

УДК 547.963.32

МЕТОДЫ ХИМИЧЕСКОГО СИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТНЫХ И ПЕПТИДНЫХ ЭФИРОВ НУКЛЕОЗИДОВ, НУКЛЕОТИДОВ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ *

Т. Л. Цилевич, А. А. Краевский и Б. П. Готтих

В обзоре систематизированы сообщения в литературе и методы синтеза аминокислотных эфиров нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов. Обсуждаются принцип выбора защитных групп, способы активации аминокислот и условия реакции, необходимые для синтеза тех или иных конкретных соединений.

Отдельная глава посвящена рассмотрению способов получения пептидных производных, в частности, пептидил-тРНК на основе природных аминоксил-тРНК.

Библиография — 93 наименования.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1766
II. Синтез 3'(2')-О-аминоацил-нуклеозидов	1767
III. Синтез 3'(2')-О-аминокислотных эфиров, нуклеотидов, нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов и олигонуклеотидов	1770
IV. Синтез ациламиноацил- и пептидилпроизводных нуклеозидов, нуклеотидов, олигонуклеотидов и тРНК	1781

I. ВВЕДЕНИЕ

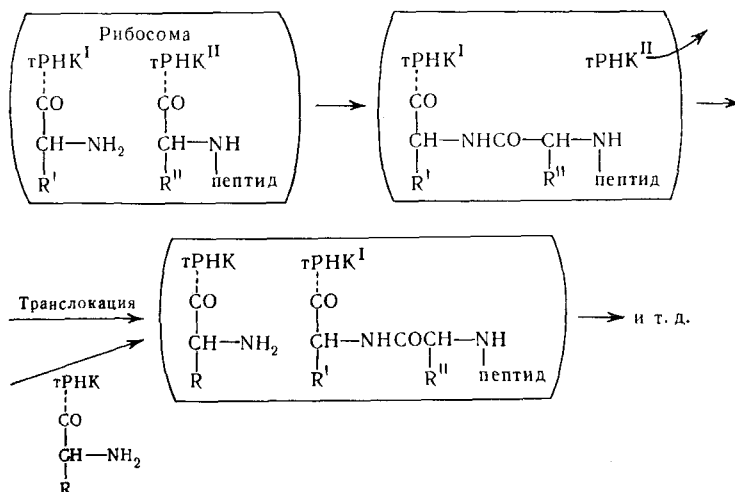
Аминоацил-тРНК и пептидил-тРНК — два неперенных участника синтеза каждой пептидной связи при матричном биосинтезе белка на рибосомах. Пептидная связь образуется в результате электрофильной атаки С-конца пептидного остатка пептидил-тРНК на аминогруппу аминоксил-тРНК (схема 1). В настоящее время этот процесс может воспроизводиться *in vitro* как в варианте непрерывного цикла работы рибосомы на эндогенной либо на синтетической РНК-матрице, когда образуется полипептидная цепь, содержащая, по крайней мере, несколько пептидных связей^{1, 2}, так и одноактно, шаг за шагом, с контролем каждого очередного этапа работы рибосомы³.

Помимо естественных участников биосинтеза полипептида на рибосоме — аминоксил-тРНК и пептидил-тРНК — в единичных модельных актах образования пептидной связи с успехом применяются аминокис-

* Список используемых сокращений: тРНК — транспортная рибонуклеиновая кислота, АТФ — аденозин-5'-трифосфат, АМФ или рА — аденозин-5'-монофосфат, рГ — гуанозин-5'-монофосфат, рС — цитидин-5'-монофосфат, рU — уридин-5'-монофосфат, рI — инозин-5'-монофосфат, А — аденозин, Г — гуанозин, С — цитидин, U — уридин, Ade — аденин, Gua — гуанин, Cyt — цитозин, Ura — урацил; ДМФ — диметилформамид, ДМС — диметилсульфоксид, ТГФ — тетрагидрофуран, ДЦК — N,N'-дициклогексилкарбодимид, Z — бензильоксикарбонил, BOS — *tert*-бутилоксикарбонил, NPS — *o*-нитрофенилсульфенил, Trit — тритил (трифенилметил), Mtrit — монометокситритил, Ac — ацетил, F — формил, Im — имидазол. Остатки активирующих эфиров: OSu — оксесукцинимидного, ONp — *p*-нитрофенилового.

Аминокислоты и компоненты нуклеиновых кислот названы в соответствии с номенклатурой, рекомендованной УРАС.

Схема 1



лотные эфиры нуклеозидов⁴, нуклеотидов⁵ и олигонуклеотидов⁶ (как акцепторы пептида, т. е. аналоги аминоксил-тРНК) и пептидил-(либо ациламиноацил)олигонуклеотиды⁷ (как доноры пептида, т. е. аналоги пептидил-тРНК). Применение таких соединений помогло доказать локализацию пептидилтрансферазного центра бактериальной рибосомы на 50 S-субъединице⁷, а также получить некоторую информацию о субстратной специфичности этого центра^{5-7,8}.

Учитывая то обстоятельство, что рибосомальный синтез пептидов и отдельных белков в системах *in vitro* широко применяется для исследования функционирования рибосомы, представляется интересной разработка методов химического синтеза аминоксил- и пептидил-тРНК.

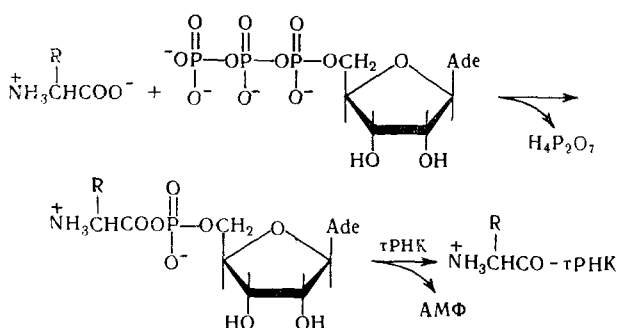
Такие методы позволили бы исследователям иметь в руках любые «гибридные» варианты, в которых аминокислота или пептид⁹ были бы присоединены к неспецифическим для них тРНК.

Несмотря на большие успехи, достигнутые химией природных соединений в области синтеза аминокислотных производных нуклеотидов и родственных соединений, поиск новых методов синтеза остается актуальной задачей. Такого рода производные найдут свое применение при исследовании рибосом и, может быть, ряда ферментов нуклеотидного обмена. Разработка новых методов синтеза представляется нам этапом на пути к неферментативному синтезу аминоксил-тРНК.

II. СИНТЕЗ 3'(2')-О-АМИНОАЦИЛ-НУКЛЕОЗИДОВ

В белок-синтезирующих системах аминоксил-тРНК образуется из аминокислоты, тРНК и АТФ (схема 2) на специальных ферментах: аминоксил-тРНК-синтетазах (см. ²). На первой стадии этой ферментативной реакции проходит гидролиз АТФ до АМФ и неорганического пирофосфата и сопряженное образование аминоксиладенилата, в котором аминокислотный остаток обладает электрофильными свойствами. Далее этот аминокислотный остаток переносится на 3'-гидроксил тРНК, в результате чего синтезируется аминоксил-тРНК со сложноэфирной связью между аминокислотным остатком и тРНК. Химическая природа этой связи установлена в 1960 г.¹⁰, причем показано, что она является макроэргической.

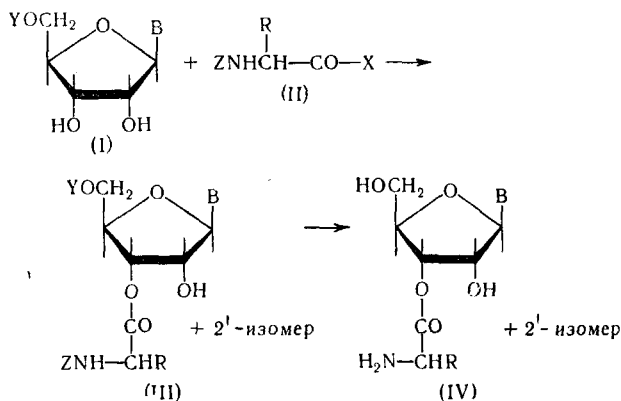
Схема 2



При разработке подходов к синтезу аминоксил-нуклеозидов и их более сложных аналогов исследователи использовали принцип биологического процесса. Во всех случаях предварительно активировали аминокислотный остаток, который затем вводили во взаимодействие с нуклеозидной компонентой. При этом исследователи для этой цели использовали различные способы активации из арсенала химии синтеза пептидов. Если рассматривать эти методы по типу соединений в промежуточных активированных аминокислотах, их можно отнести к ангидридам, амидам и сложным эфирам. Реакционная способность активированных таким образом аминокислот или пептидов различна и, кроме того, в различной степени зависит от условий реакции. Необходимо учитывать также и возможность ацилирования аминогрупп оснований.

Синтезу 3'(2')-О-аминоксил-нуклеозидов (IV) посвящено большое количество работ¹¹⁻¹⁸. Принцип синтеза, общий во всех этих работах, заключается в реакции 5'-О-защищенных нуклеозидов (I) с защищенными по аминогруппе и активированными по карбоксилу аминокислотами (II) (схема 3).

Схема 3



где Y — трифенилметил- либо монометокситрифенилметил; Z — бензил-оксикарбонил, трет.-бутилоксикарбонил или О-нитрофенилсульфенил.

