной подвижности структуры, которая позволяет делать выбор между конкурирующими конформациями, РНК принимает наиболее устойчивую конформацию, соответствующую данной температуре и ионной силе. При этом значительно возрастающее спаривание оснований делает возможным выталкивание нуклеотидных участков наружу в виде петель, причем «спиральные» участки образуют U-образные фрагменты, в которых связанные водородными связями антипараллельные последовательности нуклеотидов соединены минимум тремя нуклеотидами, образующими изгиб [359]. На рис. 8-36 изображена возможная вторичная структура рибонуклеиновых кислот.

Такие конформации соответствуют результатам определения числа водородных связей, они объясняют существование широкой области температурного перехода и многие физические свойства РНК. Довольно ограниченное разворачивание молекулы при понижении концентрации солей до умеренных значений ионной силы, в противоположность типичным полиэлектролитам, с одной стороны, и нативной ДНК, с другой, также объясняется этой моделью, так как, в частности, такое разворачивание сопровождается уменьшением спирализации структуры.

Таким образом, данная вторичная структура РНК определяется последовательностью нуклеотидов, которая в свою очередь обуславливает третичную структуру петель, состоящих из неспаренных оснований, и открытых участков цепи, которые по отношению друг к другу удерживаются в каком-то фиксированном состоянии. Такие оголенные участки являются потенциальными «точками», с помощью которых РНК может специфически взаимодействовать с другими нуклеиновыми кислотами (например, взаимодействие рибосомальной или информационной РНК с транспортными РНК), и в них заключены новые возможности для кодирования или переноса информации, которые не свойственны деструктурированным одноцепочечным тямкам или идеальным двойным спиральям. То, что устойчивость многих спиральных участков в этой модели находится на пределе при температуре клетки, позволяет отдельным участкам нуклеотидной последовательности мгновенно освобождаться при тепловых (или энергетических) флуктуациях, что может иметь особое биологическое значение [359].

КОНФОРМАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В НУКЛЕОПРОТЕИДАХ

Еще слишком мало достоверных данных получено относительно макромолекулярной организации нуклеиновых кислот и белков в нуклеопротеидах. В дезокси-нуклеогистонах и родственных им комплексах основной белок в большей или меньшей степени закручен вокруг ДНК, которая в нуклеопротеиде имеет ту же конформацию, что и в изолированном состоянии [360, 361, 408, 409]. Связывание фосфатных ионизированных групп с основными группами белка осуществляется, по-видимому, главным образом за счет солеобразных связей, так как при растворении в 1 М растворе хлористого натрия нуклеопротеиды в значительной степени диссоциируют [362]. Спектрофотометрическое титрование нуклеогистона из зобной железы теленка фактически идентично титрованию свободной нативной ДНК при тех же значениях ионной силы [363]. По-видимому, большое значение имеют стереохимические факторы, которые определяют укладку белковых субъединиц в большой жело-

бок двойной спирали ДНК и влияют на ее специфические свойства. Результаты, полученные при изучении комплекса ДНК с протамином с помощью поляризованного инфракрасного света, показывают, что при высокой влажности ДНК находится в В-конформации (плоскости пар оснований перпендикулярны оси спирали), а белки находятся в вытянутой форме, а не в форме спирали [392]. В ДНК-гистонах приблизительно половина белков имеет конфигурацию α -спирали [393]. Рентгеноструктурный анализ искусственных комплексов ДНК с сополимером из L-аланина и L-лизина (в соотношении 4 : 1) дает рентгенограммы, на которых видно главным образом наложение α -спиральных конфигураций на структуру, обусловленную В-конформацией ДНК [394]. Вполне возможно, что богатые аланином участки находятся в форме α -спиралей, в то время как лизиновые остатки связаны с ДНК за счет электростатических сил.

Рентгенограммы под большими углами порошка вируса мозаики желтого турнепса (содержащего 40% РНК) и белков оболочки этого вируса показывают, что кривая рассеяния вируса не является простой суммой рассеяния, обусловленного белком и свободной вирусной РНК. Возможно, что вторичная структура РНК в этом вирусе (на которую, по-видимому, влияет белок) отличается от вторичной структуры изолированной вирусной нуклеиновой кислоты [364]. Однако рентгенографический анализ рибонуклеопротеидных частиц из *E. coli* [365], дрожжей и печени крысы [366] указывает на то, что структура РНК в этих частицах сходна со структурой свободных РНК [365, 366]. Изменение характера рентгенограмм этих частиц с изменением влажности напоминает результаты, полученные для нуклеогистонов, которые показывают, что структура нуклеиновой кислоты и структура белка в известной степени независимы друг от друга.

Изучение ультрафиолетового поглощения также позволяет предположить, что РНК в рибосомах имеет вторичную структуру, сходную со вторичной структурой нуклеиновой кислоты в свободном виде. Коэффициенты экстинкции (рассчитанные по отношению к молярному содержанию фосфора) как свободной РНК, так и рибонуклеопротеида при 255 м μ (при этой длине волны поглощением белка можно пренебречь) равны между собой ($\epsilon_{255}^P \sim 8100$) и увеличиваются при возрастании температуры до 85° [339, 365]. Далее, гиперхромные эффекты, наблюдаемые при гидролизе рибосом и РНК щелочью или ферментом до нуклеозид-3'-фосфатов, идентичны и их величина равна 41% при 260 м μ [341]. Нагревание свободной РНК приводит к увеличению оптического поглощения на 29%, причем это возрастание происходит обратимо. Идентичность гиперхромных эффектов у рибосом и изолированной РНК является веским доводом (но не доказательством) в пользу того, что конфор-

мация полинуклеотидов в обоих случаях одна и та же и что эта конформация поддерживается достаточно упорядоченными, а не хаотическими водородными связями.

При другом подходе были изучены ультрафиолетовые спектры поглощения различных нуклеопротеидов до и после разделения их на белок и нуклеиновую кислоту обработкой додецилсульфатом натрия [367]. Были введены соответствующие поправки на светорассеяние, а экспериментальные условия были таковы, что нуклеиновая кислота при депротеинизации оставалась нативной, т. е. обладала гипохромизмом, а отсюда и любое уменьшение оптического поглощения могло бы показать, что нуклеиновая кислота в интактном нуклеопротеиде обладает меньшим гипохромным эффектом, что в свою очередь указывало бы на конформационные изменения, происходящие при освобождении нуклеиновой кислоты. При разрушении ДНК-содержащих вирусов типа бактериофага Т6 и вируса папилломы Шоупа никаких изменений в оптическом поглощении не происходило (хотя ясно, что изолированная ДНК была определенным образом упакована внутри вируса), и в этом случае вторичная структура нуклеиновой кислоты внутри вируса и в изолированном виде, по-видимому, одна и та же. Аналогичным образом оптическое поглощение рибонуклеопротеидных частиц из дрожжей фактически то же самое, что у разрушенных частиц [367].

Однако разделение ВТМ на РНК и белок сопровождается заметным уменьшением оптического поглощения, что указывает на то, что структуры в изолированной РНК, поддерживаемые внутренними водородными связями между основаниями, исчезают под влиянием особой упаковки белковых субъединиц в интактном вирусе, что, в частности, видно из рентгенограмм [368]. В отсутствие соли оптическое поглощение (при 260 мμ) разрушенного вируса практически то же, что и у интактного вируса. Добавление солей вызывает немедленное уменьшение оптической плотности, обусловленное образованием связанной водородными связями (беспорядочными или какими-то иными) вторичной структуры у рибонуклеиновой кислоты. Нагревание этого раствора вызывает увеличение (на 25%) оптического поглощения РНК в интактном вирусе. Для сферического вируса кукурузной кукурузы характерна промежуточная стадия, когда при разрушении вируса на РНК и белок происходит небольшое уменьшение оптической плотности, а при нагревании оптическая плотность возрастает до значений, которые на 23% выше величины оптического поглощения интактных частиц. Более того, при щелочном гидролизе целого вируса [341] оптическая плотность возрастает на 47%, и поэтому РНК внутри вируса, по-видимому, обладает довольно упорядоченной вторичной структурой. Уровень упорядоченности структуры РНК внутри вируса повышен благодаря тому, что определенным образом упакованные

белковые субъединицы препятствуют сжатию молекулы РНК. Это указывает на то, что при освобождении РНК ее структура изменяется в сторону термодинамически более стабильной конформации.

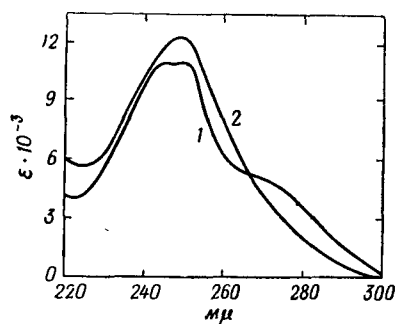
Автор предполагает, что изменения в оптическом поглощении определяются не взаимодействием белка с нуклеиновой кислотой, однако такое предположение обосновано не для всех случаев. Заключение о наличии или отсутствии водородных связей между пуринами и пиримидинами в рибонуклеопротеидах, основанные только на характере изменения оптических свойств, также сомнительны, так как можно себе представить другие механизмы, которые предполагают ограничение внутринуклеотидного вращения (а отсюда и изменения в ультрафиолетовом поглощении).

ГИПОХРОМИЗМ

Полное разрушение нативной ДНК до нуклеозидов или мононуклеотидов может приводить к увеличению оптического поглощения при 260 мμ на 60—70%. В меньшей степени уменьшение оптического поглощения по сравнению с мономерными компонентами характерно для всех полинуклеотидов (включая апуриновые и апиримидиновые кислоты [369]) и олигонуклеотидов. В различные периоды гиперхромный эффект, проявляющийся при разрушении полинуклеотидов, приписывали главным образом остаткам гуаниловой кислоты [370], гуаниновым и цитидиновым остаткам [371] и полипуриновым фрагментам [372]. Разрушение упорядоченной образованной водородными связями структуры сопровождается большим гиперхромным эффектом, но даже после полной денатурации «остаточный» гиперхромизм составляет 10—20%. Этот эффект соответствует гипохромизму олигонуклеотидов, на который мало влияют ионная сила или температура и для которого не характерны необратимые изменения при обычных условиях денатурации. Как было показано при изучении синтетических олигонуклеотидов, этот «остаточный» гипохромизм не связан с образованием водородных связей (см. стр. 496).

Дальнейшее подтверждение было получено при анализе ультрафиолетовых спектров 1-метил-, 3-метил-, 9-метил- и 1,9-диметил-гипоксантинов в ацетонитриле и смесях ацетонитрила с водой (рис. 8-37) [373]. Анализ показал, что в смесях ацетонитрил — вода молекулы воды образовывали водородные связи с карбонильным кислородом в 6-положении гипоксантина. Что касается спектров, то образование этих водородных связей приводило к слабому батохромному смещению максимума и гиперхромному эффекту, причем эти изменения происходили в том же направлении, что и при образовании енолят-аниона. Более того, при детальном изу-

чении ультрафиолетового спектра спирального комплекса полицитидиловой кислоты с полиинозиновой кислотой было найдено, что та часть спектра, которая определялась цитозином, не изменялась при денатурации, несмотря на то что водородные связи, в образовании которых принимают участие аминогруппа как донор протона и N_1 как акцептор протона, стабилизируют спираль и отсутствуют в денатурированной форме. Был сделан вывод, что водородные связи не могут быть непосредственной причиной гипохромизма нуклеиновых кислот.



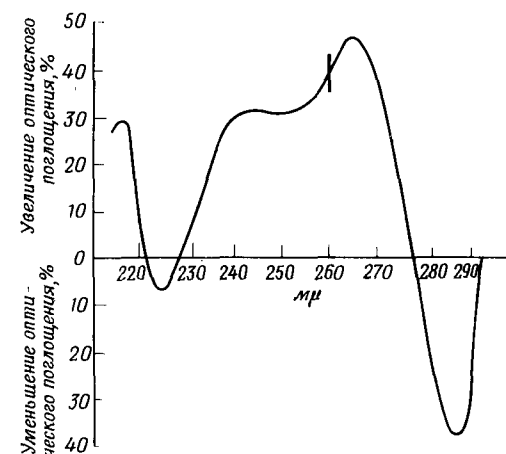
Р и с. 8-37. Спектр поглощения 9-метилгипоксантина.
1 — в ацетонитриле; 2 — в смеси ацетонитрила с водой.

В случае гипохромизма допускалась возможность смещения таутомерного равновесия в результате полимеризации [374], но вновь экспериментальное измерение коэффициентов экстинкции показало, что дело обстоит иначе [373], а инфракрасные спектры указывают, что мономер и полимер имеют одни и те же таутомерные формы [375].

Весьма вероятно, что основной причиной гипохромизма является прямое взаимодействие гетероциклических оснований и что влияние на этот эффект образования водородных связей обусловлено в первую очередь укладкой нуклеотидов в упорядоченную структуру с фактически полным ограничением движения по сравнению с олигонуклеотидами. То, что даже для относительно больших эффектов ни водородные связи, ни спиральная структура не являются необходимыми, было продемонстрировано на примере динуклеозидфосфатов, полученных из 6-диметиламинопурина, оптическое поглощение которых при гидролизе возрастало на 35%. В то время как при или вблизи $\lambda_{\text{макс}}$ оптическое поглощение понижается, при больших длинах волн (приблизительно при 280—300 мμ для производных аденина и урацила) оно незначительно возрастает. Это увеличение хорошо заметно не только у высокомолекулярных полимеров,

но также и у динуклеотидов и более длинных олигонуклеотидов (рис. 8-38 и 8-39).

Кроме того, подобное увеличение оптической плотности при образовании олигонуклеотидов происходит и при коротких длинах волн (200—230 мμ). Даже в области $\lambda_{\text{мин}}$ гипохромизм претерпевает значительные количественные изменения. Действительно, кривые изменения оптической плотности с изменением длины волны

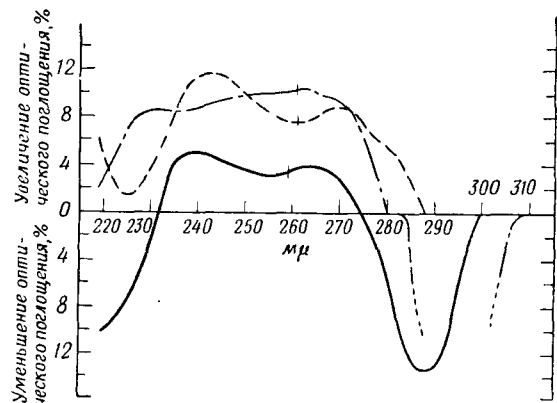


Р и с. 8-38. Изменение характера зависимости оптического поглощения от длины волны при щелочном рН при разрушении полиадениловой кислоты, содержащей как 2'—5', так и 3'—5'-связи (длина цепи приблизительно 10 нуклеотидов).

Короткая вертикальная полоса показывает положения $\lambda_{\text{макс}}$ полимера [261]. В щелочном растворе упорядоченная вторичная структура отсутствует, но при кислых значениях рН появляется *аци*-форма, сходная с той, которая наблюдалась [261, 417] у синтезированной ферментативным путем высокомолекулярной полиадениловой кислоты с длиной цепи более 6 нуклеотидов.

