



УДК 577.1

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ
5'-ГИДРОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ НУКЛЕОЗИДОВ, НУКЛЕОТИДОВ
И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Юодка Б. А.

Вильнюсский государственный университет
им. В. Калпюкаса

Ацетонированные клетки бактерий *Serratia marcescens* IFM F420, имеющие высокую фосфотрансферазную активность, были использованы для специфического фосфорилирования 5'-гидроксильной группы ряда нуклеозидов, нуклеотидов и динуклеозиднофосфатов. Донором остатка фосфорной кислоты служил *p*-нитрофенилфосфат. Найдены оптимальные условия реакции и установлены оптимальные концентрации для нуклеозидных и нуклеотидных субстратов, использованных в работе. Фосфорилирование олигонуклеотидов протекает на 40—70%, что позволяет применить этот метод для препаративных целей. Ацетонированные клетки бактерий *Serratia marcescens* IFM F420 обладают также фосфатазной активностью, которая частично может быть ингибирована.

Нуклеозиды, нуклеотиды и олигонуклеотиды, используемые в самых различных областях генетики, химии, биохимии и молекулярной биологии, получают путем щелочного и ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот, а также путем химического синтеза. При синтезе нуклеотидов из нуклеозидов обычно используются методы химического фосфорилирования [1]. Однако они в большинстве случаев неспецифичны, что приводит к необходимости блокировать отдельные гидроксильные группы моносахаридов, а также функциональные группы гетероциклических оснований нуклеозидов типа оротидина, 5-карбоксиуридина. В последнее время появились сообщения о применении ряда ферментов для специфического фосфорилирования 5'- или 2'(3')-гидроксильных групп нуклеозидов [2, 3]. Наиболее подробно описана нуклеозидфосфотрансфераза*, выделенная из моркови [3, 4].

Недавно было показано [6, 7], что бактерии *Serratia*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* и *Staphylococcus* содержат фосфотрансферазу, которая специфически фосфорилирует 5'-гидроксильную группу в нуклеозидах и их аналогах. Более подробно описаны оптимальные условия действия фосфотрансферазы из бактерий *Pseudomonas trifolii*. Для ферментативного фосфорилирования 5'-гидроксильной группы олигонуклеотидов в настоящее время используется только полинуклеотидкиназа [8—12].

* Комиссия по ферментам Международного биохимического союза не выделила отдельного класса нуклеозидфосфотрансфераз, но говоря о кислотной фосфатазе (КФ 3.1.3.2), отметила, что этот фермент катализирует и трансфосфорилирование.

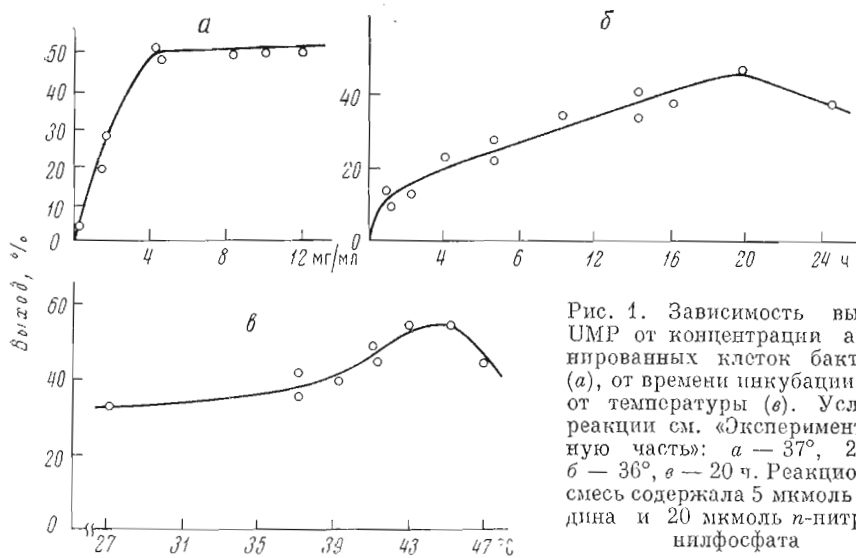
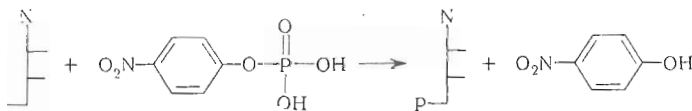