Вследствие того, что 5'-О-третил- либо 5'-О-монометокситрифенилнуклеозиды (I) не растворимы в воде, все синтезы проводились в органических растворителях, таких как пиридин, диметилформамид, диоксан, тетрагидрофуран. При этом показано, что селективно получать аминокислотные эфиры нуклеозидов в этих условиях без побочного N-ацилирования оснований удается для аденозина, уридина и гуанозина. В случае цитиди-

на в первую очередь происходит аминоацилирование аминогруппы гетероциклического основания, вследствие чего необходима предварительная защита этой группы.

Из известных методов активации карбоксильных групп аминокислот для синтеза 3'(2')-О-аминоацил-нуклеозидов (IV) успешно применяли конденсацию с помощью дициклогексилкарбодиимида⁴⁻⁷, симметричные ангидриды N-защищенных аминокислот^{11,12}, имидазолиды N-защищенных¹⁷ и N-протонированных аминокислот¹⁸. В наиболее фундаментальной работе, в которой описан синтез эфиров всех четырех основных нуклеозидов: аденозина, гуанозина, цитидина и уридина — он осуществлен методом симметричных ангидридов¹². В результате всех стадий синтеза выход фенилаланинового эфира этих нуклеозидов соответственно 36; 5,3; 19,3 и 33,6%.

Подобно получению аминокислотных эфиров нуклеозидов конденсацией с помощью дициклогексилкарбодиимида, либо симметричных ангидридов, синтезированы 3'-О-аминокислотные эфиры 2'-дезоксинуклеозидов: дезоксиаденозина¹² и дезокситимидина¹⁵. Выходы этих эфиров были близки к выходам эфиров рибонуклеозидов.

Среди N-защит аминокислот, применявшихся в синтезах 3'(2')-аминоацилнуклеозидов, использовались бензилоксикарбонильная (Z)¹¹⁻¹⁶, трет.-бутилоксикарбонильная (BOC)^{4,19} и *o*-нитрофенилсульфенильная (NPS)-защиты^{17,19}. Здесь следует отметить, что дать строгие рекомендации относительно выбора той или иной группы для планируемого нового синтеза не всегда просто. Каждая из лабораторий, в которых синтезировались аминоацил-нуклеозиды, пользовалась своим набором защит. Нам кажется, однако, что для препаративного приготовления аминоацил-аденозина и гуанозина наиболее предпочтительная Z-защита, удаляемая в условиях каталитического восстановления, не сопровождающегося апуринизацией. Кроме того, сравнительно низкая растворимость 5'-О-триададенозина в большинстве обычных растворителей, кроме пиридина и ДМФ, затрудняет использование NPS-группы. Для аминокислотных эфиров уридина и цитозина возможно широкое применение BOC и NPS-защит, удаление которых осуществляется мягкой кислотной обработкой — либо абсолютной трифторуксусной кислотой, либо раствором хлористого водорода в эфире — и не приводит к разрушению сложно-эфирной связи¹⁹. В одном из предложенных способов синтеза 3'(2')-О-аминоациладенозинов использовались имидазолиды N-протонированных аминокислот¹⁸. Этот метод не требует предварительного введения и последующего удаления защитной группы и тем самым удобен для проведения микросинтезов, например, в радиоактивном варианте. Однако, из-за трудности растворения имидазолидов трифторацетатов аминокислот, для работы с препаративными количествами он довольно неудобен.

Изложив различные методы синтеза О-аминоацильных производных нуклеозидов, необходимо сказать еще об одном существенном вопросе — строении этих соединений.

При аминоацилировании нуклеозидов и нуклеотидов можно ожидать получения смеси 2'- и 3'-изомеров. Вопросы о преимущественном аминоацилировании одной из оксигрупп рибозы и миграции аминоацильного остатка между 2'- и 3'-гидроксилами представляют не только самостоятельный химический интерес, но и тесно связаны с установлением истинного положения аминоацильного остатка в аминоацил-тРНК. Это важно знать для понимания химизма образования аминоацил-тРНК на аминоацил-тРНК-синтетазах¹¹ и механизма синтеза пептидной связи на рибосомах²⁰.

Для установления локализации аминокислотного остатка был принят ряд исследований как на синтетических аминокислотных производных нуклеозидов и нуклеотидов^{4, 11, 12, 21-28}, так и на аминокислот-аденозине, выделенном из аминокислот-тРНК^{29, 30}. Выводы оказались весьма противоречивыми, однако, совокупность всех имеющихся данных позволяет считать установленным тот факт, что синтетические методы получения О-аминокислот-нуклеозидов и -нуклеотидов если и приводят к смеси изомеров, то в ней значительно преобладает 3'-изомер как конечный продукт реакции, хотя в отдельных случаях в результате реакции аминокислотирования были получены как чистый 3'-изомер (Z-фенилаланил-аденозин)¹², так и почти чистый 2'-изомер (О-ВОС-L-лейцил-аденозин)⁴.

Кроме положительных данных по аминокислотированию нуклеозидов в названных условиях (органический растворитель, комнатная температура, несколько часов), важное значение имеют и отрицательные результаты. Например, показано, что *p*-нитрофениловые, N-оксисукцинимидные и 5-хлор-8-оксихинолиновые эфиры N-защищенных аминокислот не реагируют с гидроксильными нуклеозидов, а *p*-нитрофениловые и N-оксисукцинимидные эфиры медленно реагируют с аминокислотной группой цитозина^{31, 32}.

Заканчивая рассмотрение методов аминокислотирования нуклеозидов можно сделать два следующих вывода:

1. Для реакции с гидроксильными рибозидного остатка активация N-защищенных аминокислот должна быть достаточно мощной; с гидроксильными способны реагировать имидазолиды и ангидриды аминокислот (синтез с ДЦК, по-видимому, также осуществляется через промежуточные ангидриды).

2. В среде абсолютных растворителей, помимо гидроксильных рибозы, только NH₂-группа цитозинового остатка реагирует с ангидридами, амидами (имидазолидами) и сложными эфирами N-защищенных аминокислот. (Здесь и далее в составе нуклеозидов или нуклеотидов рассматриваются только четыре основных гетероциклических основания — аденин, гуанин, урацил и цитозин).

Подобно синтезу 3'(2')-О-аминокислот-нуклеозидов метод с использованием ДЦК позволяет вводить в 5'-О-трифилнуклеозиды N-защищенные пептиды, приводя к 3'(2')-О-пептидил-нуклеозидам¹⁵. К сожалению, в этом случае, по существу выбранной схемы должна наблюдаться значительная рацемизация С-концевой аминокислоты пептида, величина которой осталась неопределенной.

III. СИНТЕЗ 3'(2')-О-АМИНОКИСЛОТНЫХ ЭФИРОВ НУКЛЕОТИДОВ, НУКЛЕОЗИД-5'-ДИ- И ТРИФОСФАТОВ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

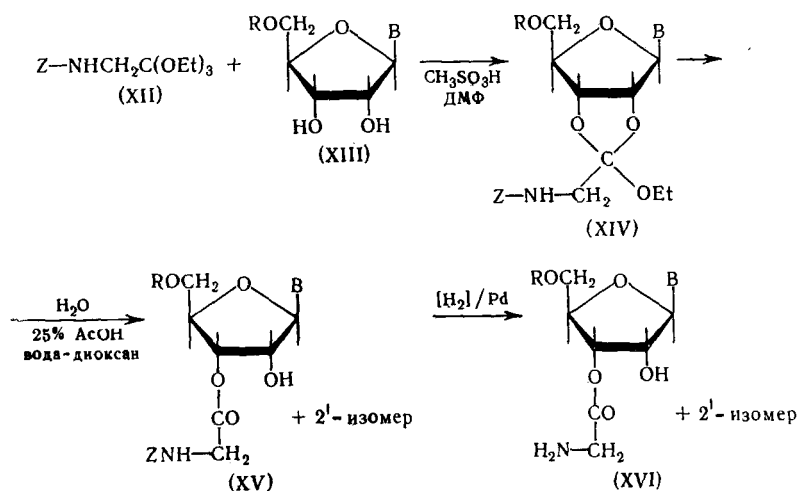
Трудности селективного аминокислотирования гидроксильных рибозы значительно возрастают при переходе от нуклеозидов к нуклеотидам. В этом случае к имеющимся группам с нуклеофильными свойствами — гидроксильным рибозы и аминокислотным группам оснований — прибавляются гидроксильные фосфатного остатка. Тем самым при аминокислотировании имеется возможность образования трех типов соединений — сложных эфиров (V), амидов (VI) и смешанных ангидридов (VII) (схема 4).

И действительно, первые же попытки перенести метод симметричных или смешанных ангидридов в среде абсолютных растворителей либо осуществить конденсацию с помощью ДЦК в тех же условиях привели исключительно к смешанным ангидридам типа (VII). Это показало, что необходимо найти условия аминокислотирования нуклеотидов, в которых реакционная способность фосфатной группы была бы ослаблена.