при гидролизе различных олигонуклеотидов имеют несколько пиков как в положительной, так и в отрицательной области [261]. Следует заметить, что максимальный гипохромизм, по крайней мере у препаратов, лишенных вторичной структуры, часто совпадает с $\lambda_{\text{макс}}$ (это выражается в «гипсохромном смещении» $\lambda_{\text{макс}}$). Величина рН, нуклеотидный состав, длина цепи и последовательность расположения нуклеотидных остатков сильно влияют на характер кривой; например, Ц3'ф5'А (с максимальным гиперхромизмом при 262 мμ) легко отличить от А3'ф5'Ц (максимум гиперхромизма при 242 мμ и второй пик при 272 мμ). Различия в этих кривых несомненно отражают как количественные, так и те различия в межплоскостном взаимодействии, которые связаны с частичным перекрытием пуриновых и пиримидиновых циклических систем [261].

При увеличении длины цепи олигонуклеотида гипохромизм быстро достигает предельного значения. Некоторый предел имеется также и для более высоких уровней спирализации структур за счет образования водородных связей, при котором значительное уменьшение молекулярного веса (на основании измерения вязкости) нативных нуклеиновых кислот при ферментативном гидролизе или разрушении ультразвуком уже может не сказываться на вели-



Р и с. 8-39. Изменение характера зависимости оптического поглощения от длины волны при щелочных значениях рН при разрушении до мономеров гуанилил-3':5'-аденозина (—) цитидил-3':5'-аденозина (---) и аденил-3':5'-цитидина (- · - · -).

Короткие вертикальные полосы показывают положение $\lambda_{\text{макс}}$ для динуклеозидфосфатов [261].

чине оптического поглощения. При комнатной температуре и умеренной ионной силе этот второй уровень, очевидно, достигается для упорядоченных структур, содержащих приблизительно 10 идеально спаренных нуклеотидов.

Теоретическая трактовка гипохромизма полинуклеотидов исходя из кулоновского взаимодействия (диполь — диполь) между различными основаниями позволяет предположить, что изменение оптического поглощения при переходе от упорядоченных структур к беспорядочным может быть связано с взаимодействием диполей, возникающих в хромофорах под действием света [376]. Вычисленные величины относительных коэффициентов поглощения нативной ДНК и ее мононуклеотидных компонентов подтверждаются экспериментальными наблюдениями*. Точные количественные

* Дальнейшие исследования [418] показали, что Г — Ц-полимеры должны обладать более высоким гипохромизмом, чем А — Т-полимеры. Так как это противоречит экспериментальным данным, был сделан вывод, что либо теория, либо эксперимент не верны. В последнем случае это может

эффекты взаимодействия диполей не могут быть определены вследствие недостаточности сведений о спектрах поглощения мононуклеотидов; невозможно было также и изучение гипохромизма денатурированной ДНК и других полинуклеотидов. Оказалось, что силы, возникающие при взаимодействии диполей, исключительно малы и не могут быть причиной ограничения вращения вокруг межунауклеотидных связей, которое наблюдается у олигонуклеотидов при всех значениях рН. Однако было сделано заключение, что спиральная структура не является необходимой для гипохромизма, и это соответствовало ранним экспериментальным наблюдениям (спиральная структура у динуклеозидфосфата невозможна). Впоследствии стало ясно, что доля участия возбужденных резонансных форм в этом взаимодействии уравнивается другими факторами, и в конечном счете какое-то значение имеют только силы лондоновского рассеяния. Расчеты приближенными методами для двух спиральных полинуклеотидов показали, что дисперсионным взаимодействием можно легко объяснить экспериментально наблюдаемый гипохромизм [377].

Приблизительный квантово-механический расчет перекрытия π -электронных систем между параллельными плоскостями оснований в ДНК при расстоянии 3,36 Å также указывает на существование заметного π -электронного взаимодействия, что может количественно объяснить аномалии в ультрафиолетовых спектрах олиго- и полинуклеотидов и частичную укладку оснований друг над другом даже в олигонуклеотидах без образования соответствующих водородных связей [378]. Различные величины перекрытия π -электронных систем для различных гетероциклических систем показывают, что распределение электронов и π -электронные взаимодействия зависят от последовательности оснований, что соответствует экспериментальным данным [379].

У полинуклеотидов и спиральных комплексов, кроме гипохромизма при $\lambda_{\text{макс}}$, возникающего в результате упаковки друг над другом $\pi \rightarrow \pi^*$ хромофорных единиц, гиперхромный эффект проявляется и при более длинных длинах волн. Такое увеличение оптического поглощения (при 280—300 мμ) замечено у нескольких спиральных полинуклеотидных комплексов. Этот эффект является дополнением к гиперхромизму, обнаруженному ранее у олиго-

быть следствием агрегации или особой укладки гуаниновых оснований друг над другом даже при высоких температурах. Более разумный теоретический подход был выбран при исчерпывающем обсуждении [419] теории гипохромизма как олигонуклеотидов, так и спиральных комплексов, исходя из возможности поляризации в поперечном и продольном направлении (которая в обоих случаях вызывает гипохромизм). Существенно, что при этом подходе понижение энергии рассеяния за счет колебания диполя рассматривается как следствие согласованного воздействия излучения, полученного от других диполей.

нуклеотидов [380], но, тем не менее, его приписывают выравниванию $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов [381].

Анализ кривых дихроизма ультрафиолетового поглощения ориентированных пленок спиральных полинуклеотидов также указывает на существование двух типов оптического вращения [381]. Так, для полицитидиловой кислоты наблюдались два больших пика при 270 и 225 мμ ($\pi \rightarrow \pi^*$ полосы), когда электрический вектор был перпендикулярен оси спирали (т. е. лежит в плоскости гетероциклических оснований; моменты $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов поляризованы в плоскости). В случае параллельной поляризации (параллельно оси спирали, но перпендикулярно плоскости оснований) поглощение было значительно менее интенсивным и наблюдался слабый размытый пик с $\lambda_{\text{макс}}$ около 280 мμ, который приписывался $\pi \rightarrow \pi^*$ переходу (эта полоса поглощения свойственна более низкой интенсивности; дипольные моменты перехода поляризованы вне плоскости) [381]. Кривые дисперсии ультрафиолетового вращения нативной и денатурированной ДНК, РНК и смеси мононуклеотидов также согласуются с $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами (поляризованными перпендикулярно оси спирали) и $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами, которые вызывают появление пиков при 257 и 289 мμ соответственно [382, 383].

После более детального изучения поляризованных спектров ориентированных пленок двухспиральных сополимеров (дезоксиденилил-тимидиловой кислоты) [384] тот факт, что именно $\pi \rightarrow \pi^*$ переход приводит к появлению гиперхромной полосы при 280 мμ в спиральных комплексах типа полиаденилил-полиуридиловой кислоты [381], был подвергнут серьезному сомнению. Дихроизм в пике поглощения составлял 2,3, но для всей полосы были получены близкие значения (2,2 при 250 мμ; 2,3 при 260 мμ; 2,4 при 270 мμ; 2,5 при 280 мμ и 2,2 при 290 мμ). Таким образом, оказалось, что плечо при 280 мμ, не обладающее обратным дихроизмом по отношению к главному пику, является результатом той же перпендикулярной поляризации и, что более вероятно, отражает также переход в плоскости оснований [384].

Влияние длины цепи олигомера на гипохромизм двухцепочечного спирального комплекса полирибоадениловой (высокомолекулярной) кислоты и олиготимидиловой кислоты с длиной цепи от 2 до 16 нуклеотидов было интерпретировано таким образом, что оно указывало на присутствие «свободных концов» из 2—4 остатков тимидиловой кислоты [385]. Оказалось, что двухцепочечные структуры совершенно не похожи на трехцепочечные комплексы, содержащие олигонуклеотиды, в том отношении, что последние фактически совершенно жесткие; оказалось также, что они отличаются от двухспиральных комплексов, образованных полиуридиловой и олигоадениловой кислотами [386], по-видимому, вследствие более сильного межплоскостного взаимодействия в олигоаденило-

вой кислоте по сравнению с олиготимидиловой кислотой. Однако выводы из работы, в которой были обнаружены «свободные концы», необходимо делать с оговорками вследствие того, что использованные олиготимидиловые кислоты обладали сомнительной гомогенностью, структурой, чистотой и длиной цепи [388].

Литература

1. Michelson A. M., Ann. Rev. Biochem., 30, 133 (1961).
2. Michelson A. M., Nature, 182, 1502 (1958).
3. Michelson A. M., Nature, 181, 303 (1958).
4. Michelson A. M., Acta Biochim. Polon., 6, 335 (1959).
5. Kunitz M., J. Biol. Chem., 164, 563 (1946); J. Gen. Physiol., 33, 349 (1950).
6. Oster G., Grimsson H., Arch. Biochem. Biophys., 24, 119 (1949).
7. Ogur M., Rosen G., Arch. Biochem. Biophys., 25, 262 (1950).
8. Tsuboi K. K., Biochim. et Biophys. Acta, 6, 202 (1950).
9. Magasanik B., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, 7, 396 (1951).
10. Little J. A., Butler G. C., J. Biol. Chem., 188, 695 (1951).
11. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., J. Biol. Chem., 195, 49 (1952).
12. Thomas R., Bull. soc. chim. biol., 35, 609 (1953).
13. Mallette M. F., Lamanna C., Arch. Biochem. Biophys., 51, 217 (1954).
14. Holden M., Pirie N. W., Biochim. et Biophys. Acta, 16, 317 (1955).
15. de Garilhe M. P., Laskowski M., J. Biol. Chem., 223, 661 (1956).
16. Gierer A., Nature, 179, 1297 (1957).
17. Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., in The Nucleic Acids, 1, 517 (Academic Press, New York, 1955).
18. Chargaff E., Zamenhof S., J. Biol. Chem., 173, 327 (1948).
19. Sinsheimer R. L., J. Biol. Chem., 208, 445 (1954).
20. Shapiro H. S., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, 26, 596 (1957).
21. Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1959, 1371.
22. Michelson A. M., J. Chem. Soc., 1959, 3655.
23. Lister J. H., J. Chem. Soc., 1960, 3394.
24. Michelson A. M., Biochim. et Biophys. Acta, 55, 841 (1962).
25. Riess J., Ourisson G., Bull. soc. chim., 1961, 1243.
26. Janion C., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 309 (1960).
27. Wierzchowski K. L., Shugar D., Acta Biochim. Polon., 7, 377 (1960).
28. Wierzchowski K. L., Shugar D., Photochem. and Photobiol., 1, 21 (1962).
29. Scott J. F., Physical Techniques in Biological Research, ed. Oster, G., Pollister A. W., 1, 144 (Academic Press, New York, 1955).
30. Laland S. G., Lee W. A., Overend W. G., Peacocke A. R., Biochim. et Biophys. Acta, 14, 356 (1954).
31. Peacocke A. R., Chem. Soc. Special Publ., № 8, p. 163 (1957).
32. Geidushek E. P., J. Polymer Sci., 31, 67 (1958).
33. Waugh D. F., Advances in Protein Chemistry, XI, 325 (1954).

34. Ts' O P. O. P., Helmkamp G. K., Sander C., Federation Proc., **20**, 352 (1961).
35. Michaelis L., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **12**, 131 (1947).
36. Davison P. F., Butler J. A. V., Biochim. et Biophys. Acta, **21**, 568 (1956).
37. Cavalieri L. F., Angelos A., J. Am. Chem. Soc., **72**, 4686 (1950).
38. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, **19**, 160 (1956).
39. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, **19**, 328 (1956).
40. Weissman N., Carnes W. H., Rubin P. S., Fisher J., J. Am. Chem. Soc., **74**, 1423 (1952).
41. Steiner R. F., Beers R. F., Science, **127**, 335 (1958).
42. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, **22**, 451 (1956).
43. Irvin J. L., Irvin E. M., J. Biol. Chem., **206**, 39 (1954).
44. de Bruyn P. P. H., Farr R. S., Banks H., Morthland F. W., Exptl. Cell Research., **4**, 174 (1953).
45. Morthland F. W., de Bruyn P. P. H., Smith N. H., Exptl. Cell Research., **7**, 201 (1954).
46. Peacocke A. R., Skerrett T. N. H., Trans. Faraday Soc., **52**, 361 (1956).
47. Cavalieri L. F., Stone A. L., J. Am. Chem. Soc., **78**, 353 (1956).
48. Cavalieri L. F., Angelos A., Balis M. E., J. Am. Chem. Soc., **73**, 4902 (1951).
49. Bradley D. F., Wolf M. K., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 944 (1959).
50. Bradley D. F., Felsenfeld G., Nature, **184**, 1920 (1959).
51. Stone A. L., Bradley D. F., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3627 (1961).
52. Rabinowitch E., Epstein L. F., J. Am. Chem. Soc., **63**, 69 (1941).
53. Sheppard S. E., Geddes A. L., J. Am. Chem. Soc., **66**, 1995 (1944).
54. White J. C., Elmes P. C., Nature, **169**, 151 (1952).
55. Cavalieri L. F., Kerr S. E., Angelos A., J. Am. Chem. Soc., **73**, 2567 (1951).
56. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, **19**, 328 (1956).
57. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, **19**, 160 (1956).
58. Adamec A., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **6**, 425 (1959).
59. Pour-El A., Dekker C. A., Abstracts 137th Am. Chem. Soc. Meeting, 13c (1960).
60. Yamane T., Davidson N., J. Am. Chem. Soc., **83**, 2599 (1961).
61. Cavalieri L. F., J. Am. Chem. Soc., **75**, 5268 (1953).
62. Lee W. A., Peacocke A. R., J. Chem. Soc., 1951, 3361.
63. Cavalieri L. F., Stone A. L., J. Am. Chem. Soc., **77**, 6499 (1955).
64. Warner R. C., J. Biol. Chem., **229**, 711 (1957).
65. Lipsett M. N., Heppel L. A., Bradley D. F., Biochim. et Biophys. Acta, **41**, 175 (1960).
66. Lipsett M. N., Federation Proc., **19**, 316 (1960).
67. Rich A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **46**, 1044 (1960).
68. Lipsett M. N., Heppel L. A., Bradley D. F., J. Biol. Chem., **236**, 857 (1961).
69. Schildkraut C. L., Marmur J., Fresco J. R., Doty P., J. Biol. Chem., **236**, PC2 (1961).
70. Szer W., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **8**, 235 (1961).
71. Doty P., Harvey Lectures, 1960.
72. Wierzchowski K. L., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **6**, 313 (1959).