Рис. 1. Зависимость выхода УМР от концентрации ацетонированных клеток бактерий (а), от времени инкубации (б) и от температуры (в). Условия реакции см. «Экспериментальную часть»: а — 37°, 24 ч, б — 36°, в — 20 ч. Реакционная смесь содержала 5 мкмоль уридина и 20 мкмоль *n*-нитрофенилфосфата

В данной работе для специфического препаративного фосфорилирования нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов применены ацетонированные клетки бактерий *Serratia marcescens* IFM F420.

Были подробно изучены условия их применения для специфического фосфорилирования 5'-гидроксильной группы уридина, аденозина, ксантозина, инозина, оротидина, псевдоуридина, 5-оксиуридина, 2'-дезоксигуанидина, 5-этоксикарбонилуридина, 5-карбоксииуридина, уридин-2',3'-циклофосфата, тимидил- (3' → 5')-тимидина, инозил- (3' → 5')-уридина и диуридинмонофосфата с изомерной межнуклеотидной 2' → 5'- и 3' → 5'-связью. В качестве донора фосфорной кислоты в работе применяли *n*-нитрофенилфосфат, который участвует в ферментативной реакции следующим образом:



Прежде всего мы выбирали оптимальные условия фосфорилирования с использованием бактерий *Serratia marcescens* IFM F420. Оказалось, что большее влияние на выход фосфорилированных продуктов имеет количество ацетонированных клеток бактерий. Данные этого эксперимента, проведенного с уридином, представлены на рис. 1.

Как видно из рис. 1, а, максимальный выход уридин-5'-монофосфата (УМР) наблюдается при концентрации ацетонированных клеток 4 мг на 1 мл реакционной смеси.

Используя уридин, мы установили, что оптимальная продолжительность реакции фосфорилирования 20 ч (см. рис. 1, б). Увеличение продолжительности инкубации не только не повышает выход продукта, но даже частично снижает его. Исследование температурной зависимости ферментативной реакции (рис. 1, в) показало, что оптимальная температура для уридина 44°. Далее, используя в качестве субстратов уридин, уридин-2'(3')-монофосфат и уридин-2',3'-циклофосфат, мы исследовали влияние на реакцию фосфорилирования концентрации *n*-нитрофенилфосфата (рис. 2). Необходимое количество донора фосфорной кислоты *n*-нитрофенилфосфата составило 140—160 мкмоль/мл. Это обусловлено тем, что препарат ацетонированных клеток бактерий проявляет не только фосфо-

трансферазную, но и фосфатазную активность, что приводит к дефосфорилированию как продукта реакции, так и *n*-нитрофенилфосфата. Инкубация UMP (в отсутствие субстратов фосфотрансферазной реакции и *n*-нитрофенилфосфата) с ацетонированными клетками бактерий приводит к образованию 20% уридина. Если в реакционной смеси кроме UMP был и *n*-нитрофенилфосфат, то остаток фосфорной кислоты отщеплялся как от нуклеотида, так и от донора фосфорной кислоты, поэтому большой избыток *n*-нитрофенилфосфата значительно повышает выход продукта фосфотрансферазной реакции.

Для ингибирования фосфатазной активности было использовано несколько ингибиторов фосфатазы — $ZnSO_4$, $HgCl_2$, KH_2PO_4 , и KF [15]. Полученные данные приведены в таблице.

Влияние ингибиторов фосфатазы на активность ферментного препарата

Ингибитор	Концентрация ингибитора, М	Активность	
		фосфотрансферазы	фосфатазы
Без ингибитора *	—	1	1
$ZnSO_4$	$1 \cdot 10^{-3}$	1,23	1,06
$HgCl_2$	$1 \cdot 10^{-3}$	0,81	1,0
KH_2PO_4	$1 \cdot 10^{-2}$	1,02	1,0
KF	$1 \cdot 10^{-2}$	0,99	0,99

* За единицу фосфотрансферазной активности принят выход уридин-5'-монофосфата (%), полученный без применения ингибиторов, а фосфатазной активности — количество уридина, образовавшегося из уридин-5'-монофосфата (в отсутствие в реакционной смеси *n*-нитрофенилфосфата и уридина) в результате реакции, проведенной без применения ингибиторов.