эфирной связи аминокислоты с нуклеотидом в этих соединениях очень близки свойствам связи аминокислоты и тРНК, что позволило доказать сложноэфирную природу последней. Однако в препаративном отношении метод тиофениловых эфиров, помимо низких выходов, имеет еще один большой недостаток. В условиях конденсации происходит значительное разрушение нуклеотида, в результате чего после окончания реакции в реакционной массе присутствует смесь соединений, из которой трудно выделить нужное вещество. Так, например, при повторении одного из синтезов методом тиофениловых эфиров в нашей лаборатории, помимо 3'(2')-О-аминоацил-нуклеотида, было получено еще по крайней мере восемь побочных продуктов, содержавшихся в больших количествах, и несколько минорных примесей. При этом выход 3'(2')-О-аминоацил-нуклеотида у нас совпал с литературными данными.

Начиная с 1965 г., появился цикл работ, в которых предложен общий метод синтеза глициновых эфиров нуклеозидов²², нуклеотидов³⁶ и динуклеозидфосфатов^{37,38}. Метод основан на селективной реакции ортоэфира Z-глицина (XII) по *цис*-гидроксильной группировке нуклеозида, нуклеотида или олигонуклеотида (XIII). Образующийся циклический ортоэфир (XIV) гидролизуют в соответствующий Z-глицил-нуклеозид или его производные (XV), с которого затем удаляют Z-защиту, получая 3'(2')-О-глицил-нуклеозид (XVI) или его производные (схема 6).

Схема 6



(R = H, PO₃H₂, P₃H₄O₇, нуклеозид-3'-фосфат)

Переэтерификация в описываемом методе направляется исключительно по *цис*-гликольной группировке: единичные гидроксилы с ортоэфиром (XII) не реагируют. Выходы продуктов реакции на всех стадиях достаточно высокие (60—80%). Однако метод имеет два существенных ограничения. Во-первых, до настоящего времени он применим исключительно для синтеза нуклеозидных или нуклеотидных эфиров глицина, поскольку ортоэфиры других *L*-α-аминокислот не описаны. Во-вторых, условия взаимодействия ортоэфира (XII) с нуклеозидом (или нуклеотидом) (XIII), а также последующего гидролиза ортоэфира (XIV) достаточно жесткие (переэтерификация в ДМФ за 1—3 суток в присутствии больших количеств метансульфокислоты, гидролиз в 25%-ной уксусной кислоте в водном диоксане в течение нескольких часов). По-видимому,

именно эти недостатки и не позволили использовать метод для синтеза глицил-тРНК.

Здесь следует отметить еще одну из возможностей этого метода, в котором ортоэфир карбобензоксиглицина и ^6N -диметиламинометиленаденозин-5'-фосфата использован для конденсации с ^4N -диметиламинометилена-5'-О-трифилцитидином с помощью дициклогексилкарбодиимида, в результате чего получен соответствующий ортоэфир нуклеозиддифосфата, который после гидролиза и гидрогенолиза дал SpA-Gly ³⁹. По близкой схеме получен SpI-Gly . Как видно из этого синтеза, ортоэфир аминокислоты с успехом используется в качестве защиты *цис*-гликольной группировки в синтезе олигонуклеотидов и дает, таким образом, принципиальную возможность получать глициновые эфиры олигонуклеотидов.

В 1967 г. появилось первое сообщение из цикла работ, в которых предложен общий способ синтеза аминокислотных эфиров pA , pU , pG и pC с использованием имидазolidов аминокислот. При разработке этого метода авторы исходили из следующих двух условий. Во-первых, в качестве среды конденсации выбрана либо вода, либо водноорганическая смесь с преобладанием воды. Применение воды позволило резко понизить нуклеофильность гидроксильных фосфатных групп за счет их диссоциации; для pA , pU , pG и pC $pK_a^I = 0,7-1$, $pK_a^{II} = 5,9-6,0$. Кроме того оказалось, что в этих условиях также понижается реакционная способность аминогруппы цитидиловой кислоты, которая совершенно не реагирует с активированными аминокислотами. Эти особенности поведения фосфатных и амино-групп были известны ранее. Например, если при ацетилировании уксусным ангидридом в среде абсолютных растворителей синтезируется всегда *N*-ацетильное производное цитидиловой кислоты, а также происходит образование смешанного ангидрида нуклеотидов и уксусной кислоты^{40, 41}, то в водной среде нуклеотиды или олигонуклеотиды ацетируются уксусным ангидридом^{42, 43} исключительно по гидроксилу рибозы.

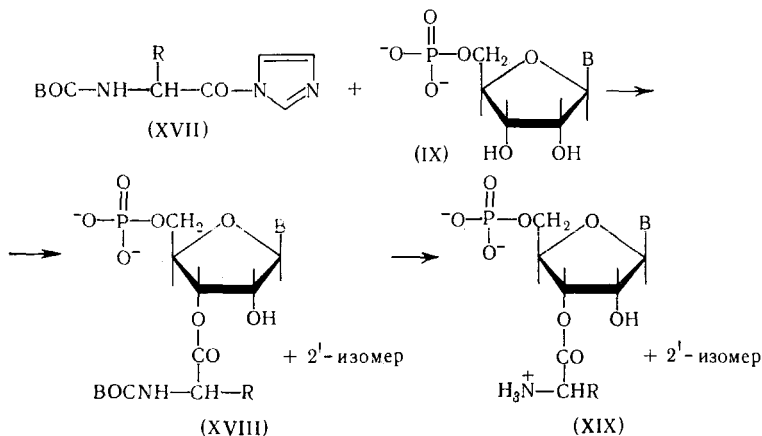
Однако гидроксильные рибозидных остатков нуклеотидов в водной среде также обладают меньшей нуклеофильностью, чем в среде абсолютных растворителей. Например, в органических растворителях симметричные ангидриды *N*-защищенных аминокислот превосходно реагируют с гидроксильными рибозных остатков нуклеозидов^{11, 12}, тогда как те же ангидриды в водной среде совершенно не взаимодействуют с нуклеотидами^{19, 44}. Далее, ДЦК широко применяется как конденсирующее средство для синтеза сложноэфирных связей *N*-защищенных аминокислот с нуклеозидами⁴⁵, тогда как воднорастворимая форма карбодиимида {*N'*-дициклогексил-*N''*-[β -(*N*-метилморфолиний)этил]карбодиимид} не способна осуществлять образование сложноэфирной связи с подобными гидроксильными тРНК⁴⁶. Поэтому для успешных конденсаций в воде необходимо было выбрать мощный активирующий агент, который позволил бы проводить реакцию со слабыми нуклеофильными группами.

В качестве такого активирующего агента был выбран имидазол. Имидазолиды *N*-защищенных аминокислот применяли ранее для создания амидной связи в синтезе пептидов^{47, 48}, а также сложноэфирной связи в депсипептидах⁴⁸. Имидазолиды *N*-защищенных аминокислот получались при реакции *N*-защищенных аминокислот с *N*, *N'*-карбонилдимидазолом известным способом^{47, 48}.

Конденсацией ВОС-аланил-имидазолида со всеми основными компонентами рибонуклеиновых кислот — в смеси вода — ДМФ 5 : 1, 20°, 3,5 часа, удалось получить 3'(2')-О-ВОС-аланил-нуклеотиды с присмелыми выходами в пределах от 25 до 60%, считая на исходный нуклеотид^{19, 49}

(схема 7). Во всех случаях среди продуктов реакции полностью отсутствовали амиды или ангидриды (VI) и (VII) типов (см. стр. 1771). Практически единственными продуктами реакции были 3'(2')-О-ВОС-аланил-нуклеотиды (XVIII, R=CH₃). Кроме них из реакционной смеси были выделены исходные нуклеотиды (IX) и аминокислоты. Выходы эфиров на прореагировавший нуклеотид составляли 80—98%.

Схема 7



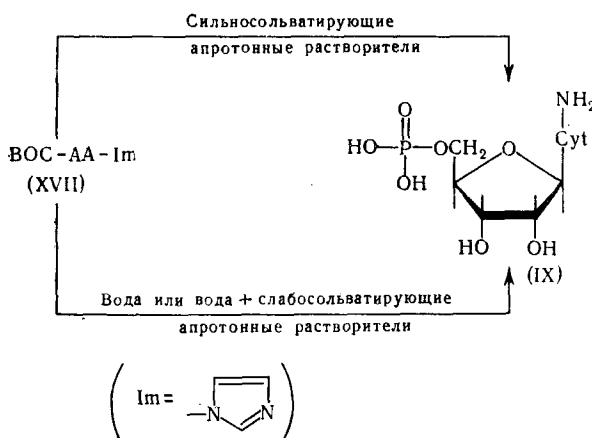
ВОС-Защита с XVIII удалялась затем обработкой абсолютной трифторуксусной кислотой (15 мин. 0°), приводя к 3'(2')-О-аланил-нуклеотидам (XIX, R=CH₃) с высокими выходами. В случае 3'(2')-О-аланил-аденозин-5'-фосфата наблюдалась частичная апуринизация (иногда до 15%).

Оказалось, однако, что в описанном выше варианте метод хорошо применим лишь к аланину и глицину. Имидазолиды других ВОС-аминокислот не удается в достаточной степени растворить в среде, где 80% составляет вода. Другие легко удаляемые N-защитные группы (например, Z, Trit, Mtrit, NPS) только ухудшают растворимость имидазолидов аминокислот. Поэтому далее было исследовано большое число различных растворителей в смеси с водой 1 : 1. Оказалось, что О-ацилирование всех нуклеотидов удается провести в смесях вода — слабосольватирующие апротонные растворители (1 : 1), такие как ацетонитрил, ТГФ, ацетон. Если количество сильно сольватирующих апротонных растворителей (ДМФ, ДМС, формамид, пиридин) достигало 30% от общего объема реакционной среды, реакция также проходила и по аминогруппе цитидиловой кислоты (схема 8)⁵⁰. Таким образом, в найденных смесях (наилучшая из них вода — ацетонитрил) получены эфиры по 3'(2')-оксигруппам нуклеотидов с фенилаланином, лизином, аспарагиновой кислотой, валином, пролином, аспарагином и др.^{19, 50, 51, 52}.