73. Shugar D., Baranowska J., Nature, **185**, 33 (1960).
74. Baranowska J., Shugar D., Acta Biochim. Polon., **7**, 505 (1960).
75. Beukers R., Berends W., Biochim. et Biophys. Acta, **41**, 550 (1960).
76. Wang S. Y., Nature, **190**, 690 (1961).
77. Beukers R., Berends W., Biochim. et Biophys. Acta, **49**, 181 (1961).
78. Wacker A., Dellweg H., Lodemann E., Angew. Chem., **73**, 64 (1961).
79. Wulff D. L., Fraenkel G., Biochim. et Biophys. Acta, **51**, 332 (1961).
80. Marmur J., Crossman L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 778 (1961).
81. Geiduschek E. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 950 (1961).
82. Goodman M., Schmitt E. E., Yphantis D., J. Am. Chem. Soc., **82**, 3483 (1960).
83. Warner R. C., J. Biol. Chem., **229**, 711 (1957).
84. Rich A., Davies D. R., J. Am. Chem. Soc., **78**, 3548 (1956).
85. Felsenfeld G., Rich A., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 457 (1957).
86. Steiner R. F., Beers R. F., Biochim. et Biophys. Acta, **33**, 470 (1959).
87. Felsenfeld G., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 133 (1958).
88. Felsenfeld G., Davies D. R., Rich A., J. Am. Chem. Soc., **79**, 2023 (1957).
89. Rich A., Reviews of Modern Physics, **31**, 191 (1959).
90. Rich A., Nature, **181**, 521 (1958).
91. Davies D. R., Rich A., J. Am. Chem. Soc., **80**, 1003 (1958).
92. Davies D. R., Nature, **196**, 1030 (1960).
93. Mii S., Warner R. C., Federation Proc., **19**, 317 (1960).
94. Fresco J. R., Doty P., J. Am. Chem. Soc., **79**, 3928 (1957).
95. Steiner R. F., Beers R. F., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 166 (1959).
96. Bryan R. F., Tomita K., Nature, **192**, 812 (1961).
97. Fresco J. R., J. Mol. Biol., **1**, 106 (1959).
98. Rich A., Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna, 1958, IX, 137.
99. Rich A., Davies D. R., Crick F. H., Watson J. D., J. Mol. Biol., **3**, 71 (1961).
100. Bendich A., Rosenkranz H., неопубликованные данные.
101. Rich A., Biochim. et Biophys. Acta, **29**, 502 (1958).
102. Miles H. T., Biochim. et Biophys. Acta, **45**, 196 (1960).
103. Miles H. T., Biochim. et Biophys. Acta, **30**, 324 (1958); **35**, 274 (1959); Nature, **183**, 1814 (1959).
104. Doty P., Reviews of Modern Physics, **31**, 107 (1959).
105. Warner R. C., Breslow E., Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna, 1958, IX, 157.
106. Griffin B. E., Todd A. R., Rich A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **44**, 1123 (1958).
107. Michelson A. M., Dondon J., Grunberg-Manago M., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 529 (1962).
108. Fresco J. R., Federation Proc., **18**, 904 (1949).
109. Fresco J. R., Klempner E., Ann. New York Acad. Sci., **81**, 730 (1959).
110. Steiner R. F., Beers R. F., Biochim. et Biophys. Acta, **26**, 336 (1957).

111. Lipsett M. N., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **46**, 445 (1960).
112. Steiner R. F., Beers R. F., Arch. Biochem. Biophys., **81**, 75 (1959).
113. Lerman L. S., J. Mol. Biol., **3**, 18 (1961).
114. Luzzati V., Masson F., Lerman L. S., J. Mol. Biol., **3**, 634 (1961).
115. Neville D. M., Bradley D. F., Biochim. et Biophys. Acta, **50**, 397 (1961).
116. Felsenfeld G., Huang S., Biochim. et Biophys. Acta, **37**, 425 (1960).
117. Felsenfeld G., Huang S., Biochim. et Biophys. Acta, **34**, 234 (1959).
118. Breslow E., Warner R. C., Federation Proc., **18**, 775 (1959).
119. Steiner R. F., Ann., New York Acad. Sci., **81**, 742 (1959).
120. Steiner R. F., J. Biol. Chem., **235**, 2946 (1960).
121. Fresco J. R., Alberts B. M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **46**, 311 (1960).
122. Steiner R. F., J. Biol. Chem., **236**, 842 (1961).
123. Steiner R. F., J. Biol. Chem., **236**, 3037 (1961).
124. Michelson A. M., неопубликованные данные.
125. Michelson A. M., Grunberg-Manago M., неопубликованные данные.
126. Astbury W. T., Bell F. O., Nature, **141**, 747 (1938).
127. Astbury W. T., Symposia Soc. Exptl. Biol., **1**, 66 (1947).
128. Signer R., Caspersson T., Hammarsten E., Nature, **141**, 122 (1938).
129. Caspersson T., Chromosoma, **1**, 605 (1940).
130. Gulland J. M., Jordan D. O., Symposia Soc. Exptl. Biol., **1**, 56 (1947).
131. Gulland J. M., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **12**, 95 (1947).
132. Furberg S., Acta Cryst., **3**, 325 (1950); Nature, **164**, 22 (1949).
133. Furberg S., Acta Chem. Scand., **6**, 634 (1952).
134. Pauling L., Corey R. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **39**, 84 (1953); Nature, **171**, 346 (1953).
135. Franklin R. E., Gosling R. G., Acta Cryst., **6**, 673 (1953).
136. Watson J. D., Crick F. H. C., Nature, **171**, 737, 964 (1953).
137. Chargaff E., Experientia, **6**, 201 (1950).
138. Wyatt G. R., Biochem. J., **48**, 584 (1951); J. Gen. Physiol., **36**, 201 (1952).
139. Wilkins M. H. F., Stokes A. R., Wilson H. R., Nature, **171**, 738 (1953).
140. Franklin R. E., Gosling R. G., Nature, **171**, 740 (1953).
141. Wilkins M. H. F., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., Nature, **172**, 759 (1953).
142. Langridge R., Seeds W. E., Wilson H. R., Hooper C. S., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., J. Biophys. Biochem. Cytol., **3**, 767 (1957).
143. Marvin D. A., Spencer M., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., Nature, **182**, 387 (1958).
144. Langridge R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., J. Mol. Biol., **2**, 19 (1960).
145. Langridge R., Marvin D. A., Seeds W. E., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., J. Mol. Biol., **2**, 38 (1960).
146. Marvin D. A., Spenser M., Wilkins M. H. F., Hamilton L. D., J. Mol. Biol., **3**, 547 (1961).

147. Sutherland G. B. B. M., Tsuboi M., Proc. Roy. Soc., **239A**, 446 (1957).
148. Wilkinson G. R., Price W. C., Bradbury E. M., Spectrochimica Acta, **14**, 284 (1959).
149. Bradbury E. M., Price W. C., Wilkinson G. R., J. Mol. Biol., **3**, 301 (1961).
150. Blout E. R., Lenormant H., Biochim. et Biophys. Acta, **17**, 325 (1955).
151. Shimanouchi T., Tsuboi M., Kyogoku Y., Watanabe I., Biochim. et Biophys. Acta, **45**, 195 (1960).
152. Kyogoku Y., Tsuboi M., Shimanouchi T., Watanabe I., J. Mol. Biol., **3**, 741 (1961).
153. Kyogoku Y., Tsuboi M., Shimanouchi T., Watanabe I., Nature, **189**, 120 (1961).
154. Balazs E. A., Bothner-By A. A., Gergely J., J. Mol. Biol., **1**, 147 (1959); см. также [407].
155. Jacobson B., Nature, **172**, 666 (1953); J. Am. Chem. Soc., **77**, 2919 (1955).
156. Jacobson B., Anderson W. A., Arnold J. T., Nature, **173**, 772 (1954).
157. Wang J. H., J. Am. Chem. Soc., **77**, 258 (1955).
158. Hearst J. E., Vinograd J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 825, 1005 (1961).
159. Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., **1**, 43 (1959).
160. Hall C. E., Litt M., J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**, 1 (1958).
161. Hall C. E., Proceedings of the IVth International Congress of Biochemistry, Vienna, 1958, IX, 90.
162. Jordan D. O., The Nucleic Acids (ed. E. Chargaff and J. N. Davidson, Academic Press, New York, 1955), **1**, 470.
163. Shooter K. V., Butler J. A. V., Nature, **177**, 1033 (1956).
164. Rosenkranz H. S., Bendich A., J. Am. Chem. Soc., **81**, 902 (1959).
165. Butler J. A. V., Laurence D. J. R., Robins A. B., Shooter K. V., Nature, **180**, 1340 (1957).
166. Cavalieri L. F., J. Am. Chem. Soc., **79**, 5319 (1957).
167. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., J. Am. Chem. Soc., **81**, 5136 (1959).
168. Davidson P. F., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 1560 (1959).
169. Rosenkranz H. S., Bendich A., J. Am. Chem. Soc., **82**, 3198 (1960).
170. Hershey A. D., Burgi E., J. Mol. Biol., **2**, 143 (1960).
171. Levinthal C., Davison P. F., J. Mol. Biol., **3**, 674 (1961).
172. Hall C. E., Litt M., J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**, 1 (1958).
173. Doty P., McGill B. B., Rice S. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **44**, 432 (1958).
174. Laland S. G., Overend W. G., Stacey M., J. Chem. Soc., **1952**, 303.
175. Davison P. F., Nature, **185**, 918 (1960).
176. Cavalieri L. F., Deutsch J. F., Federation Proc., **19**, 306 (1960).
177. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., Deutsch J. F., Biochem. Biophys. Research Commun., **1**, 124 (1959).
178. Cavalieri L. F., Finston R., Rosenberg B. H., Nature, **189**, 833 (1961).
179. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., Biophys. J., **1**, 323 (1961).

180. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., *Biophys. J.*, **1**, 317 (1961).
181. Hall C. E., Cavalieri L. F., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**, 347 (1961).
182. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., *Biophys. J.*, **1**, 337 (1961).
183. Bernardi G., Champagne M., Sadron C., *Nature*, **188**, 228 (1960); *Biochim. et Biophys. Acta*, **49**, 1 (1961).
184. Bernardi G., Sadron C., *Nature*, **191**, 809 (1961).
185. Burgi E., Hershey A. D., *J. Mol. Biol.*, **3**, 458 (1961).
186. Davison P. F., Freifelder D., Hede R., Levinthal C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 1123 (1961).
187. Cairns J., *J. Mol. Biol.*, **3**, 756 (1961).
188. Rubenstein I., Thomas C. A., Hershey A. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 1113 (1961).
189. Montague M. D., Morton R. K., *Nature*, **187**, 916 (1960).
190. Appleby C. A., Morton R. K., *Biochem. J.*, **75**, 258 (1960).
191. Boedtker H., *Biochim. et Biophys. Acta*, **32**, 519 (1959).
192. Cheng P. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **45**, 1557 (1959).
193. Steudel H., *Z. physiol. Chem.*, **77**, 497 (1912).
194. Levene P. A., Simms H. S., *J. Biol. Chem.*, **65**, 519 (1925); **70**, 327 (1926).
195. Hammarsten E., *Biochem. Z.*, **144**, 383 (1924).
196. Jorpes E., *Biochem. J.*, **28**, 2102 (1934).
197. Gulland J. M., Jordan D. O., Taylor H. F. W., *J. Chem. Soc.*, **1947**, 1131.
198. Cosgrove D. J., Jordan D. O., *J. Chem. Soc.*, **1949**, 1413.
199. Signer R., Schwander H., *Helv. Chim. Acta*, **32**, 853 (1949).
200. Lee W. A., Peacocke A. R., *J. Chem. Soc.*, **1951**, 3361.
201. Cox R. A., Peacocke A. R., *J. Chem. Soc.*, **1956**, 2499.
202. Jordan D. O., Mathieson A. R., Matty S., *J. Chem. Soc.*, **154**, 158 (1956).
203. Cox R. A., Peacocke A. R., *J. Chem. Soc.*, **1957**, 4724.
204. Peacocke A. R., Preston B. N., *J. Chem. Soc.*, **1959**, 2433.
205. Geiduschek E. P., *J. Polymer Sci.*, **31**, 67 (1958).
206. Cox R. A., Peacocke A. R., *J. Chem. Soc.*, **1958**, 4117.
207. Cox R. A., Peacocke A. R., *J. Chem. Soc.*, **1956**, 2646.
208. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5352 (1957).
209. Cavalieri L. F., Stone A. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6499 (1955).
210. Cavalieri L. F., Rosoff M., Rosenberg B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5239 (1956).
211. Thomas C. A., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1854 (1956).
212. Thomas R., *Biochim. et Biophys. Acta*, **14**, 231 (1954).
213. Inman R. B., Jordan D. O., *Biochim. et Biophys. Acta*, **42**, 427 (1960).
214. Duggan E. L., Stevens V. L., Grunbaum B. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4859 (1957).
215. Zubay G., *Biochim. et Biophys. Acta*, **28**, 644 (1958).
216. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., *Biochim. et Biophys. Acta*, **21**, 202 (1956).
217. Pauling L., *The Nature of the Chemical Bond*, p. 452, Oxford University Press, 3rd Edition, 1960.
218. Ehrlich P., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4251 (1958).

219. Cox R. A., Jones A. S., Marsh G. E., Peacocke A. R., *Biochim. et Biophys. Acta*, **21**, 576 (1956).
220. Fletcher W. E., Gulland J. M., Jordan D. O., *J. Chem. Soc.*, **1944**, 33.
221. Signer R., Schwander H., *Helv. Chim. Acta*, **32**, 853 (1949).
222. Vallet G., Schwander H., *Helv. Chim. Acta*, **32**, 2508 (1949).
223. Creeth J. M., Gulland J. M., Jordan D. O., *J. Chem. Soc.*, **1947**, 1141.
224. Jordan D. O., *Trans. Faraday Soc.*, **46**, 792 (1950).
225. Conway B. E., Butler J. A. V., *J. Polymer Sci.*, **12**, 199 (1954).
226. Schwander H., Cerf R., *Helv. Chim. Acta*, **32**, 2356 (1949); **34**, 436 (1951).
227. Reichmann M. E., Varin R., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3203 (1952).
228. Rowen J. W., Eden M., Kahler H., *Biochim. et Biophys. Acta*, **10**, 89 (1953).
229. Schwander H., *J. chim. phys.*, **47**, 718 (1950).
230. Doty P., Bunce B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5029 (1952).
231. Steiner R. F., *Trans. Faraday Soc.*, **48**, 1185 (1952).
232. Seeds W. E., Wilkins M. H. F., *Discussions Faraday Soc.*, **№ 9**, 417 (1950).
233. Wilkins M. H. F., Goslig R. G., Seeds W. E., *Nature*, **167**, 759 (1951).
234. Cavalieri L. F., Rosenberg B. H., Rosoff M., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5235 (1956).
235. Cavalieri L. F., Rosoff M., Rosenberg B. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5239 (1956).
236. Zamenhof S., Griboff G., Marullo N., *Biochim. et Biophys. Acta*, **13**, 459 (1954).
237. Rice S. A., Doty P., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3937 (1957).
238. Doty P., Boedtker H., Fresco J. R., Haselkorn R., Litt M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **45**, 482 (1959).
239. Hall C. E., Litt M., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 1 (1958).
240. Marmur J., Doty P., *Nature*, **183**, 1427 (1959).
241. Watson J. D., Littlefield J. W., *J. Mol. Biol.*, **2**, 161 (1960).
242. Marmur J., *Biochim. et Biophys. Acta*, **38**, 342 (1960).
243. Laland S. G., Lee W. A., Overend W. G., Peacocke A. R., *Biochim. et Biophys. Acta*, **14**, 356 (1954).
244. Kit S., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **3**, 361 (1960).
245. Sueoka N., Marmur J., Doty P., *Nature*, **183**, 1429 (1959).
246. Rolfe R., Meselson M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **45**, 1039 (1959).
247. Marmur J., Schildkraut C. L., *Nature*, **189**, 636 (1961).
248. Pullman B., Pullman A., *Biochim. et Biophys. Acta*, **36**, 343 (1959).
249. Pullman B., Pullman A., *Nature*, **189**, 725 (1961).
250. Pauling L., Corey R. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 164 (1956).
251. Schuster H., *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **2**, 320 (1960); *Z. Naturforsch.*, **15b**, 298 (1960).
252. Paleček E., *Nature*, **188**, 656 (1960); *Biochim. et Biophys. Acta*, **51**, 1 (1961).
253. Rosenkranz H. S., Bendich A., *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6255 (1959).
254. Kit S., *Nature*, **184**, 36 (1959).
255. Marmur J., Lane D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **46**, 453 (1960).