Из данных таблицы видно, что только $ZnSO_4$ заметно повышает выход UMP. Другие ингибиторы не оказывают влияния на активность ацетонированных клеток бактерий. Исключением является $HgCl_2$, который подавляет даже нуклеозидфосфотрансферазную активность. Тот факт, что неорганический фосфат не снижает фосфатазную активность ацетонированных клеток бактерий, позволяет предполагать, что эта активность свойственна самой нуклеозидфосфотрансферазе.

Для определения оптимального pH реакции также использовали уридин. Как видно из рис. 3, оптимальный pH в присутствии ионов Zn^{2+} — около 4, в отсутствие ионов Zn^{2+} он сдвигается в более нейтральную область, к 4,5. Исследование оптимального pH реакции для разных субстратов показало, что оптимальный pH в присутствии ионов Zn^{2+} для 2'-дезоксуридина, инозина, ксантозина и уридин-2'(3')-монофосфата, так же как и для уридина, составляет ~ 4 (рис. 4).

Данные об оптимальных условиях фосфотрансферазной реакции уридина мы использовали, исследуя влияние концентрации других субстратов на степень фосфорилирования. Данные экспериментов с рядом нуклеозидов и нуклеотидов приведены на рис. 5. Установлено, что оптимальная концентрация уридина составляет 36, аденозина — 3, ксантозина — 30, инозина — 20, уридин-2',3'-циклофосфата — 48, уридин-2',(3')-монофосфата — 64, 5-карбоксыуридина — 8, 5-этоксикарбонилуридина — 10, а 5-гидроксиуридина, 2'-дезоксуридина, псевдоуридина и оротидина — 4 мкмоль/мл. Как видно из данных, приведенных на рис. 5, большое влияние на эффективность фосфорилирования оказывает структура субстратов. Кроме того, нами было установлено, что фосфорилирование совсем не имеет места в случае *L*-уридина, что указывает на стереоспецифичность данной ферментативной реакции. В отличие от аналогич-

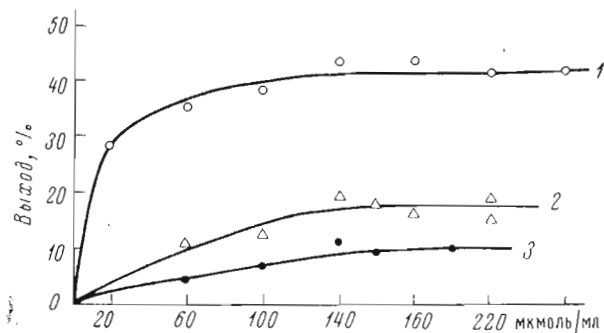


Рис. 2. Зависимость выхода продуктов реакции, образующихся из 5 мкмоль уридина (1), 16 мкмоль уридин-2'(3')-монофосфата (2), 12 мкмоль уридин-2',3'-циклофосфата (3), от концентрации *p*-нитрофенилфосфата

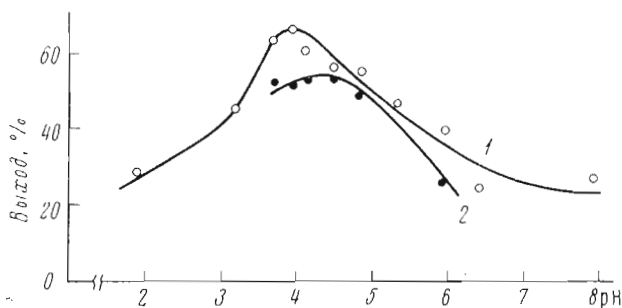


Рис. 3. Зависимость выхода UMP от pH среды в присутствии (1) и в отсутствие (2) ионов Zn^{2+} . В реакционную смесь (см. «Экспериментальную часть») добавляли 0,03 ммоль буфера соответствующего pH