Следует сказать, что 3'(2')-О-аминоацил-нуклеотиды адениловой и уридиловой кислот с высокими выходами получаются в среде абсолютных растворителей, например, в смеси ДМС—ДМФ 5 : 1. При этом, однако, образуется некоторое количество побочных примесей, в том числе 2',3'-ди-О-аминоацил-нуклеотидов¹⁹.

Имидазолидный метод позволяет также вводить в нуклеотиды и более крупные фрагменты, чем аминокислоты. На примере двух пептидов $\text{Boc-Leu-Gly-Trp-OH}$ и Boc-Ala-Ala-OH была показана применимость способа ко всем четырем нуклеотидам⁵³. ВОС-Защиты удалялись обработкой в трифторуксусной кислоте.

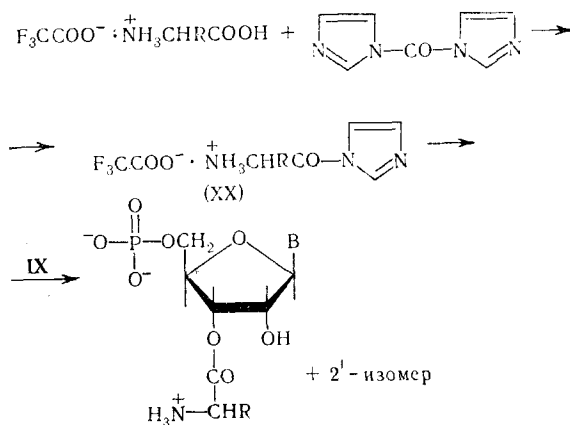
Схема 8



Следует отметить, что в этом методе не исключена рацемизация С-концевой аминокислоты.

Следующим вариантом имидазолидного метода явилось^{19, 54, 55} применение имидазолидов N-протонированных аминокислот (XX), в котором защита амино-группы достигалась протонированием. Трифторацетаты (или хлоргидраты) аминокислот превращали в имидазолиды трифторацетатов аминокислот, которые далее вводили в конденсацию с нуклеотидами в водной среде при pH 7. В этом случае синтез 3'(2')-О-амино-ацил-нуклеотидов (XIX) протекает практически в одну стадию (схема 9).

Схема 9



Оказалось, что с имидазолидами N-протонированных аминокислот (XX) нуклеотиды (IX) реагируют неодинаково. При равных условиях, например одинаковом соотношении реагентов в молях, разведении, время и температура, для имидазолидов трифторацетатов валина и аланина лучше всего взаимодействие проходило с рА (выходы 15—20%), хуже с рU и рG (выходы 4—5%) и совсем не проходило с рС. В последнем случае вся цитидиловая кислота возвращалась из реакции неизменной. (Здесь следует отметить, что и для рА, рU и рG, помимо продукта реак-

ции, были выделены главным образом исходные нуклеотиды рА, рU и рG и лишь небольшие количества побочных веществ.)

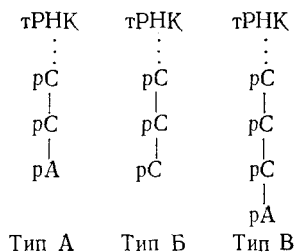
Если выразить различие реакционной способности нуклеотидов неравенством, последнее выглядело бы следующим образом:

$$pA \gg pU = pG \quad pC = 0$$

Аналогичная последовательность наблюдалась при синтезе с использованием тиофениловых эфиров, где также использовались N-протонированные аминокислоты^{33, 34}.

$$pA > pU = pG > pC$$

Эти сведения представляют интерес с точки зрения аминоацилирования тРНК *in vivo*. Как известно (см. ²) независимо от типа тРНК или от источника ее происхождения, несущий аминокислоту (акцепторный) конец тРНК всегда содержит один и тот же полинуклеотидный фрагмент — рСрСрА (тип А). Среди клеточных ферментов есть специальный, достраивающий в тРНК именно этот участок — АТФ (ЦТФ)-тРНК-нуклеотидилтрансфераза (см. ⁵⁶). В обычном виде (тип А) тРНК способна аминоацилироваться на соответствующей ей по виду аминоацил-тРНК-синтетазе, образуя аминоацил-тРНК. Однако, если с помощью АТФ (ЦТФ)-тРНК нуклеотидилтрансферазы удалить концевой нуклеотид рА и ввести вместо него рС, такая молекула (тип В) уже неспособна аминоацилироваться. С другой стороны, если используя этот же фермент в аномальных условиях, получить измененный по сравнению с природным тип молекул, в которых присутствует один лишний остаток рС



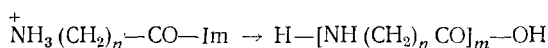
(тип В), то такие молекулы способны аминоацилироваться на аминоацил-тРНК-синтетазе⁵⁷, хотя своими размерами они превышают тип А. Это подчеркивает роль остатка адениловой кислоты в процессе ферментативного аминоацилирования.

Следует подчеркнуть, что химически преимущественное аминоацилирование рА показано в обоих методах, в которых аминокислота вводится в синтез с защитой аминогруппы протонированием, т. е. подобно природному варианту на ферменте. Опираясь на эти данные, можно думать, что по своей структуре рА наиболее реакционноспособен к аминоацилированию, тогда как два остатка рС перед концевым рА в тРНК исключают ошибочное аминоацилирование нестроенной молекулы тРНК.

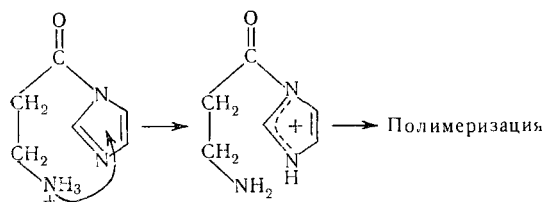
При исследовании возможности и границ применения имидазolidов N-протонированных аминокислот показано, что для получения О-аминоацил-рА и О-аминоацил-рU можно использовать среду абсолютных растворителей. Выходы аминоацил-рА в этом случае увеличиваются до 30—35%, а для рU до 10%. Но, наряду с аминоацил-нуклеотидами, в абсолютных растворителях (ДМС, ДМФ, гексаметилфосфортриамид) образуется ряд примесей; при аминоацилировании рС в этих условиях образуется исключительно смесь побочных веществ с высоким выходом¹⁹.

Так как из литературы не было известно, сохраняется ли оптическая чистота при получении активированных форм N-протонированных аминокислот и их последующей реакции, было проведено исследование стереоспецифичности синтеза 3'(2')-О-аминоацил-нуклеотидов, полученных при помощи имидазолидов N-протонированных аминокислот. pA—Phe и pA—Val, полученные из pA, L-Phe и L-Val, гидролизвались соляной кислотой; далее аминокислоты очищались и превращались реакцией с салициловым альдегидом в N-салицилиденовые производные. Такие основания Шиффа в виде медных комплексов изучались с помощью кругового дихроизма. В круговом дихроизме медные комплексы оснований Шиффа салицилового альдегида и α -аминокислот имеют аномальное вращение при 360—370 нм, причем молекулярная эллиптичность зависит от структуры аминокислоты, а знак эллиптичности — от конфигурации асимметрического атома углерода⁵⁸. Этим методом показано, что в пределах чувствительности метода (до 3%) рацемизация аминокислот не наблюдается.

Дальнейшая разработка метода аминоцилирования с помощью имидазолидов N-протонированных аминокислот показала, что защита аминогрупп протонированием возможна исключительно для α -аминокислот. Если аминогруппа удалена от карбоксильной более, чем на один атом углерода [например, в формуле $\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3(\text{CH}_2)_n \text{COOH}$, $n > 1$ (2→10)], при образовании имидазолидов очень быстро происходит полимеризация:

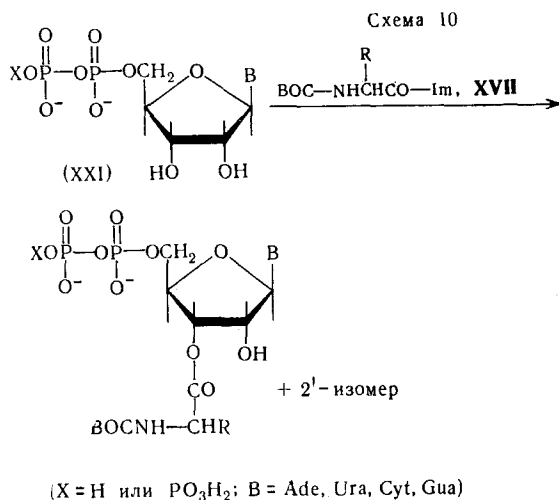


С точки зрения формальных величин pK для аминогрупп такой процесс кажется невероятным. Так, если pK NH_2 -группы глицина (имидазолид которого сравнительно устойчив) составляет 9,6, то при $n=2$ и больше pK NH_2 -группы увеличивается до 10 и более; поэтому защита аминогруппы должна быть здесь более надежной. Предположительное объяснение этому феномену было дано в вероятном внутримолекулярном переносе протона от $\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$ -группы имидазолида аминокислоты на N_3 имидазольного кольца. Для α -аминокислот такой перенос не допустим вследствие стерических препятствий, тогда как для аминокислот с $n > 1$ он теоретически (на моделях Стюарта) вполне возможен. Например,