256. Doty P., Marmur J., Eigner J., Schildkraut C. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1960, 46.
257. Ginoza W., Zimm B. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 47, 639 (1961).
258. Roger M., Hotchkiss R. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 47, 653 (1961).
259. Tamm C., Hodes M. E., Chargaff E., J. Biol. Chem., 195, 49 (1952).
260. Michelson A. M., Todd A. R., J. Chem. Soc., 1955, 2632.
261. Michelson A. M., неопубликованные данные.
262. Ascoli F., Botré C., Liquori A. M., J. Mol. Biol., 3, 202 (1961).
263. Shack J., Thompson J. M., J. Biol. Chem., 197, 17 (1952).
264. Thomas R., Biochim. et Biophys. Acta, 14, 231 (1954).
265. Cavalieri L. F., Rosoff M., Rosenberg B. H., J. Am. Chem. Soc., 78, 5239 (1956).
266. Lawley P. D., Biochim. et Biophys. Acta, 21, 481 (1956).
267. Shack J., J. Biol. Chem., 233, 677 (1958).
268. Inman R. B., Jordan D. O., Biochim. et Biophys. Acta, 42, 421, 427 (1960).
269. Ascoli F., Botré C., Crescenzi V., Mele A., Nature, 184, 1482 (1959).
270. Emmanuel C. F., Biochim. et Biophys. Acta, 42, 91 (1960).
271. Shack J., Jenkins R. J., Thompson J. M., J. Biol. Chem., 203, 373 (1953).
272. Спирин А. С., Гаврилова Л. П., Белозерский А. Н., ДАН СССР, 125, 658 (1959).
273. Dove W. F., Wallace F. A., Davidson N., Biochem. Biophys. Research Commun., 1, 312 (1959).
274. Bunville L. G., Geiduschek E. P., Biochem. Biophys. Research Commun., 2, 287 (1960).
275. Nagasawa M., Rice S. A., J. Am. Chem. Soc., 82, 5070 (1960).
276. Jones A. S., Biochim. et Biophys. Acta, 10, 607 (1953).
277. Aubel-Sadron G., Beck G., Ebel J.-P., Sadron C., Biochim. et Biophys. Acta, 42, 542 (1960).
278. Aubel-Sadron G., Beck G., Ebel J.-P., Biochim. et Biophys. Acta, 53, 11 (1961).
279. Hirth L., Lebeurier G., Aubel-Sadron G., Beck G., Ebel J.-P., Horn P., Nature, 188, 689 (1960); см. также [318].
280. Helmkamp G. K., Ts'O P.O.P., Federation Proc., 19, 316 (1960).
281. Helmkamp G. K., Ts'O P.O.P., J. Am. Chem. Soc., 83, 138 (1961); Biochim. et Biophys. Acta, 55, 601 (1962); Ts'O P.O.P., Helmkamp G. K., Sander C., Biochim. et Biophys. Acta, 55, 584 (1962).
282. Ts'O P.O.P., Helmkamp G. K., Tetrahedron, 13, 198 (1961).
283. Marmur J., Ts'O P.O.P., Biochim. et Biophys. Acta, 51, 32 (1961).
284. Geiduschek E. P., Herskovits T. T., Arch. Biochem. Biophys., 95, 114 (1961).
285. Geiduschek P., Gray I., J. Am. Chem. Soc., 78, 879 (1956).
286. Coates J. H., Jordan D. O., Biochim. et Biophys. Acta, 43, 214 (1960).
287. Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 1, 43 (1959).
288. Herskovits T. T., Singer S. J., Geiduschek E. P., Arch. Biochem. Biophys., 94, 99 (1961).
289. Duggan E. L., Biochem. Biophys. Research Commun., 6, 93 (1961).

290. Rice S. A., Geiduschek E. P., Discussions Faraday Soc., № 25, 215 (1958).
291. Klotz I. M., Stryker V. H., J. Am. Chem. Soc., 82, 5169 (1960).
292. Steiner R. F., Nature, 190, 340 (1961).
293. Pfau C. J., McCrea J. F., Biochim. et Biophys. Acta, 55, 271 (1962).
294. Tessman I., Virology, 7, 263 (1959).
295. Sinsheimer R. L., J. Mol. Biol., 1, 37 (1959).
296. Dekker C. A., Schachman H. K., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 40, 894 (1954).
297. Schumaker V. N., Richards E. G., Schachman H. K., J. Am. Chem. Soc., 78, 4230 (1956).
298. Lehman I. R., J. Biol. Chem., 235, 1479 (1960).
299. Stevens V. L., Duggan E. L., J. Am. Chem. Soc., 79, 5703 (1957).
300. Korngold G. C., Bendich A., Abstracts 138th Am. Chem. Soc. Meeting, 52C (1960).
301. Matsubara K., Takagi Y., Biochim. et Biophys. Acta, 55, 389 (1962).
302. Setlow R., Biochim. et Biophys. Acta, 39, 180 (1960).
303. Setlow J. K., Setlow R. B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 47, 1619 (1961).
304. Inman R. B., Jordan D. O., Biochim. et Biophys. Acta, 43, 206 (1960).
305. Doty P., Harvey Lectures, 1960.
306. Kit S., Biochem. Biophys. Research Commun., 3, 377 (1960).
307. Zubay G., Wilkins M. H. F., J. Mol. Biol., 2, 105 (1960).
308. Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol., 3, 585 (1961).
309. Rownd R., Lanyi J., Doty P., Biochim. et Biophys. Acta, 53, 225 (1961).
310. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol., 3, 595 (1961).
311. Kuhn W., Experientia, 13, 301 (1957).
312. Longuet-Higgins H. C., Zimm B. H., J. Mol. Biol., 2, 1 (1960).
313. Geiduschek E. P., Federation Proc., 20, 353 (1961).
314. Grossman L., Levine S. S., Allison W. S., J. Mol. Biol., 3, 47 (1961).
315. Sarkar N. K., Dounce A. L., Biochim. et Biophys. Acta, 49, 160 (1961).
316. Beer M., Thomas C. A., J. Mol. Biol., 3, 699 (1961).
317. Levine L., Murakami W. T., Abst. Vth International Biochemical Congress, Moscow, 1961, 73.
318. Weil J. H., Ebel J. P., Monier R., Nature, 192, 169 (1961).
319. Gierer A., Schramm G., Nature, 177, 702 (1956).
320. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Williams R. C., Biochim. et Biophys. Acta, 25, 87 (1957).
321. Boedtker H., J. Mol. Biol., 2, 171 (1960).
322. Ginoza W., Nature, 181, 958 (1958).
323. Гаврилова Л. П., Спирин А. С., Белозерский А. Н., ДАН СССР, 124, 933 (1959).
324. Гаврилова Л. П., Спирин А. С., Белозерский А. Н., ДАН СССР, 126, 1121 (1959).
325. Fraenkel-Conrat H., Biochim. et Biophys. Acta, 15, 307 (1954).
326. Haselkorn R., Doty P., J. Biol. Chem., 236, 2738 (1961).
327. Grunberg-Manago M., J. Mol. Biol., 1, 240 (1959).

328. Haschemeyer E., Singer B., Fraenkel-Conrat H., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 313 (1959).
329. Спирин А. С., Гаврилова Л. П., Белозерский А. Н., ДАН СССР, **125**, 658 (1959).
330. Спирин А. С., Гаврилова Л. П., Бреслер С. Е., Мосевитский М. И., Биохимия, **24**, 938 (1959).
331. Gieger A., Z. Naturforsch., **13b**, 477 (1958).
332. Gieger A., Nature, **179**, 1297 (1957).
333. Rice R. V., Biochim. et Biophys. Acta, **53**, 29 (1961).
334. Спирин А. С., J. Mol. Biol., **2**, 436 (1960).
335. Кисилев Н. А., Гаврилова Л. П., Спирин А. С., J. Mol. Biol., **3**, 778 (1961).
336. Hummel J. P., Kalnitsky G., J. Biol. Chem., **234**, 1517 (1959).
337. Littauer U. Z., Eisenberg H., Biochim. et Biophys. Acta, **32**, 320 (1959).
338. Cox R. A., Littauer U. Z., Nature, **184**, 818 (1959); Biochim. et Biophys. Acta, **61**, 197 (1962).
339. Hall B. D., Doty P., J. Mol. Biol., **1**, 111 (1959).
340. Cox R. A., Jones A. S., Marsh G. E., Peacocke A. R., Biochim. et Biophys. Acta, **21**, 576 (1956).
341. Schlessinger D., J. Mol. Biol., **2**, 92 (1960).
342. Zubay G., Wilkins M. H. F., J. Mol. Biol., **2**, 105 (1960).
343. Shimanouchi T., Tsuboi M., Kyogoku Y., Watanabe I., Biochim. et Biophys. Acta, **45**, 195 (1960).
344. Allen E. H., Glassman E., Schweert R. S., J. Biol. Chem., **235**, 1061 (1960).
345. Zillig W., Schachtschabel D., Krone W., Z. physiol. Chem., **318**, 100 (1960).
346. Brown G. L., Zubay G., J. Mol. Biol., **2**, 287 (1960).
347. Osawa S., Biochim. et Biophys. Acta, **43**, 110 (1960).
348. Otake E., Osawa S., Nature, **185**, 921 (1960).
349. Tissières A., J. Mol. Biol., **1**, 365 (1959).
350. Hartmann G., Coy U., Biochim. et Biophys. Acta, **47**, 612 (1961).
351. Takanami M., Okamoto T., Watanabe F., J. Mol. Biol., **3**, 476 (1961).
352. Cox R. A., Littauer U. Z., J. Mol. Biol., **2**, 166 (1960).
353. Singer M. F., Luborsky S., Morrison R. A., Cantoni G. L., Biochim. et Biophys. Acta, **38**, 568 (1960).
354. Preiss J., Berg P., Ofengand E. J., Bergman F. H., Dieckmann M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **45**, 319 (1959).
355. Fresco J. R., Lesk A. M., Gorn R., Doty P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3155 (1961).
356. Fresco J. R., Givelber H., неопубликованные данные.
357. Fresco J. R., Alberts B. M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **46**, 311 (1960).
358. Lipsett M. N., Heppel L., Bradley D. F., Biochim. et Biophys. Acta, **41**, 175 (1960).
359. Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P., Nature, **188**, 98 (1960).
360. Feigelman M., Langridge R., Seeds W. E., Stokes A. R., Wilson H. R., Hooper C. W., Wilkins M. H. F., Barclay R. K., Hamilton L. D., Nature, **175**, 834 (1955).
361. Wilkins M. H. F., Zubay G., Wilson H. R., J. Mol. Biol., **1**, 179 (1959).
362. Cohen S. S., J. Biol. Chem., **158**, 255 (1945).
363. Shack J., Thompson J. M., J. Biol. Chem., **197**, 17 (1952).
364. Klug A., Finch J. T., J. Mol. Biol., **2**, 201 (1960).

365. Zubay G., Wilkins M. H. F., J. Mol. Biol., **2**, 105 (1960).
366. Klug A., Holmes K. C., Finch J. T., J. Mol. Biol., **3**, 87 (1961).
367. Bonhoeffer F., Schachman H. K., Biochem. Biophys. Research Commun., **2**, 366 (1960).
368. Franklin R. E., Caspar D. L. D., Klug A., Problems and Progress in Plant Pathology 1908—1958, p. 447 (University of Wisconsin Press 1959).
369. Спирин А. С., Гаврилова Л. П., Белозерский А. Н., Биохимия, **24**, 600 (1959).
370. Magasanik B., Chargaff E., Biochim. et Biophys. Acta, **7**, 396 (1951).
371. Mihalyi E., Bradley D. F., Knoller M. I., J. Am. Chem. Soc., **79**, 6387 (1957).
372. Reddi K. K., Biochim. et Biophys. Acta, **27**, 1 (1958).
373. Haselkorn R., Ph. D. Thesis, The Conformational Properties of Synthetic Polynucleotides in Solution, Harvard University (1959).
374. Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A., in The Nucleic Acids, **1**, 525, ed. Chargaff E., Davidson J. N. (Academic Press, New York, 1955).
375. Miles H. T., Biochim. et Biophys. Acta, **30**, 324 (1958).
376. Tinoco I., J. Am. Chem. Soc., **82**, 4785 (1960).
377. Rhodes W., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3609 (1961).
378. Ladik J., Acta Phys. Acad. Sci. Hung., **11**, 239 (1960).
379. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 3655.
380. Michelson A. M., J. Chem. Soc., **1959**, 1371.
381. Rich A., Kasha M., J. Am. Chem. Soc., **82**, 6197 (1960).
382. Fresco J. R., Lesk A. M., Gorn R., Doty P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 3155 (1961).
383. Fresco J. R., Tetrahedron, **13**, 185 (1961).
384. Gellert M., J. Am. Chem. Soc., **83**, 4664 (1961).
385. Rich A., Tinoco I., J. Am. Chem. Soc., **82**, 6409 (1960).
386. Lipsett M. N., Heppel L. A., Bradley D. F., J. Biol. Chem., **236**, 857 (1961).
387. Tener G. M., Khorana H. G., Markham R., Pol E. H., J. Am. Chem. Soc., **80**, 6223 (1958).
388. Khorana H. G., Vizsolyi J. P., J. Am. Chem. Soc., **83**, 675 (1961).
389. Ts'o P. O. P., Helmkamp G. K., Sander C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **48**, 686 (1962).
390. Pereira A. S., Mahler H. R., J. Mol. Biol., **4**, 211 (1962).
391. Eichhorn G. L., Nature, **194**, 474 (1962).
392. Bradbury E. M., Price W. C., Wilkinson G. R., J. Mol. Biol., **4**, 39 (1962).
393. Bradbury E. M., Price W. C., Wilkinson G. R., Zubay G., J. Mol. Biol., **4**, 50 (1962).
394. Zubay G., Wilkins M. H. F., Blout E. R., J. Mol. Biol., **4**, 69 (1962).
395. Thomas C. A., Berns K. I., J. Mol. Biol., **4**, 309 (1962).
396. Stollar D., Grossman L., J. Mol. Biol., **4**, 31 (1962).
397. Beer M., Moudrianakis E. N., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **48**, 409 (1962).
398. Hamaguchi K., Geiduschek E. P., J. Am. Chem. Soc., **84**, 1329 (1962).
399. Gilham P. T., J. Am. Chem. Soc., **84**, 1311 (1962).
400. Cairns J., J. Mol. Biol., **4**, 407 (1962).