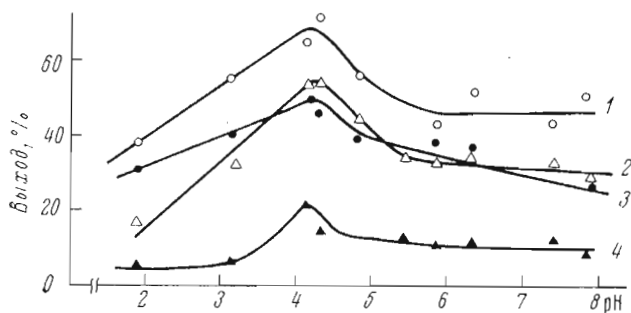


Рис. 4. Зависимость от pH выхода продуктов реакции, образующихся из 1 мкмоль 2'-дезоксуридина (1), 5 мкмоль инозина (2), 7,5 мкмоль ксантозина (3), 16 мкмоль уридин-2'(3')-монофосфата (4)

ного фермента, выделенного из моркови [4, 5], а также из бактерий *Pseudomonas trifolii* [7], фосфотрансфераза из бактерий *Serratia marcescens* IFM F420 фосфорилирует не только нуклеозиды и их аналоги, но и, как мы установили, тиамин и рибофлавин.

Полученные данные об оптимальных условиях ферментативной реакции были использованы нами и при исследовании возможности применения ацетонированных клеток бактерий *Serratia marcescens* IFM F420 для специфического фосфорилирования 5'-гидроксильной группы олигонуклеотидов. Для этой цели использовались синтезированные в нашей лаборатории динуклеозидмонофосфаты тимидил- (3' → 5')-тимидин,

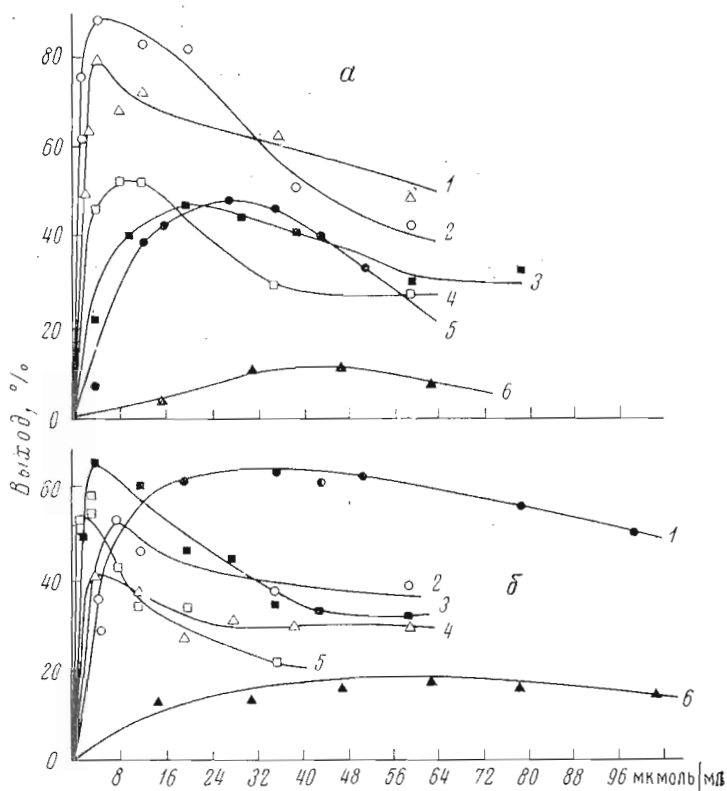


Рис. 5. Зависимость выхода продуктов реакции от концентрации субстратов: *a* — псевдоуридина (1), 5-гидроксиуридина (2), инозина (3), 5-этоксикарбонилуридина (4), ксантозина (5), уридин-2',3'-циклофосфата (6); *б* — уридина (1), 5-карбоксииуридина (2), 2'-дезоксииуридина (3), оротидина (4), аденозина (5), уридин-2'(3')-монофосфата (6)

диуридинмонофосфат и тимидилл-(3' → 5')-уридин, а также инозилл-(3' → 5')-уридин (см. «Экспериментальную часть»). Оказалось, что ацетонированные клетки бактерий хорошо фосфорилируют и олигонуклеотидные производные. Повышение концентрации субстратов от 2 до 20 мкмоль/мл приводит к увеличению выхода 5'-фосфорилированных продуктов с 10 до 50%, однако из-за трудностей в получении этих субстратов нам не удалось определить и использовать оптимальные концентрации динуклеозидмонофосфатов. Структуру 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов доказывали действием щелочной фосфатазы, которая отщепляет 5'-концевой остаток фосфорной кислоты с образованием исходного субстрата. После фосфорилирования диуридинмонофосфата и инозилл-(3'-5')-уридина проводили щелочной гидролиз, в результате которого получили соответственно уридин-2'(3'), 5'-дифосфат и уридин в первом случае и инозин-2'(3'), 5'-дифосфат и уридин во втором.