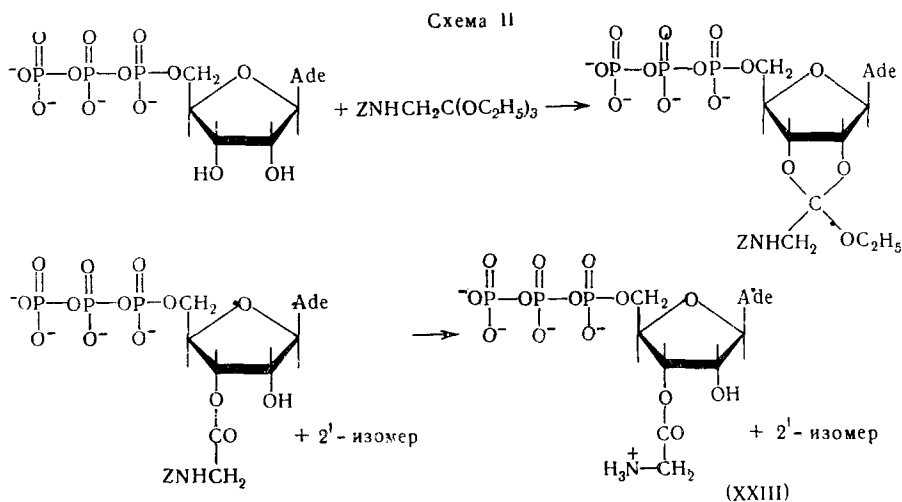
В случае α -аминокислот реакция полимеризации также имеет место, однако скорость ее очень низка. Вероятно, в этом случае она проходит по межмолекулярному механизму, причем образующиеся затем имидазолиды дипептидов быстро полимеризуются дальше, так как в них α -аминогруппа удалена от имидазольного кольца уже на 4 атома. В водной среде образование олигопептидилнуклеотидов проходит в очень небольшой степени. В среде абсолютных растворителей дипептидилнуклеотиды образуются в количествах до 10%, причем выход их зависит от качества исходного карбонилдимидазола.

В 1968 г. появилось сообщение о применении имидазолидов N-защищенных аминокислот для синтеза 3'(2')-О-аминоацилнуклеозид-5'-ди- и трифосфатов (XXI)⁵⁹ в условиях, подобных аминокислотному нуклеотидов (схема 10).



Аналогично были получены 3'(2')-О-пептидилнуклеозид-5'-трифосфаты⁶⁰.

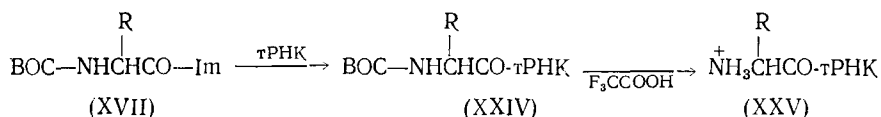
В том же году показана применимость метода ортоэфиров для синтеза 3'(2')-О-глициладенозин-5'-трифосфата (XXIII)⁶¹ (схема 11).



С наибольшими трудностями исследователи столкнулись при попытках провести химическое аминокислотное аминирование тРНК. Как известно, тРНК состоят из 70—80 нуклеотидных звеньев, связанных 3'-5'-фосфодиэфирной связью. В таких полимерных молекулах (молекулярный вес около 25 000) содержится в среднем 80 промежуточных 2'-гидроксильных остатков, одна 2',3'-*цис*-диольная группировка (по которой и присоединяется аминокислота при ферментативном аминокислотном аминировании), фосфомоноэфирная группа на 5'-конце тРНК и около 60 амино-

групп оснований. Все эти группы при определенных условиях способны реагировать с активированной аминокислотой. Поэтому не случайно, что ни один из методов, не отличающихся высокой избирательностью реакции по гидроксилам, а также мягкостью проведения синтеза, не мог привести к аминоацилированию тРНК. Первые и пока единственные надежды разработать способ химического аминоацилирования возлагаются на имидазольный метод. В 1967 г. опубликовано сообщение о взаимодействии имидазолидов формилфенилаланина и ВОС-глицина с препаратом суммарной тРНК пекарских дрожжей⁶². В этой работе показана принципиальная возможность аминоацилирования тРНК в среде с преобладающим количеством воды при 20° в течение нескольких часов. В условиях реакции образуются соединения со сложноэфирным типом связи, а не ангидридным или амидным. Стабильные и высокие выходы аминоацил-тРНК были достигнуты при проведении реакции в 1 М имидазольном буфере. ВОС-Защиту с **XXIV** удаляли обработкой абсолютной трифторуксусной кислотой (схема 12)⁶³.

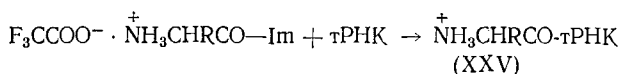
Схема 12



где R=H (глицин) или C₆H₅CH₂ (фенилаланин)

В процессе удаления защиты молекулы аминоацил-тРНК теряли адапторную функцию, т. е. способность специфически связываться с инициаторной РНК на рибосомах, и, таким образом, участвовать в биосинтезе белка. Поэтому необходимо было устранить эту жесткую стадию синтеза. Это удалось сделать, используя имидазолиды N-протонированных аминокислот, реагирующих с тРНК с образованием аминоацил-тРНК в одну стадию (схема 13)⁶⁴.

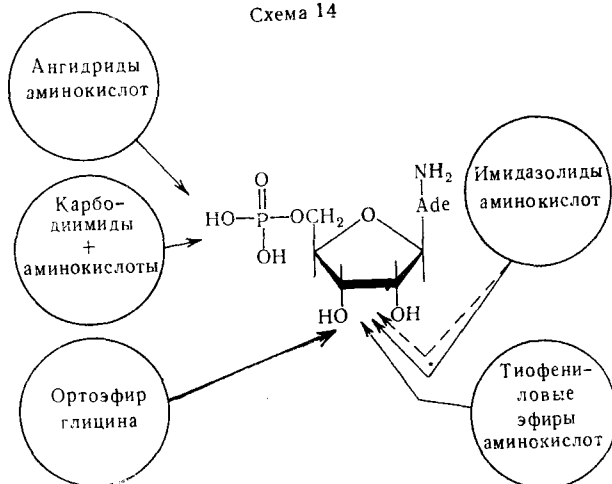
Схема 13



Такая реакция проходила в очень мягких условиях — 1 М имидазольный буфер в воде, pH 7, при 4° за несколько часов. Препараты аминоацил-тРНК, полученные этим способом, в настоящее время исследуются.

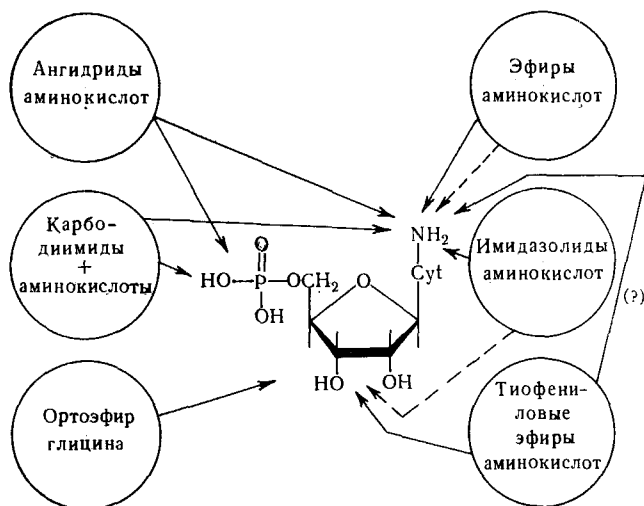
Подводя итог сказанному, мы попытаемся суммировать сведения о направлении реакции аминоацилирования в зависимости от условий реакции и реакционной способности активированной аминокислоты (схемы 14 и 15). В качестве нуклеотидов в примерах даны адениловая кислота (pA), эфиры которой широко применяются в биохимии, и цитидиловая кислота (pC), обладающая наиболее реакционноспособной аминогруппой. Отдельно следует отметить свойства *p*-нитрофениловых и *N*-оксисукцинимидных эфиров *N*-защищенных аминокислот, которые не реагируют ни по фосфатным группам, ни по гидроксилам рибозы. Относительно их взаимодействия с аминогруппой pC сведения противоречивы: с одной стороны, утверждают, что в водноорганических средах такая реакция не протекает⁶⁵; в то время как другие авторы³² ее обна-

Схема 14



Реакции, показанные сплошными стрелками, проводят в среде органических растворителей, а пунктирной стрелкой — в среде с преобладающим количеством воды.

Схема 15



Реакции, показанные сплошными стрелками, проводят в среде органических растворителей, а пунктирными — в среде с преобладающим количеством воды.

ружили. Как бы то ни было, но при обработке нуклеотидов в водно-органической среде при 20° из реакционной смеси выделяют непрореагировавшие нуклеотиды. Эти данные легли в основу большой серии исследований, в результате которых найдены способы селективно ацилировать аминогруппу аминокислот, а также аминокислот-олигонуклеотидов (в том числе и аминокислот-тРНК) (раздел IV).