401. Ralph R. K., Connors W. J., Khorana H. G., J. Am. Chem. Soc., **84**, 2265 (1962).
402. Herskovits T. T., Arch. Biochem. Biophys., **97**, 474 (1962).
403. Spencer M., Fuller W., Wilkins M. H. F., Brown G. L., Nature, **194**, 1014 (1962).
404. Haselkorn R., J. Mol. Biol., **4**, 357 (1962).
405. Miles H. T., Nature, **195**, 459 (1962).
406. Kyogoku Y., Shimanouchi T., Tsuboi M., Watanabe I., Nature, **195**, 460 (1962).
407. Depireux J., Williams D., Nature, **195**, 699 (1962).
408. Murray K., Peacocke A. R., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 935 (1962).
409. Bayley P. M., Preston B. N., Peacocke A. R., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 943 (1962).
410. Radding C. M., Josse J., Kornberg A., J. Biol. Chem., **237**, 2869 (1962).
411. Bendet I., Schachter E., Lauffer M. A., J. Mol. Biol., **5**, 76 (1962).
412. Krieg D. R., частное сообщение.
413. Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol., **5**, 109 (1962).
414. Schilkrut C. L., Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol., **4**, 430 (1962).
415. Crespi H. L., Katz J. J., J. Mol. Biol., **4**, 65 (1962).
416. Mahler H. R., Mehrotra B. D., Biochim. et Biophys. Acta, **55**, 789 (1962).
417. Singer M. F., Heppel L. A., Rushizky G. W., Sober H. A., Biochim. et Biophys. Acta, **61**, 474 (1962).
418. de Voe H., Tinoco I., J. Mol. Biol., **4**, 500, 518 (1962).
419. Bolton H. C., Weiss J., Nature, **195**, 666 (1962).
420. Luzzati V., Witz J., Timasheff S. N., Strasbourg Meeting on RNA and Polyphosphates, July 1961.
421. Littauer U. Z., Daniel V., Strasbourg Meeting on RNA and Polyphosphates, July 1961.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Аденилацетат 200, 225
 Аденилпантиотеноат 226
 Аденилсульфат 223, 224, 333 и сл.
 синтез 245, 250, 271
 Адениловая кислота
 окисление 48
 1-метил-, N₁ — N₆-миграция метильной группы 47
 Аденилантиарная кислота 147
 Аденин
 9-β-D-арабинофуранозил-
 — 2'-азидо-3'-этилтио- 105
 — 3'-азидо-2'-этилтио- 105
 — синтез 103, 104
 — 3'-хлор-2',3'-дидезокси-2'-этил-
 тио- 105
 — 9-β-D-глюкопиранозил-
 — синтез 71
 — фосфаты 171
 — фосфорилирование 171
 — 4',6'-циклофосфат 171
 9-β-D-ксилофуранозил-
 — N,N-добензоил-3'-метан-
 сульфо-5'-третил- 104
 — 3',5'-изопропилиден- 103
 — 2'-метансульфо- 103
 — 3'-этилтио-3'-дезокси- 105
 9-β-D-лихсофуранозил-
 — 2',3'-ангидро- 103
 — щелочной гидролиз 39
 9-D-маннопиранозил- 18
 9-β-рибитил- 91
 3'-рибофуранозил- 82
 9-β-D-рибофуранозил-
 — 2',3'-ангидро- 105
 Аденилтиометилпентозид
 кислотный гидролиз 63
 миграция тиометильной группы 64
 Аденозин
 алкил(или арил)диметиламидо-
 фосфонат 171
 N⁶-аминоацильные производные
 44
 5'-ацетил- 105, 129
 2-бутнламино- 74
 действие окиси этилена 48
 2',3'-диацетил- 259
 3',5'-диацетил- 130
 — фосфорилирование 147
 2',3'-изопропилиден- 140, 141
 5-метилтио- 65
 2'(3')-л-нитробензолсульфо- 105
 окисление 48
 N¹-окись 48
 — комплексы с металлами 53, 54
 N¹-(2-оксиптил)- 48
 синтез 72, 74, 82—84, 108
 синтез α- и β-аномеров 145
 сульфирование 171
 2',3',5'-трисульфо- 171
 2-фтор- 74
 Аденозин-2'(3'),5'-дифосфат
 гидролиз 152
 разделение изомеров 152
 синтез 152, 153
 Аденозин-2',5'-дифосфат 137, 175
 Аденозин-3',5'-дифосфат
 выделение 137
 определение строения 175
 синтез 154
 Аденозин-5'-дифосфат (АДФ)
 аминоацилгидриды 231
 синтез 188, 235, 239, 256, 258, 261, 262, 271, 281, 283
 трибензиловый эфир 235
 3'-фосфат, синтез 275
 2',3'-циклофосфат, синтез 274
 АДФ-глюкоза, синтез 269
 АДФ-сульфат, синтез 245
 АДФ-сульфорилаза 223
 АДФ-фенол, синтез 269
 АДФ-холин, синтез 250
 Аденозин-5'-карбоновая кислота 63
 Аденозин-3',5'-пирофосфат 224
 Аденозин-5'-полифосфат 263
 синтез 281
 Аденозин-5'-сульфат 171
 Аденозин-5'-тетрафосфат, синтез 188, 262

- Аденозин-2',3',5'-трифосфат 152
 Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) 134, 187 и сл., 200, 212, 223, 225, 226, 233
 биосинтез 312
 внутримолекулярное фосфорилирование 190, 332
 гидролиз 188, 190 и сл.
 дезаминирование 188
 конформация 189
 комплексы с металлами 189 и сл.
 обработка окисью этилена 286
 N¹-оксизтильные производные 48
 синтез 235, 256, 258, 261
 спектры ЯМР 191
 структура 188
 фосфорилиз 190
 Аденозин-2'-фосфат, синтез 129, 147
 Аденозин-2'(3')-фосфат 128
 бензиловый эфир, гидролиз 374
 рК аминогруппы 130
 разделение изомеров 127
 5'-фосфат, бензиловый эфир 153
 Аденозин-3'-фосфат 123
 бензиловый эфир, ферментативный гидролиз 178
 5'-пирофосфат, синтез 275
 рентгеноструктурный анализ 131
 Аденозин-5'-фосфат
 бензиловый эфир 141, 235
 биосинтез 302
 дибензиловый эфир 141
 2,4-динитрофениловый эфир, синтез 269
 2',3'-изопронилиден-
 — бензиловый эфир, аминоацил-
 ангидриды 243
 — дибензиловый эфир 141, 234
 — фениловый эфир, синтез 171
 метиловый эфир, синтез 169
 N¹-окись 48
 — гидролиз 48
 рентгеноструктурный анализ 126
 синтез 140, 141, 164
 фениловый эфир, синтез 169
 Аденозин-5'-фосфоамид, синтез 233, 259, 260, 283
 Аденозин-5'-фосфоимидазол, синтез 283
 Аденозин-5'-фосфоморфолид 169
 Аденозин-5'-хлорфосфат
 2',3'-изопронилиден-, бензиловый эфир 241
 фениловый эфир 259
 Аденозин-2',3'-циклофосфат 374
 5'-пирофосфат, синтез 274
 5'-фосфат, бензиловый эфир 153
 5'-фосфат, этилугольный ангидрид 154
 5'-фосфит, бензиловый эфир 152
 5'-фосфоморфолид, синтез 263
 Аденозин-3,5-циклофосфат
 биологическая роль 134
 гидролиз 39, 136
 образование из АТФ 134
 синтез 136
 строение 134 и сл.
 8-Азааденозин 74
 8-Азагуанозин 74
 5'-пирофосфат, синтез 248
 5'-трифосфат, синтез 248
 5'-фосфат, синтез 167
 — эфиры, синтез 160
 8-Азаинозин 74
 8-Азаксантозин 74
 синтез 84
 Азасерин 309
 4-Азатимин
 3-β-D-рибофуранозил-, синтез 78
 4-Азаурацил
 N¹-дифенилметил, синтез 78
 ингибирование обмена пиримидинов 304
 4-Азауридин 78, 108
 2'-дезокс-, синтез 78
 5-дифосфат, синтез 240
 5'-фосфат, синтез 142
 4-Азацитидин 108
 «Активный метионин» 65
 гидролиз 66, 68
 дезаминирование 66
 свойства 68
 синтез 66 и сл.
 «Активный сульфат» 222 и сл., 334
 восстановление 223
 селеновые аналоги 224
 синтез 245, 275
 структура 223
 ферментативные реакции 223, 224
 Алкилбензилфосфиты
 хлорирование 143
 Аминоацилденитаты 226 и сл.
 и активация аминокислот 227
 и биосинтез пептидов 229
 внутримолекулярная этерификация 229
 реакции 229 и сл.
 синтез 252 и сл.
 Аминоацилфосфаты, реакционная способность 339
 Аминонуклеозиды 96, 102
 Амидетин 55

- Аналоги
 нуклеозидов 40, 41, 74, 78, 108
 нуклеотидов 171 и сл., 308
 Ангидрид (см. также Пирофосфаты)
 аденозин-5'-фосфата
 — и 2,3-дифосфоглицериновой кислоты, структура 197
 — и мионовой кислоты, структура 198
 — и пептидов, синтез 252, 279
 бензилфосфористой и дифенилфосфорной кислот 130, 142, 143, 237, 242
 — фосфорилирование спиртов 143
 нуклеозид-5'-фосфатов
 — и диэтилфосфата 277
 — и этилкарбоната 283
 нуклеотидов
 — и этилкарбоната 150
 — и карбоновых кислот 224 и сл.
 — синтез 246
 — реакционная способность 335 и сл.
 Ангустмицин А 55
 Ангустмицин С, см. Псикофурамин
 Апириимидиновые кислоты 439
 Апуриновые кислоты 428 и сл.
 меркаптилирование 435
 щелочной гидролиз 437 и сл.
 Ацетилполифосфорные кислоты 339
 Ацетилфосфат 200
 Ацилденитаты
 свойства 229 и сл.
 синтез 246, 252
 Ацилгидроксамовые кислоты 226, 229
 Ацилфосфаты, реакционная способность 339
 N-Бромсукцинимид 173
 Витамин В₁₂ 63
 щелочной гидролиз 39
 Вицин 60
 Галактовальденаза 202
 Гиалуриновая кислота 205
 Гиперхромный эффект 520 и сл.
 Гипоксантин 126
 Гипохромизм 631
 Гиппуровая кислота, ферментативный синтез 226
 Гликозидная связь в нуклеозидах
 влияние этерификации гидроксильных групп на устойчивость 37
 устойчивость к кислотному гидролизу 37, 39
 Гликозиламинопиримидины, использование в синтезе пуриновых нуклеозидов 82
 Глицерин-3-фосфат, 1,2-изопронилиден- 250
 Глицериновая кислота, 2,3-циклофосфат 215
 Глицерофосфаты 214
 изомеризация 373
 рК фосфатных групп 174
 Глицилрибофуранозиламин 87
 Глюкуроновая кислота, 1-фосфо- 204
 Гуаниловая кислота
 бромирование 48
 облучение электронами 173
 Гуанин
 9-β-D-глюкопиранозил-, N-амино-
 ацильные производные 44
 9-D-рибитил- 91
 Гуанозин
 бромирование 48
 2',3'-изопронилиден- 140, 141
 облучение электронами, 46, 173
 синтез 72—74
 2',3',5'-триацетил- 108
 Гуанозин-2'(3'),5'-дифосфат 153
 Гуанозин-5'-дифосфат (ГДФ) 189
 производные 217 и сл.
 синтез 259, 271
 ГДФ-галактоза 217
 ГДФ-глицероманиогептоза 217
 ГДФ-глюкоза 217
 синтез 260, 269
 ГДФ-6-дезокситалоза 218
 ГДФ-колитоза 217
 ГДФ-манноза 217
 синтез 260, 263
 ферментативные реакции 218
 ГДФ-фруктоза 217
 ГДФ-фуктоза 217, 218
 ГДФ-холин, синтез 250
 Гуанозин-5'-дихлорфосфат 164
 Гуанозин-5'-трифосфат (ГТФ) 189, 200, 217
 Гуанозин-2',3'-фосфат 126, 128
 Гуанозин-5'-фосфат
 биосинтез 303
 2',3'-изопронилиден, ди-n-нитро-
 фениловый эфир 141, 346
 синтез 140, 141, 164, 167
 6-тио-, синтез 167
 Гуанозин-5'-фосфоамид 260
 Гуанозин-5'-фосфоморфолид 263
 Гуанозин-2',3'-циклофосфат 153

Дегензилирование 141, 152, 235, 241, 243, 282
 Дезаминизация аденозин-5'-фосфата 125
 2'-Дезоксиаденозин
 3'-ацетил-, фосфорилирование 158
 5'-ацетил- 158
 ацетилирование 158
 3',5'-диацетил- 158
 синтез 82, 104, 105
 спектры ЯМР 105
 5-третил- 158
 3'-фосфат, синтез 158
 5'-фосфат
 — бензильный эфир, синтез 158
 — синтез 158
 2'-Дезоксиаденозинфосфиты 169
 3'-Дезоксиаденозин 105
 3'-амино- 74
 3-гомоцитруллин-амино- 54
 спектры ЯМР 105
 5'-Дезоксиаденозин 63
 S-гомоцитрин, 5'-производное 68
 5'-диметилсульфоний, щелочной гидролиз 39
 2'-Дезоксигуанозин
 ацетилирование 158
 3',5'-диацетил- 158
 2'-Дезоксигуанозинфосфаты, синтез 158
 5-Дезоксиинозин, 5'-диметилсульфоний, щелочной гидролиз 39
 5-Дезоксирибозо-5-фосфонат, диэтиловый эфир 171
 Дезоксирибонуклеазы
 бактериальные 422
 панкреатическая 421
 Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) 415 и сл.
 алкилирование 441
 выделение 415 и сл.
 вязкость 568
 гидразинолиз 439
 гидролиз
 — кислотный 125, 429
 — ферментативный до нуклеозидов 12
 действие формальдегида 607
 денатурация 571, 602
 дихроизм 569
 ИК-спектры 556
 комплексы 447 и сл.
 — с аминами 449
 — с белками 447—449
 — с металлами 450
 макромолекулярная структура 553
 минорные нуклеотиды 442