При исследовании реакционной смеси мы обнаружили, что фермент не экстрагируется из ацетонированных клеток бактерий и после использования не теряет фосфотрансферазной активности. Это позволяет неоднократно применять ацетонированные клетки бактерий в реакции.

Таким образом, в статье предложен новый метод специфического фосфорилирования олигонуклеотидов и показано, что ацетонированные клетки бактерий *Serratia marcescens* IFM F420 могут быть использованы для препаративного фосфорилирования 5'-гидроксильной группы ряда нуклеозидов и нуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали уридин, аденозин, инозин, уридин-2',3'-циклофосфат и щелочную фосфатазу фирмы «Reanal», ксантозин фирмы «Chemapol» (ЧССР), рибофлавин «E Merck AG», *n*-нитрофенилфосфат фирмы «Sernitz» (ГДР) и 2'-дезоксиуридин фирмы «Ferak» (ФРГ). Псевдоуридин нам любезно предоставила сотрудница Московского государственного университета Е. Г. Антонович; L-уридин, оротидин, 5-карбоксииуридин, этиловый эфир 5-карбоксииуридина и 5-оксиуридин — сотрудник Института биохимии и органической химии АН ЧССР А. Голи, а инозил-(3' → 5')-уридин — сотрудник того же института И. Смрт. Диуридин-монофосфат получали по методике, описанной в работе [13], а тимидил-((3' → 5')-тимидин и тимидил-((3' → 5')-уридин синтезировали по методике [14]. Восходящую хроматографию проводили на бумаге марки FN7 (быстрая) и FN17 (средняя). Системы растворителей: этиловый спирт — 1 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 7 : 3; (А); этиловый спирт — 0,5 М ацетатный буфер, рН 3,8, 5 : 2; (В) изопропиловый спирт — NH_4OH — вода, 7 : 1 : 2 (В) трет-бутанол — вода, 7 : 3 (Г).

Уридин-2'(3')-монофосфат. 6,6 мг (20 мкмоль) уридин-2', 3'-циклофосфата растворяли в 1 мл 0,1 н. HCl и инкубировали 4 ч при 20°. Реакционную смесь нейтрализовали 1 н. NaOH . Чистоту препарата определяли с помощью БХ.

Ацетонированные клетки бактерий. Бактерии *Serratia marcescens* IFM F420 выращивали аэробно при 30°, 16 ч в среде М-9, содержащей, %: глюкозы — 1, казеина — 0,5, MgSO_4 — 0,001 и CaCl_2 — 0,0001. Рост бактерий контролировали, измеряя оптическую плотность среды культивирования на спектрофотометре СФ-4А, λ 562 нм (среду культивирования предварительно разбавляли 25 раз). Бактерии центрифугировали (10 мин, 4500g), промывали 0,02%-ным раствором KCl , и осадок суспендировали в небольшом объеме того же раствора. Полученную суспензию медленно прибавляли при интенсивном перемешивании к охлажденному ацетону. Смесь отсасывали, ацетонированные клетки бактерий промывали ацетоном и сушили в эксикаторе.

Нуклеозид-5'-фосфаты. Реакционную смесь (0,25 мл), содержащую 0,03 ммоль ацетатного буфера (рН 4,1), 0,25 мкмоль ZnSO_4 , 40 мкмоль *n*-нитрофенилфосфата, 0,2—30 мкмоль субстрата и 1 мг ацетонированных клеток бактерий инкубировали 20 ч при 44°. После инкубации реакционную смесь центрифугировали, и надосадочную жидкость хроматографировали препаративно на бумаге. Хроматографию проводили для аденозина в системах А и В, инозина — в системе Г, а для других субстратов — в системах А и Б. Вещества обнаруживали в УФ-свете и идентифицировали сравнением с известными образцами, элюировали раствором 0,1 н. HCl и спектрофотометрически определяли количество соединений. Структуру нуклеотидов и олигонуклеотидов доказывали действием щелочной фосфатазы, а для олигорибонуклеотидов — и щелочным гидролизом.