IV. СИНТЕЗ АЦИЛАМИНОАЦИЛ- И ПЕПТИДИЛ-ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕОЗИДОВ, НУКЛЕОТИДОВ, ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ И тРНК

В последней части обзора изложены сведения по селективному аминоацилированию аминоксил-нуклеозидов, нуклеотидов, олигонуклеотидов и тРНК. Выше уже сказано, что рациональный подход к поиску таких аминоацилирующих агентов заключается: а) в выборе активированных форм аминокислот, реакционная способность которых была бы недостаточной для взаимодействия с гидроксилами рибозы, но позволяла бы проводить конденсацию по аминогруппе аминокислотного остатка аминоксил-нуклеозида и б) в выборе условий, исключающих реакцию по аминогруппам гетероциклических оснований и фосфатным группам.

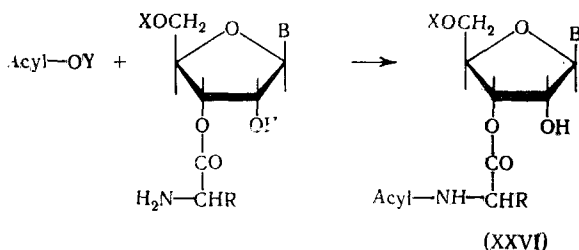
Среди активированных форм карбоновых кислот (в том числе N-защищенных аминокислот) основное внимание уделено активированным эфирам. Такие активированные эфиры, как *p*-нитрофениловые и N-оксисукцинимидные, наиболее широко применяют в пептидном синтезе. Эти эфиры и исследовались в первую очередь как возможные ацилирующие агенты для ацилирования аминоксил-нуклеозидов и аминоксил-тРНК.

Активированные эфиры карбоновых кислот (уксусной, бензойной и др.) в первую очередь вводили во взаимодействие с цитидиловой кислотой в среде абсолютных растворителей, в результате чего были получены с высокими выходами ⁴N-ацетил⁶⁶ или ⁴N-бензоил⁶⁷-цитидин. (Как упоминалось выше, аминогруппы аденина и гуанина устойчивы к ацилированию более реакционноспособными ацилирующими агентами — такими, как ангидриды). Однако в водноорганической среде, как показано в 1967 году⁶⁵, N-оксисукцинимидные эфиры уксусной, муравьиной и других кислот не реагируют с цитидиловой кислотой. Основываясь на этих данных, был разработан рациональный способ синтеза ациламиноацил-тРНК и пептидил-тРНК, который будет описан ниже.

В 1967—1970 гг. появились два сообщения^{31, 32}, в которых показано, что ацилоксисукцинимиды и ацил-*p*-нитрофенолы в водноорганической среде могут реагировать по аминогруппе цитидиловой кислоты при 24°, причем за 24 часа выходы N-ацилцитидиловой кислоты могут достигать 35—45%. Чтобы избежать этого процесса авторы предложили более мягкие ацилирующие агенты — эфиры 5-хлор-8-оксихинолина³², которые не реагируют в водноорганической среде с цитидиловой кислотой, но ацилируют аминогруппу аминокислотного остатка.

В общем виде ацилирование (аминоацилирование) аминокислотных эфиров компонентов тРНК или тРНК показано на схеме 16.

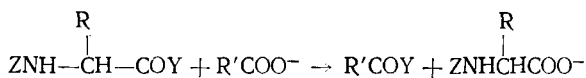
Схема 16



где Y — спиртовая компонента активированного эфира, X—H (нуклеозиды), H₂O₃P (нуклеотиды) или олигонуклеотиды.

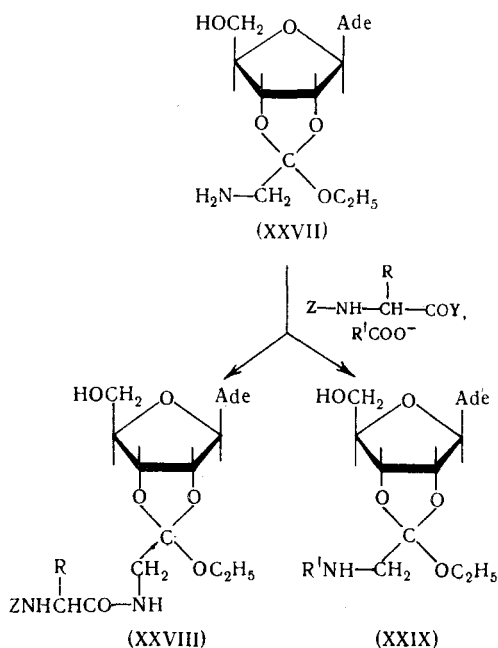
Активацией N-оксисукцинимидом по схеме 16 приготовлены: A-(AcGly), A-(Val-Gly) и A-(Lys-Gly), а также CpA-(Ac-Gly) и CpA-(Lys-Gly)^{68, 69}.

Аминоацилирование аминоксил-нуклеозидов и их аналогов не следует проводить в ацетатных или формиатных буферных растворах. Исходя из конечного результата, можно предположить, что в присутствии ацетата или формиата в средах органических растворителей или в воде происходит обмен активирующей группой между ациламинокислотой и ацетатом или формиатом (схема 17)^{70, 71}.



где $R=CH(CH_3)_2$ или $(CH_2)_4NHZ$; $Y=OSu$ или ONp ; $R'=H$ или CH_3 .

В результате суммарной реакции, исследованной для ортоэфира глициладенозина (2',3'-О-аминометилэтоксиметиленаденозина (XXVII), (схема 18) с *p*-нитрофениловыми или N-оксисукцинимидными эфирами



(R, R', Y - см. схему 17)

карбобензоксивалина или N^{α} , N^{ε} -дикарбобензоксисилина в присутствии CH_3COO^- или HCOO^- как в абсолютных ДМФ или ДМС, так и в смесях их с водой образуется смесь 2',3'-O-(N-ацил)аминометилэтоксиметиленаденозинов. Помимо основных продуктов реакции 2',3'-O-(N-карбобензоксивалил)- и 2',3'-O-(N-дикарбобензоксисилил)-(аминометилэтоксиметиленаденозинов (XXVIII) из реакционных масс выделены 2',3'-O-(N-ацетил)- и 2',3'-O-(N-формил)-аминометилэтоксиметиленаденозины (XXIX), причем в ДМФ-2М ацетатном буфере в воде выход их составлял 39—42%.

Однако примеров синтеза пептидил-нуклеозидов или олигонуклеотидов до настоящего времени описано мало. Несравнимо больше исследована реакция ацилирования аминоксил-тРНК. Особенно большой ин-

терес ациламиноацил-тРНК представляет для изучения механизма биосинтеза белка на рибосомах. Ациламиноацил-тРНК инициирует образование полипептидной цепи в рибосомах (например, FMet-тРНК в белок-синтезирующей системе *Echerichia coli*⁷², AcPhe-тРНК в модельной системе с рибосомами и полиуридилиновой кислотой в качестве матрицы⁷³ и в других случаях).

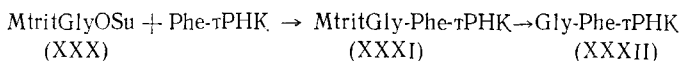
В 1964 г. впервые была приготовлена синтетически FMet-тРНК реакцией *p*-нитрофенилформиата с Met-тРНК⁷⁴. Аналогично для ацетилирования аминокислот-тРНК применялся и уксусный ангидрид⁷³, но такая реакция проходит неоднозначно: наблюдается частичное ацилирование каких-то других участков тРНК^{75, 76}. Общий удобный метод разработан в 1967—1970 гг. с использованием N-оксисукцинимидных эфиров^{75, 76}. Конденсация N-оксисукцинимидных эфиров карбоновых кислот с аминокислот-тРНК осуществляется в смеси воды с органическими растворителями при 20° и pH 5—6.

Из многих применявшихся органических растворителей наиболее удобным оказался диметилсульфоксид. Выходы ряда ациламиноацил-тРНК (FPhe-тРНК, AcPhe-тРНК, каприл-Phe-тРНК, лаурил-Phe-тРНК, пальмитил-Phe-тРНК, AcVal-тРНК, AcMet-тРНК) оказались близки к количественным, а для N^α, N^ε-ди-AcLys-тРНК выход составил около 90%. Полученные ациламиноацил-тРНК не теряли своих адапторных свойств, т. е. в присутствии соответствующих им кодонов способны были связываться с рибосомами⁷⁶ и инициировать полипептидный синтез^{77, 78}.

Синтез олигопептидил-тРНК впервые проведен с использованием растворимого в воде карбодиимида^{43, 73}. Выше уже упоминалось, что этот конденсирующий агент не способен образовывать в водной среде сложноэфирных связей между аминокислотами и гидроксилами рибозных остатков тРНК; аминогруппы гетероциклических оснований и фосфатные остатки в этих условиях также не реагируют. Это позволило с помощью N'-циклогексил-N''-[β-(N-метилморфолиний)этил]карбодиимида (ЦМЭ-карбодиимида) разработать первый метод синтеза формилпептидил-тРНК. Таким способом были получены FGly-Val-тРНК⁴⁶ и FGly-Gly-Val-тРНК⁷⁹. Этот метод, однако, не нашел широкого применения, отчасти, возможно, из-за трудностей удаления формильной защиты без разрушения структуры формил-пептидил-тРНК.