молекулярный вес 558
 нуклеотидная последовательность 427 и сл.
 обработка гидроксиламином 440
 одноцепочечная 599
 оптическое вращение 582
 противоионная активность 583
 распределение пуриновых нуклеотидов 439
 растворы в органических растворителях 595
 реакция с формальдегидом 440
 ренатурация 602
 рентгеноструктурный анализ 555, 556
 состав оснований 442 и сл.
 строение 418 и сл.
 тепловая денатурация 571
 Т-фагов 203, 443, 444
 УФ-спектры 584
 — влияние pH 592
 — — солей 586
 — — температуры 584
 фракционирование 417 и сл.
 электрометрическое титрование 562
 ДНК-полимеразы 322
 Дезоксирибонуклеозид-3'-фосфаты
 выделение из гидролизатов ДНК 125
 синтез 156
 установление строения 131
 эфиры, гидролиз 179
 Дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфаты, выделение 125
 Дезоксирибонуклеозид-5'-полифосфаты 189
 Дезоксирибонуклеозид-5'-фосфаты
 выделение 123
 синтез 156
 Дезоксирибонуклеозид-3',5'-циклофосфаты, щелочной гидролиз 136
 Дезоксирибонуклеозиды
 восстановление 37
 галсгенпроизводные 37
 гидролиз до дезоксирибозы 17
 синтез 37, 79 и сл., 99
 3'-Дезоксирибонуклеозиды 104
 5'-Дезоксирибонуклеозиды, пиримидиновые
 5'-фторпроизводные, синтез 78
 Дезоксирибонуклеопротенды 447, 448
 Дезоксирибонуклеотиды, эфиры
 кислотный гидролиз 429

2'-Дезоксиуридилловая кислота, 4,5-дигидро- 41
 2'-Дезоксиуридин 15
 5'-ацетил-2'-иод- 99
 2'-галоген- 100
 5-галоген- 81, 108, 111
 5-оксиметил- 110
 синтез 99
 2'-Дезоксиуридин-5'-дифосфат (дезоксид-УДФ), биосинтез 309
 2'-Дезоксиуридин-5'-фосфат (дезоксид-УМФ)
 биосинтез 306, 309
 синтез 142
 5-фтор-, синтез 165
 3'-Дезоксиуридин 34
 5'-Дезоксиуридин 37
 5'-диметилсульфоний, щелочной гидролиз 39
 2',3'-изопропилиден-5'-иод- 171, 281
 — фосфорилирование 143
 5'-Дезоксиуридин-5'-фосфонат
 диэтиловый эфир, синтез 171
 6-Дезоксиуридин 78
 фосфаты 171
 2'-Дезоксицитидин
 N-ацетилирование 44
 N⁶,3'-диацетил- 156
 5-метил- 108
 5-фтор- 81
 2'-Дезоксицитидин-3',5'-дифосфат 138, 152
 5-метил- 138
 Дезокси-ЦДФ-глюкоза, синтез 269
 2'-Дезоксицитидин-5'-дифосфат (дезоксид-ЦДФ), синтез 259
 Дезокси-ЦДФ-холин, синтез 189, 218
 Дезокси-ЦДФ-этаноламин, синтез 218
 2'-Дезоксицитидин-5'-трифосфат (дезоксид-ЦТФ), синтез 259
 2'-Дезоксицитидин-3'-фосфат
 синтез 156
 спектры оптического вращения 131
 2'-Дезоксицитидин-5'-фосфат
 биосинтез 309
 5-оксиметил-, биосинтез 306
 синтез 156
 спектры оптического вращения 131
 Диазоуридин 41
 Диальдегиды нуклеозидов, восстановление 48, 49
 Лигидронуклеозиды 41
 2',3'-Дидезоксиаденозин, 2'- и 3'-амино- 105

Диморфолдифосфобромид 163
 Динуклеозидфосфаты
 гидролиз РНК-азой 381
 гипохромный эффект 468, 523
 синтез 376, 467, 473, 474, 477, 484, 485, 489, 498
 Динуклеозидфосфиты 473
 Диоксиацетон, фосфат 204
 Р₁, Р₂-Дитимидин-5'-трифосфат, синтез 284
 Дитиминртуть 78, 96
 Енолфосфаты, фосфорилирующая способность 340 и сл.
 Изогуанин 59
 Изогуанозин, синтез 74
 Изокофермент А 275
 Изотидин 32
 N-бутил-, 33
 N,N-диэтил- 33
 кислотный гидролиз 39
 Имидазол
 аденилил-5'-, синтез 283
 1-β-D-рибофуранозил-, производные 39, 86, 111, 112
 N-фосфо-, применение для фосфорилирования 258
 Инозин 17
 N¹-бензил- 111
 — щелочной гидролиз 111
 2,3'-изопропилиден- 140
 синтез 86, 89
 N¹-тозил- 111
 — щелочной гидролиз 47
 2',3',5'-триацетил- 108, 111
 2',3',5'-трибензоил- 108
 Инозиновая кислота 123
 кислотный гидролиз 125
 Инозин-2',3',5'-трифосфат 152
 Инозин-5'-трифосфат (ИТФ) 188
 Инозин-2',3'-фосфат, гидролиз 126
 Инозин-5'-фосфат 125
 биосинтез 300—302
 2',3'-изопропилиден-, ди-n-нитрофениловый эфир 112
 синтез 140
 6-тио-, синтез 167
 Инозитмонофосфатид 213
 Карбонимиды
 ди-n-толил- 141, 253

- дициклогексил, применение в синтезе нуклеозиддифосфатов 150
 — — — полинуклеотидов 477
 Карбонилдимидазол 283
 Кинетин 69
 Кинетиннуклеозид 70
 Коломиновая кислота 210
 Кордицепин 54
 Кофермент А 198 и сл.
 «активный ацетат» 200
 S-ацилирование 225 и сл.
 биосинтез 200
 гидролиз 198
 3'-дефосфо-, синтез 263, 269
 синтез 263, 273
 структура 198
 S-фосфорилирование 200
 Кофермент I, см. Никотинамид-аденидинуклеотид
 Кофермент II, см. Никотинамид-аденидинуклеотидфосфат
 Кофермент III 195
 Кротонозид 59
 Ксантиловая кислота 126
 Ксантозин 17
 облучение электронами 46
 синтез 84
 Ксантозин-5'-фосфат 303
 Ксилофуранозилнуклеозиды, синтез через O²,3'-циклонуклеозиды 97
- Левулиновая кислота 17
 Лецитин 212, 220
 Люмифлавин 197
 Люцифериладенилаты, синтез 252
- Маннопиранозиладенин 18
 Метафосфат 169, 344
 алкил (арил), синтез 165, 167
 Минорные нуклеотиды 14, 15, 21, 408, 442
 Мионовая кислота 198
 «Мономерный метафосфит» 169
 Мочевая кислота, рибозид 60
 Мукополисахариды, ферментативный синтез 222
 Мурамовая кислота 211
 N-ацетил- 208
- Небуларин 54, 55, 108
 6-метил- 45
 щелочной гидролиз 45
 Небуларин-5'-фосфат 46
- Нейраминовая кислота
 N-ацетил- (сиалиновая кислота) 210
 пептидные производные 210 и сл.
- Никотинамид
 гликозильные производные 194
 иодметилат 194
- Никотинамидаденидинуклеотид (НАД) 193 и сл.
 гидрирование 193
 гидролиз 193
 гипохромный эффект 196
 дезаминирование 193
 комплексы с металлами 190
 конформация 196
 N¹-оксизитильные производные синтез 248
 — ферментативный 194
 структура 193
 ферментативные реакции 195
- Никотинамидаденидинуклеотид-фосфат (НАДФ) 193, 220
 синтез 242
 структура 195
- Нуклеиновые кислоты
 биосинтез 314 и сл.
 конформация в нуклеопротеидах 627 и сл.
 физико-химические свойства 552 и сл.
 химия 363 и сл.
- Нуклеозиддифосфоаминосахара 205 и сл.
- Нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфаты 137 и сл.
 синтез 152 и сл.
- Нуклеозид-5'-дифосфаты, синтез 240, 248, 260
- Нуклеозиддифосфосахара 203
- Нуклеозид-5'-карбоновые кислоты 49
- Нуклеозид-5'-полифосфаты 187 и сл.
 биосинтез 312, 314
 комплексы с металлами 189 и сл.
 синтез 248
- Нуклеозид-5'-трифосфаты
 гидролиз гидроокисью бария 150
 синтез 248, 261, 279
- Нуклеозид-2',3'-фосфаты 126
 взаимопревращение изомеров 127, 128
 разделение изомеров 127
 ИК-спектры 131
 УФ-спектры 130, 131
 установление строения 128
 ферментативное дефосфорилирование 128

- Нуклеозид-5'-фосфаты 125
 ангидриды
 — с трифторуксусной кислотой 244
 — с этилугольной кислотой 150
 боратные комплексы 126
 идентификация 125
 ионообменная хроматография 126
 комплексы с металлами 189
 синтез Р³²-меченных 169
 ферментативный синтез 145 и сл.
 эфиры, гидролиз 179, 180
- Нуклеозидфосфиты
 бензиловые эфиры, синтез 238, 471
 окисление в фосфаты 168, 238
 синтез 168
- Нуклеозид-5'-фосфоамиды синтез 243, 260, 277, 278
- Нуклеозид-5'-фосфоимидазолы, синтез 260
- Нуклеозид-5'-фосфоморфолиды, синтез 260, 261
- Нуклеозид-5'-фосфопиперидиды 279
- Нуклеозид-2',3'-фосфорилмочевина 150
- Нуклеозидхлорфосфаты 242, 243
- Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты 128, 133 и сл.
 алкогольиз 160
 гидролиз рибонуклеазой 133
 дифенилфосфорный ангидрид 163
 строение 133
 5'-фосфат, этилугольный ангидрид 154, 155
- Нуклеозид-3',5'-циклофосфат 133 и сл.
 устойчивость гликозидной связи 136
 синтез 150 и сл.
- Нуклеозиды 14 и сл.
 6-алкиламино- 108
 О-алкилиденные производные 36, 145
 алкилирование 48
 аминоацилирование 35, 44
 аналоги 40, 41, 74, 78, 108
 2',3'-ангидро- 95 и сл., 102 и сл.
 — фосфорилирование 148
 β-аномеры, синтез 96
 арабинофуранозил-, синтез через циклонуклеозиды 97
 О-ацилирование 35
 2',3'-бензилиден- 145
 бензонлирование 104
 внутримолекулярные водородные связи 51, 52
- восстановление 41, 109
 галогенирование 39 и сл., 108
 6-гидразино- 108
 6-гидроксиламино- 108
 2',3'-диацетил- 145
 2',3'-изопропилиден- 36, 145
 — фосфорилирование 141 и сл., 160
 2',3'-карбонил- 145
 кислотный гидролиз 37
 комплексы с металлами 53
 конформация рибозы 53
 метилирование 44
 нитрование 41
 окисление 49 и сл.
 5-оксиметил- 110
 — восстановление 41
 присоединение по 4,5-двойной связи 41
 расщепление пиримидинового кольца 44
 реакция с изоцианатами 44
 синтез 71 и сл., 74, 76 и сл., 82 и сл., 84, 87 и сл., 90, 91 и сл., 111
 спектры ЯМР 52
 ИК-спектры 52
 УФ-спектры 51
 сульфопроизводные 36, 104
 таутомерия оснований 52
 тетрагидропирана 82
 тетрагидрофурана 82
 6-тио- 108
 тозилрование 36
 — влияние гетероциклического основания 37
 тозильные производные, циклизация в циклонуклеозиды 29, 30
 тритилирование 36, 104
 5'-третил-, фосфорилирование 147
 устойчивость О-ацильных групп в ацилпроизводных 35
 формильные производные 46, 47
 фосфорилирование 141 и сл., 147, 148, 160
 — влияние гетероциклического основания 37
 фотолиз пиримидиновых производных 44
 2-фторпроизводные 74
 щелочной гидролиз 39, 45
 — устойчивость гликозидной связи 39
 2',3'-эпоксидные производные 95, и сл., 102 и сл.

Нуклеопротенды, конформация нуклеиновых кислот 628
 Нуклеотидангидриды 187 и сл.
 биосинтез 312 и сл.
 реакции 323 и сл.
 производные дезоксинуклеотидов 218 и сл.
 — гуанозин-5'-дифосфата 217 и сл.
 синтез 234 и сл.
 — с помощью хлорангидридов 234 и сл.
 — — карбодимидов и родственных реагентов 247 и сл.
 — — фосфоамидов 258 и сл.
 — — анионообменных реакций 265 и сл.
 Нуклеотидпептиды 231 и сл.
 биологическая роль 234
 Нуклеотиды 123 и сл.
 алкилирование 48
 аминоацилангидриды
 — реакционная способность 337
 — синтез 252 и сл., 272, 279
 аминоацилирование 35
 аминокислотные производные фосфоамидного типа, синтез 278
 аналоги 171 и сл., 308
 ацилангидриды 224 и сл.
 — синтез 246, 252, 272
 биосинтез 300 и сл.
 внутримолекулярные водородные связи 173, 174
 восстановление 173
 выделение 123
 галогенирование ядра 173
 действие облучения
 — рентгеновскими лучами 173
 — УФ-светом 173
 — электронами 173
 дефосфорилирование 175
 изомеры «а» и «б» 127 и сл.
 — идентификация 129 и сл.
 ионообменная хроматография 175
 катаболизм 361 и сл.
 комплексы с металлами 189
 константы диссоциации фосфатных групп 174
 контроль биосинтеза 310
 конформация рибозы 53
 обработка диазометанами 160
 N-окиси 173
 периодатное окисление 126
 реакция с формальдегидом 110
 свойства 172 и сл.
 синтез 139 и сл.
 спектры ЯМР 52, 53

ИК-спектры 52
 тетрагидропиранильные производные 487, 489
 триалкиламмониевые соли 240, 248, 269, 281
 устойчивость гликозидной связи 126, 174
 фосфорилирование 153
 этилугольные ангидриды 273
 эфиры, свойства 175
 — синтез 160 и сл.
 Нуклеоидин 55

Окислительное фосфорилирование
 модельные системы 281
 Оксамицин 209
 Олигонуклеотидпептиды 231 и сл.
 Олигонуклеотиды
 ацетилирование 500
 взаимодействие с красителями 528
 гидролиз 421 и сл., 431
 гиперхромный эффект 520
 гипохромизм 631
 облучение УФ-светом 536
 образование комплементарных водородных связей 533
 пептидные производные 231 и сл.
 периодатное окисление 397 и сл.
 рК оснований 532
 5'-пирофосфо-, синтез 275, 504
 синтез 467 и сл.
 структура 395 и сл., 424 и сл.
 физические свойства 519 и сл.
 циклические производные 478
 Оротидин 60
 Оротидин-5'-фосфат 145
 биосинтез 304
 Оротовая кислота, 5-фтор- 146

Пептидные производные
 аденозин-5'-фосфата, синтез 252, 279
 нейраминной кислоты 210 и сл.
 нуклеотидов 231 и сл.
 — биологическая роль 234
 олигонуклеотидов 231 и сл.
 Периодатное окисление 19
 нуклеотидов 126
 олигонуклеотидов 397 и сл.
 Пиримидины
 N³-гликозил-, синтез 78
 глицилтриазол-, синтез 91
 3-D- глюкопиранозил-, синтез 72