а) *Обработка щелочной фосфатазой.* 0,7—0,8 ОЕ (λ 261 нм) нуклеозид 5'-фосфата или олигонуклеотида инкубировали с 0,58 ферментной единицы щелочной фосфатазы в 0,1 мл 0,1 М трис- HCl буфере (рН 8) 15 ч при 37°. После инкубации реакционную смесь хроматографировали в системе А. Соединения, поглощающие в УФ-свете, идентифицировали сравнением с контрольными веществами.

б) *Щелочной гидролиз.* К 0,1—0,3 мкмоль 5'-фосфорилированных олигорибонуклеотидов в 0,05 мл воды прибавляли 0,05 мл 2 н. KOH и гидролизировали 4 ч при 100°. Реакционную смесь нейтрализовали катионитом дауэкс-50 (H^+ -форма). Идентификацию полученных соединений проводили аналогично пункту а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корана Г. (1964) Новые направления в химии биологически важных эфиров фосфорной кислоты, «Мир», М.
2. Braverman G., Chargaff E. (1953) J. Amer. Chem. Soc., 75, 2020—2023.
3. Braverman G., Chargaff E. (1953) J. Amer. Chem. Soc., 75, 4113—4117.
4. Tunis M., Chargaff E. (1960) Biochim. et biophys. acta, 37, 257—259.
5. Tunis M., Chargaff E. (1960) Biochim et biophys. acta, 37, 267—273.
6. Katagiri H., Yamada H., Mitsugi K., Takahashi M. (1964) Agr. Biol. Chem., 28, 577—581.
7. Mitsugi K., Komagata K., Takahashi M., Iizuka H., Katagiri H. (1964) Agr. Biol. Chem., 28, 586—591.
8. Agarwal K. L., Buchi H., Caruthers M. H., Gupta N., Khorana H. G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., Rajbhandary U. L., Van De Sande J. H., Sgaramella V., Weber H., Yamada T. (1970) Nature, 227, 27—31.
9. Harvey C. L., Gabriel T. F., Wilt E. M., Richardson C. C. (1971) J. Biol. Chem., 246, 4523—4530.
10. Harvey C. L., Wright R (1972) Biochemistry, 11, 2667—2669.
11. Kleppe K., Van De Sande J. H., Khorana G. H. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 67, 68—70.
12. Tsiapalis C. M., Narang S. A. (1970) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 39, 631—635.
13. Юодка Б., Рашап Р. (1974) Научн. тр. ВУЗ Лит. ССР. Химия и хим. техн., 16, 213—218.
14. Gilham P. T., Khorana H. G. (1958) J. Amer. Chem. Soc., 80, 6212—6215.
15. Yoshida H., Tamiya N. J. (1971) J. Biochem., 69, 525—527.

Поступила в редакцию
2.VIII.1974;
после доработки —
24.III.1975

ENZYMATIC PHOSPHORYLATION OF 5'-HYDROXYL GROUP OF NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES AND OLIGONUCLEOTIDES

ЮОДКА В.

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

Aceton-treated cells of bacterium *Serratia marcescens* IFM F 420 with a high phosphotransferase activity were used for specific phosphorylation of 5'-hydroxyl of a number of nucleosides, nucleotides and dinucleoside monophosphates. p-Nitrophenyl phosphate was used as a donor of the phosphate group. Optimal conditions of the reaction were estimated: optimal concentration of p-nitrophenyl phosphate is 160 μ mol/ml, optimal quantity of aceton-treated bacterial cells amounts to 44 mg/ml, optimal temperature reaches 44°, duration of the reaction is 20 h. Various substrates were used and their optimal concentrations were established. The phosphorylation of an oligonucleotide occurs readily and yields of phosphorylated products amount from 40 to 70%, that enables one to use this method for preparative purposes. Aceton-treated cells of bacteria have a phosphatase activity which can be partially inhibited by $ZnSO_4$.