Более тщательно разработанный метод, который в настоящее время дает возможность синтезировать вплоть до дека- и тридекапептидил-тРНК, использует N-оксисукцинимидные эфиры. Впервые синтез Gly-Phe-тРНК был осуществлен конденсацией N-оксисукцинимидного эфира Mtrit-глицина (XXX) с Phe-тРНК с образованием Mtrit Gly-Phe-тРНК (XXXI) и последующим удалением защиты (схема 19).

Схема 19



Выбор защитной группы в XXX и условий конденсации XXX с тРНК не являлся тривиальной задачей, так как защитная группа впоследствии должна была быть удалена с XXXI в очень мягких условиях. В противном случае лабильная структура пептидил-тРНК могла легко нарушиться. Для этой цели были испытаны *трет.*-бутилоксикарбонильная (BOC), тритильная (Trit) и монометокситритильная (Mtrit) N-защитные группы, однако попытки элиминировать в мягких условиях BOC- и Trit-защиты не удалось. Mtrit-группа с XXXI удалялась 5%-ной дихлор-

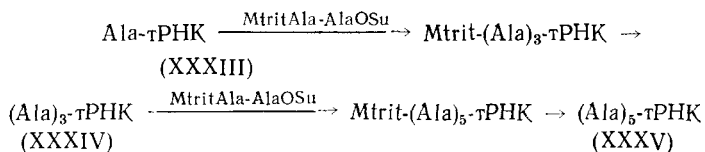
уксусной кислотой при 4° за 5 мин.; полученная в результате такой обработки Gly-Phe-тРНК (XXXII) обладала адапторной функцией и была способна служить донором пептида на рибосомах⁷⁸.

Проверка этого метода синтеза на большой группе дипептидил-тРНК показала⁸⁰, что конденсация N-оксисукцинимидных эфиров Mtrit-аминокислот с аминоацил-тРНК одинаково хорошо проходит при pH 5—8 в среде ДМС — водный буфер 4:1. Из испытанных органических растворителей (ДМС, ДМФ, этанол, ТГФ и этилацетат) ДМС оказался наиболее удобным. В нем реакция происходит в максимально гомогенных условиях и, вследствие этого, с наибольшим выходом.

Строение аминокислоты в XXX (схема 19) также влияло на выход XXXI. Если для N-оксисукцинимидных эфиров Mtrit-глицина и -аланина выходы были близки к количественным^{80—84}, то для N-оксисукцинимидных эфиров Mtrit-фенилаланина и валина выходы не превышали 55—85%⁸⁰. Такое снижение выходов объясняется стерическими препятствиями аминокислотного компонента синтеза XXX, так как и N-защита и боковой радикал аминокислоты в этом случае достаточно объемны. Для преодоления этой трудности в качестве N-защиты была использована NPS-группа, легко удаляемая с NPS-пептидил-тРНК 0,4 M раствором тиосульфата натрия в воде при 30° за 2 часа. Так были получены Val-Gly-Phe-тРНК⁸⁵ и ряд других^{86, 87} с выходами, близкими к количественным.

Синтез пептидил-тРНК с более крупными пептидными остатками проводили по принципиально подобной схеме, он сочетал при построении пептидной цепи как ступенчатый, так и блочный способы⁸². В качестве примера можно привести синтез пентааланил-тРНК (XXXV, схема 20).

Схема 20



По этой схеме пентапептид (XXXV) строится из аминокислотных звеньев 1+2+2. Выход XXXIV на взятый в реакцию XXXIII составляет 93%, и XXXV на XXXIV — 80%. Подобным способом получены несколько три- и тетрапептидов, содержащих валин, фенилаланин, аланин, лейцин и метионин в качестве ферментативно присоединенной аминокислоты, и глицин или аланин, введенные синтетически⁸³. Также в 4—5 этапов синтезированы (Gly)_n-Phe-тРНК, (Gly)_n-Val-тРНК, (Ala)_n-Phe-тРНК и (Ala)_n-Ala-тРНК, где $n=4—12$ ⁸⁴. Конденсации при построении таких сравнительно больших пептидил-тРНК проводили при 30° в течение 12 час.

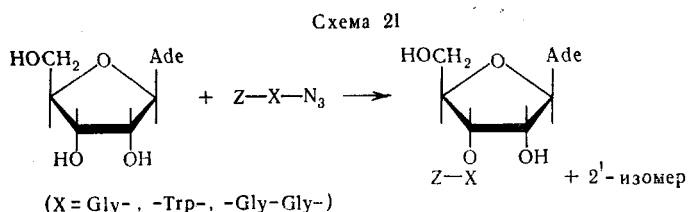
Использование NPS-защиты позволило распространить метод на гидроксилсодержащие аминокислоты (серин, тирозин, треонин⁸⁶, а также фенилаланин⁸⁷). Конденсацию NPS-пептидил-OSu с аминоацил-тРНК в случае этих аминокислот проводили при 30° за 2 часа в смеси водного буфера с pH 8,1 и ДМС в соотношении 1: (1—4) по объему; при этом защиты гидроксильных серина, тирозина и треонина не требовалось. Выходы пептидил-тРНК были близки к количественным.

Активация с помощью образования N-оксисукцинимидных эфиров в настоящее время начинает находить применение для синтеза специ-

альных вариантов ациламиноацил-тРНК и пептидил-тРНК при решении конкретных биохимических задач. Например, из N-оксисукцинимидного эфира феноксиуксусной кислоты и Phe-тРНК (в составе суммарной тРНК) была приготовлена феноксиацетил-Phe-тРНК (в составе суммарной тРНК). Это позволило разработать метод выделения индивидуальной фенилаланиновой тРНК⁸⁸. Аналогичный способ разработан и для Val-тРНК⁸⁹. С помощью образования N-оксисукцинимидного эфира 2,2,5,5-тетраметилпирролинил-N-окси-3-карбоновой кислоты, содержащего стабильный радикал, получен ряд ациламиноацил-тРНК (тРНК^{Phe}, тРНК^{Val}), несущих на аминогруппе аминокислот-тРНК стабильный радикал^{90,91}. Третичная структура названных соединений исследовалась при помощи ЭПР-спектров.

Ряд пептидил-тРНК использован в качестве субстратов фермента — пептидил-тРНК-гидролазы⁹², который селективно гидролизует аминокислот-тРНК.

В заключение следует сказать, что возможности синтеза аминокислотных эфиров нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов изучены еще сравнительно мало. Иллюстрацией этому является появившееся недавно исследование, в котором получены 3'(2')-O-карбобензоксиглицил-, 3'(2')-O-карбобензокситриптофанил- и 3'(2')-O-карбобензоксиглицил-аденозин⁹³ (схема 21).



Синтез осуществлялся конденсацией азидов карбобензоксикаминокислот и дипептида с аденозином в водном диоксане 3:1 при pH 9 и 8°. Этот способ интересен с нескольких точек зрения. Во-первых, в нем не требуется защита 5'-гидроксила. Во-вторых, он, вероятно, позволит исключить рацемизацию C-концевой аминокислоты в пептидах, если его удастся распространить на оптически активные пептиды. В-третьих, здесь показана особенность поведения азидов N-защищенных аминокислот и пептидов в среде, содержащей главным образом воду при основных pH. Как известно из опыта пептидной химии, использование азидов аминокислот и пептидов возможно исключительно для реакции по аминогруппе, тогда как гидроксилы серина, треонина и тирозина в этих условиях с азидом не взаимодействуют.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова, Рибосомы, «Наука», М. 1971.
2. Л. Л. Киселев, В. Г. Никифоров, О. Л. Астаурова, Б. П. Готтих, А. А. Краевский, Молекулярные основы биосинтеза белков, «Наука», М., 1971.
3. R. K. Tompkins, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **66**, 1164 (1970).
4. J.-P. Waller, T. Erdős, F. Lemoine, S. Guttman, E. Sandrin, Biochim. biophys. acta, **119**, 566 (1966).
5. B. P. Gottikh, L. V. Nikolayeva, A. A. Krayevsky, L. L. Kisselev, FEBS Letters, **7**, 112 (1970).
6. I. Rychlik, J. Černa, S. Chládek, J. Zemlička, L. Haladová, J. Mol. Biol., **43**, 13 (1969).
7. R. E. Monro, J. Černa, K. A. Marcker, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **61**, 1042 (1968).