2,6-диметоксн-5-литий-, применение в синтезе нуклеозидов 22
 2,6-диэтокси-, применение в синтезе нуклеозидов 72
 обмен, ингибиторы 309 и сл.
 3-β-D-рибофуранозил-, синтез 78
 1- и 2-β-D-рибофуранозилпирозол-, синтез 75
 6-этиоксн-2-окси-, применение в синтезе цитозинового нуклеозидов 78
 Пирофосфатаза 199, 202, 204, 206, 478
 Пирофосфатный синтез, с использованием
 диимидазолилфосфиновой кислоты, эфиров 283
 имидазолилфосфиновой кислоты, диэфиров 283
 имидоилфосфатов 254
 карбамоилфосфатов 282
 карбодимидов 247 и сл.
 кетениминов 255
 нуклеозид-5'-дифенилпирофосфатов 265 и сл., 329 и сл.
 нуклеозид-5'-фосфоамидов 259 и сл.
 нуклеозид-5-фосфоморфолидов 261 и сл.
 трихлорацетонитрила 257
 цианамидов 256
 циануровой кислоты, хлорангида 257
 Пирофосфаты
 P¹-аденозил-5'-P²-глицерин-, синтез 269
 P¹-аденозин-5'-P²-кобинамид-, синтез 263
 P¹-аденозин-5'-P²-стероид-, синтез 263, 279
 P¹-аденозин-5'-P²-уридин-5'-, синтез 243, 256, 269
 — аденозин-5'-фосфата и 2,3-дифосфоглицериновой кислоты, синтез 269
 P¹-аденозин-(2',3'-циклофосфат)-5'-P²-дифенил-, синтез 274
 P¹-гуанозин-5'-P²-кобинамид-, синтез 263
 P¹,P²-диаденозин-5'-, 246, 269, 277
 P¹,P²-диалкил- (или арил-) 165, 167
 ди-*n*-нитрофенил- 141
 P¹,P²-динуклеозид-5'- 151, 152, 244, 283
 P¹,P²-диуридин-5'- 248, 255, 265
 P¹,P²-дифенил- 248

диэфиры, фосфорилирующая способность 331, 332
 P¹-нуклеозид-5'-P²-диалкил(арил), реакционная способность 276, 277
 P¹-нуклеозид-5'-P²-дифенил-
 — применение в пирофосфатном синтезе 265 и сл., 329 и сл.
 — синтез 265, 269
 тетрабензил- 248
 — сольволиз 347
 тетра-*n*-нитрофенил- 141
 тетрафенил- 265, 329
 тетрахлор- 164
 тетраэфиры, фосфорилирующая способность 239, 243, 265, 281, 326, 328, 468
 трибензил- 281
 триэфиры 331 и сл.
 — устойчивость 239
 — фосфорилирующая способность 265
 эфиры, фосфорилирующая способность 326 и сл., 328 и сл., 331 и сл.
 Полигалактуронозная кислота 205
 Полинуклеотиды
 аналоги, синтез 505 и сл.
 биосинтез 300 и сл., 318
 взаимодействие между полинуклеотидными цепями 539
 взаимодействие с красителями 539
 гетерополимеры, физические свойства 551
 гидролиз 501 и сл.
 гиперхромизм 547
 гипохромизм 631
 ИК-спектры 545
 синтез 467 и сл.
 ступенчатый гидролиз 50
 ферментативный синтез 315 и сл., 321
 фосфорилирование 316
 Полирибонуклеотидфосфорилаза 315 и сл.
 Полифосфорная кислота 97, 143, 154
 Псевдоуридиловая кислота 125, 411
 Псевдоуридин 111
 биосинтез 311 и сл.
 Псевдоцитидин, 2',3'-изопропилиден- 33
 Психофуранин 39, 55
 Психозин 203
 Пурины
 9-D-аллофуранозил-, 6'-дизокси-, синтез 73

- Пурины
 9-β-D-арабинофуранозил-
 — 6-амино-2'-дезоксиг-2'-этилтио- 105
 — 6-амино-3'-хлор-2',3'-дидезоксиг-2'-этилтио- 105
 — 6-диметиламино-3'-амино-3'-дезоксиг- 102
 9-глюкозил-, 2'-дезоксиг- 73
 9-D-глюкофуранозил- 73
 — — 6'-дезоксиг- 73
 9-дигитоксозил- 73
 9-L-идофуранозил-, 6'-дезоксиг- 73
 9-β-D-ксилофуранозил-, 2-метилтио-6-диметиламино- 102
 9-лактозил- 73
 9-мальтозил- 73
 обмен, ингибиторы 309 и сл.
 9-(2-оксиметилтетрагидро-6-пиранил)-, синтез 82
 9-L-рамнопиранозил- 73
 9-L-рамнофуранозил- 73
 9-D-рибофуранозил- 73
 9-β-D-рибофуранозил-
 — 2-амино- 108
 — 3'-амино-2',3'-дидезоксиг- 105
 — 2-амино-6-меркапто-2',3'-изопропилиден-, фосфорилирование 142
 — 6-амино-2-метилтио-5'-дезоксиг-диэтилфосфонат- 171
 — 5'-дезоксиг- 73
 — 5'-дезоксиг-5'-фтор- 73
 — 1,6-диметиламино-, фосфаты 171
 — 6-диметиламино-3'-ацетамидо-3'-дезоксиг- 102
 — 6-диметиламино-, 5'-фосфат 143
 — 2',3'-изопропилиден- 141
 — 2',3'-изопропилиден-5'-фосфат 174
 — — дибензильный эфир 174
 — 6-меркапто-, 5'-фосфат 146
 — — эфиры 160
 — 6-меркапто-2',3'-изопропилиден-, фосфорилирование 142
 — 6-метиламино-, фосфаты 171
 — 6-хлор-2',3'-изопропилиден-, фосфорилирование 142
 6-сукциниламино-, гидролиз 53
 9-(тетрагидро-2-пиранил)-, синтез 82
 9-(тетрагидро-2-фурил)-, синтез 82
 хлормеркурпроизводные, применение в синтезе нуклеозидов 73, 104
- Пурамицин 57, 145
 Рибобензимидазол 16
 Рибозиламины, применение в синтезе нуклеозидов 87
 Рибозилимидазол 111
 производные 89
 Рибозилтеофиллин 17
 Рибоновая кислота 16
 5'-фосфат 125
 Рибонуклеазы
 бактериальные 395
 панкреатическая 377 и сл., 379 и сл., 391
 — гидролиз эфиров нуклеотидов 177
 растительные 395
 T1 и T2 из такадиастазы 154, 275, 393 и сл.
 Рибонуклеиновые кислоты (РНК) 364 и сл.
 аминоксилангидриды 230
 вируса табачной мозаики, вторичная структура 609
 вторичная структура 609, 617, 620, 626
 выделение 364
 гидразинолиз 402
 гидролиз 123, 126, 400 и сл.
 — до нуклеозид-3',5'-дифосфатов 137
 — до нуклеозидов 12
 — до нуклеозидциклофосфатов 133
 — щелочной 123, 126
 дезаминирование 402
 действие формальдегида 402
 информационные, фракционирование 370
 комплексы 412 и сл.
 конформация в нуклеопротендах 628
 концевой анализ 390 и сл.
 микросомальные, вторичная структура 617
 минорные нуклеотиды 408 и сл.
 молекулярный вес 379
 нуклеотидная последовательность 386 и сл.
 обработка водорастворимыми карбонидными 403
 обработка гидроксиламином 403
 состав оснований 404 и сл.
 строение 371 и сл.
 транспортные
 — вторичная структура 620
 — дезаминирование 228
 — концевые нуклеотиды 317

- минорные нуклеотиды 411
 транспортные, последовательность нуклеотидов 395
 — специфичность 228
 — фракционирование 366 и сл.
 фракционирование 365
 электрометрическое титрование 557
 РНК-полимеразы 318 и сл.
 Рибонуклеозид-2',3'-фосфаты
 выделение 123
 миграция фосфата 176
 синтез 147 и сл.
 эфиры, гидролиз 176 сл., 374
 Рибонуклеозид-5'-фосфаты
 выделение 123
 синтез 139 и сл.
 Рибонуклеозид-2',3'-циклофосфаты, синтез 148 и сл.
 Рибонуклеозид-3',5'-циклофосфаты
 синтез 150 и сл.
 щелочной гидролиз 136
 Рибонуклеопротеиды 413
 Рибонуклеотиды, гидролиз 175
 Рибофлавин 150
 5'-фосфат 150, 197, 241
 — ацетилирование 246
 — синтез 163, 165
 Рибофлавин-5'-фосфит, синтез 163
 Рибофлавин-4',5'-циклофосфат 150, 197, 241
 Рибофуранозилазиды, применение в синтезе нуклеозидов 87
 Рибофуранозилгалогениды, применение в синтезе нуклеозидов 3',5'-диацетил-2'-дезоксиг- 81
 3,5-ди-*n*-метил(или нитро-, или хлор-) бензоил-2-дезоксиг- 79, 80
 2,3,5-триацил- 73, 84
 Рутин 220
- Сналиновая кислота 211
 Спонгозин 62
 Спонготимидин 61, 91
 Спонгоуридин 61, 91, 97, 99
 Сукциниладенозин 62, 76
 Сукциниладенозин-5'-сульфофосфат, аминокислотные производные 224
 Сукциниламиномидазолкарбоксамидрибонуклеотид 89
 Сфингозин 203
 N-ацетил- 212
 галактозил- 203
 Сфингомиелин 212
- Тейхоевые кислоты 211, 215
 Теобромин 71
 Теофиллин 71
 глюкозил-, фосфорилирование 139, 148
 — 4',6'-циклофосфат 148
 7-β-D-глюкопиранозил-, фосфаты 143, 148
 7-β-D-рилофуранозил-, 5'-фосфат 143
 Тимидин 110, 111
 3'-ацетил- 156
 5'-ацетил- 99
 3'-ацетил-5'-иод-5'-дезоксиг- 158
 3'-ацетил-5'-тритил- 156
 восстановление 17
 3'-дезоксиг- 37
 3',5'-дibenзоил- 108
 3',5'-дibром-3',5'-дидезоксиг- 37
 3',5'-дидезоксиг- 37
 синтез 78, 90, 99, 100
 6-тио- 109
 3'-тозил- и 5'-тозил- 28
 5'-тритил- 156, 163, 167
 гидрирование 138
 4,5-дигидро- 138
 строение 138
 Тимидин-5'-дифосфат (ТДФ) 189
 производные 220 и сл.
 синтез 239, 240, 271
 ТДФ-N-ацетилглюкозамин 222
 ТДФ-галактоза 222
 ТДФ-глюкоза 220
 синтез 269
 ферментативное превращение в ТДФ-рамнозу 220
 ТДФ-глюкозамин, ферментативный синтез 222
 ТДФ-4-кето-6-дезоксиглюкоза
 восстановление 220
 гидролиз 222
 ТДФ-манноза
 биохимическая роль 220
 синтез 222
 структура 222
 ТДФ-рамноза 218, 222
 биохимическая роль 220
 ТДФ-рибоза 220
 Тимидин-5'-трифосфат (ТТФ) 220, 222
 синтез 240
 Тимидин-3'-фосфат
 бензильный эфир, синтез 156
n-нитрофениловый эфир 163
 — щелочной гидролиз 179
 синтез 156, 163, 167

- Тимидин-5'-фосфат
бензиловый эфир 156
рентгеноструктурный анализ 126
синтез 156, 158, 167
- Тимидинфосфиты 168
- Тимидин-5'-фосфоамид 222
- Тимидин-3',5'-циклофосфат
гидролиз 136
синтез 152
УФ-спектр 136
- Тимин, 3-β-D-лихсофуранозил-, синтез 91
- Тиогруппы, удаление 100, 105, 109
- Тионуклеозиды 108
- Тозильные группы, удаление 129
- Тойокамицин 56
- Трансфосфорилирование, внутри-молекулярное 342
- Триакантин 82
- Тригонеллин 194
- Триптофан, аналоги 228
- Тритильные группы, удаление гидро-генолизом 158
- Трифторуксусный ангидрид, приме-нение в пирофосфатном синтезе 245, 246
- Урацил
3-β-D-арабинофуранозил- (см. так-же Спонгоуридин) 95, 97, 131
— 3'-амино-3'-дезокси-, синтез 96
— 5-фтор-, синтез 91
3-D-гликозил-, 5-циан-, синтез 87
3-β-D-ксилофуранозил- 91, 95, 97
2',3',5'-трибензоил- 95
3-β-D-лихсофуранозил- 92, 95
5-морфолинометил- 110
5-рибитил- 23
3-β-D-рибоновая кислота, 5-нит-ро- 41
5-фтор-, монотуртное производное, применение в синтезе нукле-озидов 96
- β-Уреидопропионовая кислота
N-рибозилфосфат 131
N-фосфорибозид 41
- Уридилсульфат, синтез 271
- Уридиловая кислота
4,5-дигидро- 41
— щелочной гидролиз 41
- Уридин 95
5-амино- 41
5'-ацетил- 99
2',3'-бензилиден-, фосфорилирова-ние 143
- 5-галогено- 18, 39, 40, 108
3',5'-диацетил-
— доказательство структуры 131
— фосфорилирование 147
2',3'-дibenзил- 242
N¹-2'-диметил- 44
2',5'-дитритил- 97
3',5'-дитритил- 97
4,5-дифенилгидразино- 18
2',3'-изопропилиден-, фосфорили-рование 139, 141, 143
3'-метансульфо- 97
5-метил- 110
N¹-метил-2',3'-изопропилиден-, фосфорилирование 163
5-метил-2-тио- 87
5-морфолино- 41
5-нитро- 18, 41
5-оксиметил- 110
синтез 72, 78, 87
2-тио-, синтез 87
5-тио-2',3'-изопропилиден- 43
6-тио- 109
2'-тозил- 28, 99
3'-тозил- 28
2',3',5'-три-O-(3,5-динитробензо-ил)-, устойчивость гликозидной связи 37
2',3',5'-три-O-метансульфо-, приме-нение в синтезе урациловых нук-леозидов 92, 94 и сл.
2',5'-дитритил-3'-метансульфо- 97
5'-тритил- 126, 242
— фосфорилирование 126, 128
тритилирование 97
5'-тритил-5-метил-2-тио- 100
- Уридин-3',5'-дифосфат 155
- Уридин-5'-дифосфат (УДФ) 189
5-галоген-, синтез 271
N¹-метил, синтез 240
пептидные производные 207 и сл.
производные 200 и сл.
синтез 238, 239, 255, 281
3'-фосфат, синтез 275
2',3'-циклофосфат, синтез 240
- УДФ-β-L-арабиноза 204
- УДФ-N-ацетилгалактозамин 205, 207
-4-сульфат 206
- УДФ-N-ацетилглюкозамин 205 и сл.
биохимическая роль 205
пептидные производные 208
-пировиноградная кислота 209
структура 205
ферментативный синтез 207
-6-фосфат 205