8. A. Panet, N. de Groot, Y. Lapidot, *Eur. J. Biochem.*, **15**, 222 (1970).
9. G. Herve, F. Chapeville, *J. Mol. Biol.*, **13**, 757 (1965).
10. H. G. Zachau, *Chem. Ber.*, **93**, 1822 (1960).
11. D. H. Rammner, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1997 (1963).
12. J. Zemlička, S. Chládek, L. Haladová, I. Rychlick, *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **34**, 3755 (1969).
13. Е. Я. Дрейман, В. А. Дмитриева, С. Г. Камзолова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *ЖОХ*, **31**, 3899 (1961).
14. З. А. Шабарова, Н. И. Соколова, М. А. Прокофьев, *ДАН*, **128**, 740 (1959).
15. Н. И. Соколова, В. А. Баканова, З. А. Шабарова, М. А. Прокофьев, *ЖОХ*, **33**, 2480 (1963).
16. З. А. Шабарова, В. Д. Смирнов, М. А. Прокофьев, *Биохимия*, **29**, 502 (1964).
17. Б. П. Готтих, А. А. Краевский, П. П. Пурыгин, Т. Л. Цилевич, З. С. Белова, Л. Н. Рудзите, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1967**, 2571.
18. А. А. Краевский, П. П. Пурыгин, Б. П. Готтих, Там же, **1971**, 2028.
19. B. P. Gottikh, A. A. Kravetsky, N. B. Tarussova, P. P. Purygin, T. L. Tsilevich, *Tetrahedron*, **26**, 4419 (1970).
20. H. Neumann, V. E. Shashoua, J. C. S. Sheehan, A. Rich, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 1207 (1968).
21. B. E. Griffin, M. Jarman, C. B. Reese, J. E. Sulston, D. R. Trantham, *Biochemistry*, **5**, 3638 (1966).
22. J. Zemlička, S. Chládek, *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **31**, 3775 (1969).
23. H. G. Zachau, G. Acs, F. Lipmann, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **44**, 885 (1958).
24. W. Frank, H. G. Zachau, *Ztschr. physiol. Chem.*, **331**, 258 (1963).
25. R. Wolfenden, D. H. Rammner, F. Lipmann, *Biochemistry*, **3**, 329 (1964).
26. C. S. McLaughlin, V. M. Ingram, *Science*, **145**, 942 (1964).
27. C. S. McLaughlin, V. M. Ingram, *Biochemistry*, **4**, 1442 (1965).
28. C. S. McLaughlin, V. M. Ingram, Там же, **4**, 1448 (1965).
29. J. Sonnenbichler, H. Feldmann, H. G. Zachau, *Ztschr. physiol. Chem.*, **334**, 283 (1963).
30. H. Feldmann, H. G. Zachau, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 13 (1964).
31. S. Chládek, J. Zemlička, V. Gut, Там же, **35**, 386 (1969).
32. V. Gut, S. Chládek, J. Zemlička, *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **35**, 2398 (1970).
33. T. Wieland, G. Pfeleiderer, *Adv. in Enzymol.*, **19**, 235 (1957).
34. T. Wieland, H. Merz, G. Pfeleiderer, *Chem. Ber.*, **93**, 1816 (1960).
35. S. B. Weiss, H. G. Zachau, F. Lipmann, *Arch. Biochem. Biophys.*, **83**, 101 (1959).
36. S. Chládek, J. Zemlička, F. Šorm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 554 (1966).
37. S. Chládek, J. Zemlička, *Coll. Czechosl. Chem. Commun.*, **33**, 232 (1968).
38. S. Chládek, J. Zemlička, Там же, **32**, 1776 (1967).
39. J. Zemlička, S. Chládek, *Biochemistry*, **10**, 1521 (1971).
40. A. W. D. Avison, *J. Chem. Soc.*, **1955**, 732.
41. P. Berg, *J. Mol. Biol.*, **222**, 1015 (1956).
42. A. Stuart, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2346 (1963).
43. Д. Г. Кнорре, А. Н. Малышева, Н. М. Пустошилова, А. П. Севастьянов, Г. Г. Шамоковский, *Биохимия*, **31**, 1181 (1966).
44. А. А. Краевский, П. П. Пурыгин, Н. Б. Тарусова, Б. П. Готтих, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1970**, 2769.
45. K. Moldave, P. Castelfranco, M. Meister, *J. Biol. Chem.*, **234**, 841 (1959).
46. В. К. Алтунина, С. Н. Загребельный, Д. Г. Кнорре, *Биохимия*, **30**, 189 (1965).
47. G. W. Anderson, R. Paul, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4423 (1958).
48. R. Paul, G. W. Anderson, *J. Organ. Chem.*, **27**, 2094 (1962).
49. А. А. Краевский, П. П. Пурыгин, Л. Н. Рудзите, З. С. Белова, Б. П. Готтих, *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **1968**, 378.
50. Н. Б. Тарусова, А. А. Краевский, П. П. Пурыгин, Т. Л. Цилевич, Б. П. Готтих, Там же, **1970**, 1363.
51. Н. Б. Тарусова, Л. И. Кузнецова, А. А. Краевский, Б. П. Готтих, Там же, **1971**, 1511.
52. Н. Б. Тарусова, В. В. Мазурова, А. А. Краевский, Б. П. Готтих, Там же, **1971**, 1736.
53. Б. П. Готтих, А. А. Краевский, П. П. Пурыгин, Там же, **1970**, 1104.
54. А. А. Краевский, Н. Б. Тарусова, Б. П. Готтих, Тезисы 7 Междунар. симп. по химии природных соединений, «Знание», Рига, **1970**, стр. 246.

55. Б. П. Готтих, П. П. Пурьгин, А. А. Краевский, Изв. АН СССР, 1971, 2529.
56. И. И. Рапапович, Ферментная система, синтезирующая 3'-ОН-акцепторный конец транспортной РНК, Успехи биол. химии, 9, 35 (1968).
57. B. Rether, J. Gangloff, N. Befort, J. P. Ebel, Abstracts, 7-th meeting FEBS, Варна, 1971, № 315.
58. Ю. М. Торчинский, Биохимия, 31, 1046 (1966).
59. П. П. Пурьгин, А. А. Краевский, Б. П. Готтих, Изв. АН СССР, сер. хим., 1968, 1084.
60. П. П. Пурьгин, А. А. Краевский, Б. П. Готтих, Там же, 1970, 1369.
61. J. Zemlička, S. Chládek, Coll. Czechosl. Chem. Commun., 33, 3293 (1968).
62. Б. П. Готтих, А. А. Краевский, Л. Л. Киселев, Л. Ю. Фролова, Молекулярная биология, 1, 767 (1967).
63. Б. П. Готтих, А. А. Краевский, Т. Л. Цилевич, Л. Н. Рудзите, Изв. АН СССР, сер. хим., 1970, 113.
64. Б. П. Готтих, Т. Л. Цилевич, А. А. Краевский, см.⁵⁴, стр. 248.
65. Y. Lapidot, N. de Groot, M. Weiss, R. Peled, Y. Wolman, Biochim. biophys. acta, 138, 241 (1967).
66. M. van Montagu, F. Molemans, J. Stockx, Bull. soc. chim. Belges, 77, 171 (1968).
67. Л. Н. Николенко, В. Н. Незавибатько, М. Н. Семенова, ЖОХ, 39, 223 (1969).
68. S. Chládek, J. Zemlička, Coll. Czechosl. Chem. Commun., 33, 4299 (1968).
69. S. Chládek, J. Zemlička, Там же, 35, 89 (1970).
70. J. Zemlička, S. Chládek, Biochemistry, 10, 1521 (1971).
71. J. Zemlička, S. Chládek, Biochim. biophys. acta, 246, 487 (1971).
72. D. Nathans, F. Lipmann, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, 497 (1961).
73. A.-L. Haenni, F. Chapeville, Biochim. biophys. acta, 114, 135 (1966).
74. K. Marcker, F. Sanger, J. Mol. Biol., 8, 835 (1964).
75. N. de Groot, Y. Lapidot, A. Panet, Y. Wolman, Biochem. biophys. Res. Commun., 25, 17 (1966).
76. Y. Lapidot, N. de Groot, I. Fry-Shafir, Biochim. biophys. acta, 145, 292 (1967).
77. N. de Groot, A. Panet, Y. Lapidot, Biochem. Biophys. Res. Commun., 26, 447 (1967).
78. N. de Groot, A. Panet, Y. Lapidot, Eur. J. Biochem., 15, 215 (1970).
79. S. N. Zagrebelsky, D. G. Knorre, Biochim. biophys. acta, 114, 407 (1966).
80. Y. Lapidot, N. de Groot, S. Rappoport, A. D. Hamburger, Там же, 149, 532 (1967).
81. Y. Lapidot, N. de Groot, S. Rappoport, A. Panet, Там же, 157, 433 (1968).
82. Y. Lapidot, N. de Groot, Там же, 179, 521 (1959).
83. Y. Lapidot, N. de Groot, S. Rappoport, Там же, 182, 105 (1969).
84. Y. Lapidot, N. de Groot, S. Rappoport, D. Elat, Там же 190, 304 (1969).
85. Y. Lapidot, D. Elat, S. Rappoport, N. de Groot, Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 559 (1970).
86. M. Rubinstein, N. de Groot, Y. Lapidot, Biochim. biophys. acta, 209, 183 (1970).
87. A. D. Hamburger, N. de Groot, Y. Lapidot, Там же, 213, 115 (1970).
88. I. Gillam, D. Blew, R. C. Warrington, M. Tigerstrom, G. M. Tener, Biochemistry, 7, 3459 (1968).
89. В. П. Демускин, О. Д. Нелидова, Э. И. Будовский, Молекулярная биология, 5, 858 (1971).
90. B. M. Hoffman, P. Schofield, A. Rich, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 1195 (1969).
91. R. Schofield, B. M. Hoffman, A. Rich, Biochemistry, 9, 2525 (1970).
92. N. de Groot, Y. Groner, Y. Lapidot, Biochim. biophys. acta, 186, 286 (1969).
93. В. Н. Незавибатько, Л. Н. Николенко, М. Н. Семенова, ЖОХ, 41, 2109 (1971).

Институт молекулярной биологии
АН СССР, Москва