- 6-фосфо-1-β-D-галактоза, гид-ролиз 206
химический синтез 263
- УДФ-N-ацетилгалактозамин 211
-фукозид 211
- УДФ-N-ацетилмурамовая кислота 207 и сл.
пептидные производные 209
структура 208, 209
- УДФ-галактоза 202 и сл.
синтез 243, 263
ферментативные реакции 202
- УДФ-галактуронозная кислота 204, 205
УДФ-глюкоза 201 и сл.
биохимическая роль 202
гидразинолиз 126
гидролиз 201, 331
N¹-метил-, синтез 260
окисление 286
синтез 242, 248, 260, 263, 269
структура 201
ферментативные реакции 202 и сл., 204
- УДФ-глюкуронозная кислота 204 и сл.
синтез 260, 263, 271 и сл., 286
ферментативные реакции 204, 205
- УДФ-диоксанацетон 204
- УДФ-α-D-ксилоза 204
- УДФ-рамноза 204
- УДХ-холин, синтез 250
- Уридин-5'-трифосфат (УТФ) 189, 202, 204, 205, 207
биосинтез 305
синтез 238
- Уридин-2'-фосфат
5-галогенпроизводные 173
синтез 131, 147
- Уридин-3'-фосфат
5-галогенпроизводные 173
диметилловый и дибензиловый эфи-ры, гидролиз 178
синтез 148
- Уридин-2'(3')-фосфат 126—128
гидразинолиз 131
гидрирование 131
- Уридин-5'-фосфат
аминоацилангидриды 231
биосинтез 304
5-галогенпроизводные, синтез 146, 173
2',3'-изопропилиден-, бензиловый эфир 143, 243, 265
5-окси- 173
синтез 139, 140, 141, 143
- Уридин-5'-фосфит, 2',3'-дibenзил-, бензиловый эфир 242
- Уридин-5'-фосфоамид 260
- Уридин-5'-фосфоморфоллид 263
- Уридин-3',5'-циклофосфат
2'-тетрагидропиранил- 148
устойчивость гликозидной связи 136
- Фарнезилпирофосфат, синтез 169
- Фарнезилфосфат, синтез 169
- Флавинадениндинуклеотид 196 и сл.
аналоги, синтез 245
восстановление 197
гидролиз 331
дезаминирование 197
комплексы с металлами 190
конформация 197
синтез 240, 245, 247, 261, 269
— ферментативный 197
структура 196
ферментативные реакции 197
- Фосфатидилсерин 213
- Фосфатидилэтаноламин 212
- Фосфаты, реакции, биохимические аспекты 349 и сл.
- Фосфоамиды
гидролиз 258
применение для фосфорилирова-ния 258
фосфорилирующая способность 342
- Фосфодиэстераза
змеиного яда 376, 478
— гидролиз нуклеиновых кислот 123
селезенки, гидролиз эфиров нук-леотидов 178
- Фосфолипиды, биосинтез 212 и сл.
- Фосфорилий-катион 165
- Фосфорилирование нуклеозидов 163 и сл.
гуанидинфосфатами 165
диалкил(арил)хлорфосфатами 141, 148, 152, 156, 160
диморфоллидфосфобромидом 163
диморфоллидфосфохлоридом 163
ди-(α-цианэтил)хлорфосфатом 164
енолфосфатами 165
л-нитрофенилди-хлорфосфатом 163
полифосфорной кислотой 97, 143, 154
смешанным ангидридом бензилфос-фористой и дифенилфосфорной кислот 143, 147

- тетраалкил(арил)пирофосфатами 141, 148
 тетрахлорпирофосфатом 164
 трихлорацетонитрилом 169
 фенилдихлорфосфатом 163
 фосфоамидами 169
 фосфорной кислотой 169
 хинонфосфатами 165
 хлорангидридом циануровой кислоты 169
 2-хлор-5,6-бензо-1,2,3-диоксофосфоринном-4 163
 хлорокисью фосфора 139 и сл., 147, 148
 цианэтилфосфатом 152, 167
 циклофосфатом гидробензоина 163
 эфирами динимидазолилфосфиновой и имидазолилфосфорной кислот 171
 — мономерного метафосфата 165 и сл.
 Фосфохолин 212, 242
 Фосфостаноламин 212
 Фосфоэфиры, алкилирующая способность 346 и сл.
- Целлобиуроновая кислота 205
 Циклонуклеозиды 25 и сл.
 гидролиз 30, 31
 использование для специфической инверсии углеводных гидроксильных групп в нуклеозидах 91 и сл.
 легкость образования 28
 получение
 — О²,2'-циклонуклеозидов 29
 — О²,3'-циклонуклеозидов 29
 — N³,5'-циклонуклеозидов 25, 31, 100
 — О,5'-циклонуклеозидов 29
 применение для синтеза 2'-дезоксирибонуклеозидов 99 и сл.
 реакции 32, 33, 91 и сл.
 фосфаты 154, 173
 N³,5'-Циклоаденозин 29, 31
 Циклогуанозин 25
 О⁶,5'-Циклосевдоуридин 30, 32
 О⁶,2'-Циклотимидин 28, 29
 О²,3'-циклотимидин 27, 28, 91
 гидролиз 91
 О²,5'-Циклотимидин 27, 51
 гидролиз 27
 синтез 27
 структура 51
 S²,2'-Циклотиоуридин 29
- О²,2'-Циклоуридин 33, 92, 95—97, 99
 фосфаты 26
 О²,3'-Циклоуридин 28—30, 97
 гидролиз 97
 О²,5'-Циклоуридин 33
 О²,2'-Циклоцитидин 99
 фосфаты 26
 О²,5'-Циклоцитидин, 25
 Цитидин
 N⁶-аминоацильные производные 44
 ацетилирование 6-аминогруппы 44
 2',3'-бензилиден- 140, 141, 143
 5-галоген- 39, 108
 2',3'-изопропилиден-, фосфорилирование 143
 5-карбэтокси- 78
 5-метил- 108
 5-нитро- 78
 N⁶-пептидные производные 44
 синтез 72, 78, 108
 сульфэфиры 171
 Цитидин-3',5'-дифосфат 155
 Цитидин-5'-дифосфат (ЦДФ) 189
 действие этиленимина 285
 производные 211 и сл.
 синтез 257, 271
 ЦДФ-абеквоза 217
 ЦДФ-глицерин
 синтез 215, 250, 263
 структура 214
 ЦДФ-глюкоза, синтез 269
 ЦДФ-диглицериды 213
 синтез 250, 263
 ЦДФ-дилаурин 250
 ЦДФ-диметиламиноэтанол, синтез 271
 ЦДФ-дипальмитин 250
 ЦДФ-инозит 213
 синтез 271
 ЦДФ-метиламиноэтанол, синтез 271
 ЦДФ-нейраминная кислота 210
 структура 211
 ЦДФ-пальмитин 213
 ЦДФ-рибит 209
 синтез 215, 250
 структура 215
 ЦДФ-рибоза, восстановление 250
 ЦДФ-серин, синтез 271
 ЦДФ-тивелоза 217
 ЦДФ-холин
 синтез 212, 242, 271, 286
 ферментативные реакции 213
 ЦДФ-этаноламин
 синтез 212, 250, 271, 285
 ферментативные реакции 213

- Цитидин-5'-сульфат, кислотный гидролиз 171
 Цитидин-5'-трифосфат (ЦТФ) 189, 211, 212, 215
 биосинтез 305, 306
 Цитидин-3'-фосфат
 бензиловый эфир, ферментативный гидролиз 178
 рентгеноструктурный анализ 131
 Цитидин-2'(3')-фосфат 128
 гидразинолиз 131
 гидрирование 131
 пептидные производные 233
 pK аминогруппы 130
 спектры оптического вращения 131
 Цитидин-5'-фосфат
 синтез 140, 141, 143
 спектры оптического вращения 131
 Цитидин-5'-фосфоамид 260
 Цитидин-5'-фосфоморфолид 263
- Цитидин-3',5'-циклофосфат, устойчивость гликозидной связи 136
 Цитозин
 3-β-D-арабинофуранозил- 99
 3-β-D-глюкопиранозил- 78
 — N⁶-аминоацильные производные 44
 — N⁶-пептидные производные 44
 4,5-дигидро-, устойчивость 6-аминогруппы 41
 3-β-D-лактозил- 78
 3-β-D-целлобиозил- 78
- Эстронфосфоморфолид, синтез 279
 Этилполифосфат
 использование для полимеризации нуклеотидов 515
 применение в синтезе нуклеозидов 82
 Этокснацетилеи, действие на фосфаты 285

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Предисловие</i>	5
<i>Предисловие автора</i>	7
<i>Глава 1. Введение</i>	9
<i>Литература</i>	11
<i>Глава 2. Химия нуклеозидов</i>	12
Выделение	12
Строение	13
Псевдоуридин	21
Циклонуклеозиды	25
Свойства	35
Нуклеозиды-антибиотики	54
Другие нуклеозиды	59
«Активный метионин» и аденинметилпентозид	63
Синтез нуклеозидов	70
<i>Литература</i>	113
<i>Глава 3. Химия нуклеотидов</i>	123
Выделение	123
Структура	125
Нуклеозид-5'-фосфаты	125
Нуклеотид-2'- и нуклеотид-3'-фосфаты	126
Нуклеозидциклофосфаты	133
Нуклеозид-2'(или 3'),5'-дифосфаты	137
Синтез нуклеотидов	139
Рибонуклеозид-5'-фосфаты	139
Рибонуклеозид-2'- и рибонуклеозид-3'-фосфаты	147
Рибонуклеозид-2',3'-циклофосфаты	148
Нуклеозид-3',5'-циклофосфаты	150
Нуклеозид-3'(или 2'),5'-дифосфаты	152
Дезоксинуклеозид-3'- и дезоксинуклеозид-5'-фосфаты	156
Алкиловые эфиры нуклеотидов	160
Другие фосфорилирующие агенты	163
Аналоги нуклеотидов	171
Свойства нуклеотидов	172
<i>Литература</i>	180
<i>Глава 4. Нуклеотидангидриды</i>	187
Аденозин-5'-трифосфат и другие нуклеозид-5'-полифосфаты	187

Никотинамидадениндинуклеотиды	193
Флавинадениндинуклеотид	196
Другие адениновые производные	197
Кофермент А	198
Производные уридин-5'-пирофосфата	200
Уридиндифосфоглюкоза	201
Уридиндифосфоглюкуроновая кислота	204
Уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин	205
Пептидные производные уридин-5'-пирофосфосахаров	207
Нейраминовая кислота и другие производные	210
Производные цитидин-5'-пирофосфата	211
Производные гуанозин-5'-пирофосфата	217
Производные дезоксинуклеотидов	218
Активный сульфат	222
Аденозин-3',5'-пирофосфат	224
Смешанные ангидриды нуклеотидов и карбоновых кислот	224
Свойства ацил- и аминокциладенилатов	229
Прочие ангидриды и родственные соединения	231
Синтез нуклеотидангидридов	234
Классический метод	234
Карбодиимиды и родственные реагенты	247
Фосфоамиды	258
Анионообменные реакции	266
Прочие методы	281
<i>Литература</i>	286
<i>Глава 5. Биосинтез нуклеотидов, нуклеотидангидридов и полинуклеотидов</i>	300
Пуриновые нуклеотиды	300
Пиримидиновые нуклеотиды	304
Ингибирование метаболизма пуринов и пиримидинов	309
Контроль за биосинтезом нуклеотидов	310
Псевдоуридин	311
Биосинтез нуклеотидангидридов	312
Нуклеиновые кислоты	314
Химические основы реакций нуклеотидангидридов	323
Фосфорилирование	326
Обмен анионов	328
Аденилилсульфат	333
Смешанные ангидриды нуклеотидов и карбоновых кислот	335
Другие фосфорилирующие агенты	340
Трансфосфорилирование	342
Мономерный метафосфат	344
Химическое образование связей C—O, C—N и C—C	346
Выводы	348
Биохимические аспекты	349

Катаболизм нуклеотидов	361
Литература	362
Г л а в а 6. Органическая химия нуклеиновых кислот	363
Рибонуклеиновые кислоты	364
Выделение рибонуклеиновых кислот	364
Фракционирование	365
Основные черты строения рибонуклеиновых кислот	371
Способ действия панкреатической рибонуклеазы	379
Нуклеотидная последовательность и концевые группы	386
Структура олигорибонуклеотидов	395
Химический гидролиз рибонуклеиновых кислот	400
Гидразинолиз	402
Деаминация и действие формальдегида	402
Обработка водорастворимыми карбодимидами	403
Обработка гидроксиламином	403
Состав оснований рибонуклеиновых кислот	404
Минорные компоненты рибонуклеиновых кислот	408
Комплексы рибонуклеиновой кислоты	412
Дезоксирибонуклеиновые кислоты	415
Выделение дезоксирибонуклеиновых кислот	415
Фракционирование	417
Основные черты строения дезоксирибонуклеиновых кислот	418
Структура олигодезоксинуклеотидов	421
Последовательность нуклеотидов в дезоксирибонуклеиновых кислотах	427
Апуриновые кислоты	428
Щелочной гидролиз апуриновых кислот	437
Распределение пуриновых нуклеотидов в дезоксинуклеиновых кислотах	439
Другие методы расщепления дезоксирибонуклеиновых кислот	439
Состав оснований дезоксирибонуклеиновых кислот	442
Комплексы дезоксирибонуклеиновой кислоты	447
Литература	451
Г л а в а 7. Синтезы полинуклеотидов	467
Классические методы	467
Дициклогексилкарбодимид	476
Метод смешанных ангидридов	490
Аналоги	505
Механизм	508
Этилполифосфат	516
Литература	517
Г л а в а 8. Физическая химия нуклеиновых кислот	519
Физические свойства олигонуклеотидов	519

Гиперхромный эффект	520
Взаимодействие с красителями	528
Другие свойства	531
Образование комплементарных водородных связей	533
Облучение ультрафиолетовым светом	536
Выводы	538
Физико-химические свойства ферментативно синтезированных полинуклеотидов	539
Взаимодействие между полинуклеотидными цепями	539
Взаимодействие с красителями	549
Гетерополимеры	551
Физико-химические свойства нуклеиновых кислот	553
Макромолекулярная структура дезоксирибонуклеиновых кислот	553
Молекулярный вес	558
Электрометрическое титрование нуклеиновых кислот	562
Свойства дезоксирибонуклеиновых кислот в растворе	568
Ультрафиолетовые спектры поглощения дезоксирибонуклеиновых кислот	584
Растворы ДНК в органических растворителях	595
Нативная одноцепочечная ДНК	599
Денатурация и ренатурация	602
Вторичная структура рибонуклеиновых кислот	609
Рибонуклеиновая кислота вируса табачной мозаики	609
Микросомальная рибонуклеиновая кислота	617
Низкомолекулярные транспортные рибонуклеиновые кислоты	620
Конформация рибонуклеиновой кислоты	626
Конформация нуклеиновых кислот в нуклеопротеидах	628
Гипохромизм	631
Литература	637
Предметный указатель	649

А. Микельсон
ХИМИЯ НУКЛЕОЗИДОВ
И НУКЛЕОТИДОВ

Редактор *Г. Б. Шкляева*
Художник *Г. М. Чеховский*
Художественный редактор *Е. И. Вескова*
Технический редактор *Л. М. Харьковская*
Корректор *М. М. Колотилина*

Сдано в производство 30/IX 1965 г.
Подписано к печати 19/V 1966 г.
Бумага 60×90¹/₁₆—20,88 бум. л.,
41,75 печ. л.
Уч.-изд. л. 42,85. Изд. № 3/3027
Цена 3 р. 27 к. Зак. 1296
Тем. план 1966 г. изд-ва «Мир», пор. № 83

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
Москва, 1-й Рижский пер., 2

Московская типография № 16
Главполиграфпрома
Комитета по печати при Совете
Министров СССР
Москва, Трехпрудный пер., д. 9