



УДК 577.152.6*513.134

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РНК-ЛИГАЗЫ Т4.
ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДНОГО СОСТАВА СУБСТРАТОВ
И РАЗМЕРА ДОНОРА ФОСФАТА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ
МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО ЛИГИРОВАНИЯ

Женодарова С. М., Блягина В. П., Майстренко В. Ф.,
Пустишилова Н. М.*, Смолянинова О. А., Соболева Н. А.*

*Институт биологической физики Академии наук СССР,
г. Пущино Московской обл.;*

** Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт
биологически активных веществ, г. Бердск*

Нуклеозид-2' (3'), 5'-дифосфаты, динуклеотиды рАрА, рАрС, рАрU, рGrС, рCrС, рUrU (доноры фосфата) и тринуклеозиддифосфаты NpCrС, NpCrU, NpUrС, NpUrU и GrArN (N=U, C, A, G; акцепторы фосфата) использовали в качестве субстратов при изучении субстратной специфичности РНК-лигазы фага Т4. При лигировании с минимальным акцептором (GrUrС) мовонуклеотидных и динуклеотидных доноров оказалось, что динуклеотиды рАрА, рАрС, рАрU эффективнее рАр; динуклеотид рGrС эффективнее рGr; эффективности рCrС и рCr примерно одинаковы; эффективность лигирования с рUrU несколько ниже эффективности сшивки с рUr.

Порядок изменения эффективности динуклеотидных доноров в зависимости от 5'-концевого нуклеотида (при постоянном 3'-концевом нуклеотиде рАрС>рCrС>>рGrС) отличается от установленного для мовонуклеотидных доноров (рCr>рUr≈≈рАр>рGr). Эффекты, наблюдавшиеся для гомоолигомерных субстратов, не могут быть экстраполированы на гетероолигомерные.

Для рационального применения РНК-лигазы фага Т4 (КФ 6.5.1.3) в олигорибонуклеотидном синтезе необходимо знать требования, предъявляемые ферментом к структуре соединяемых субстратов. Изучая влияние нуклеотидной последовательности минимального акцептора фосфата на эффективность межмолекулярного лигирования, мы показали [1], что изменения в одном положении акцептора фосфата нельзя проследить независимо от остальных нуклеотидных остатков и что выход продукта лигирования в существенной степени зависит от строения донора. Доноры фосфата, содержащие пиримидин на 5'-конце, более эффективны, чем рАр, и во всех изученных нами случаях рCr был более эффективен, чем рUr. Эти результаты в основном совпадали с данными, полученными на других примерах [2], хотя в работе [3] сообщалось, что для таких акцепторов, как АрCrС, UrUrС, TrΨrС и UrCrС, наиболее эффективным донором оказался рGr.

В настоящей работе было продолжено систематическое исследование субстратной специфичности РНК-лигазы на примере реакции минимального донора фосфата с минимальным акцептором, а также изучена зависимость эффективности межмолекулярного лигирования от длины донора фосфата и его состава. Для решения первой задачи донором фосфата служил 2' (3'), 5'-дифосфат гуанозина, а акцептором — тринуклеозиддифосфаты типа NpCrС, NpCrU, NpUrС, NpUrU и GrArN. Для выяснения влияния размера донора и его состава были использованы динуклеотиды рАрА, рАрС, рАрU, рGrС, рCrС, рUrU в реакции с акцептором — CrUrС (в отдельных случаях с UrCrС, UrUrС, GrCrU, АрCrС, АрCrU, АрUrС и АрUrU). Реакцию проводили в стандартных условиях [1] при отношении [донор]/[акцептор]=3:1 и концентрации фермента 1000 и 4000 ед. акт./мл. Мерой эффективности реакции служил выход продукта лигирования. Реакционные смеси анализировали микроколоночной хроматографией на сорбенте Partisil 10 SAX (рис. 1) или (в препаративных опытах) хромато-

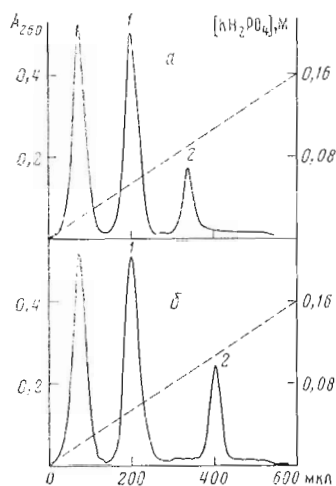


Рис. 1

Рис. 1. Микроколоночная хроматография аликвоты реакционной смеси при синтезе GrUpCrGr (а) и GrUpCrGrC (б) на сорбенте Partisil 10 SAX: пик I — GrUpCr, пик 2 — GrUpCrGr (а) и GrUpCrGrC (б)

Рис. 2. Разделение реакционной смеси, полученной при синтезе UrUpCrUrU, на колонке (0,9×24 см) с DEAE-сефадексом в присутствии 7 М мочевины; объем фракций 9 мл: пик I — UrUpCr, пик II — rUrU, пик III — UrUpCrUrU, пик IV — UrUpCrUrUrUrU

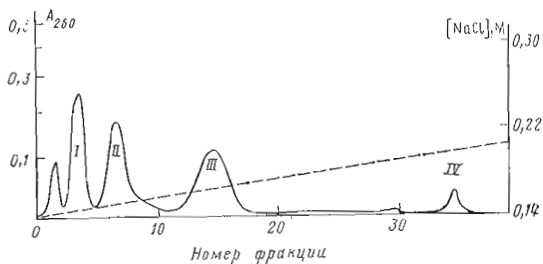


Рис. 2

графией на DEAE-сефадексе в присутствии 7 М мочевины (рис. 2). Идентификацию продукта проводили по положению пика на кривой элюции и по нуклеотидному составу.

В табл. 1 приведены результаты, полученные при изучении влияния нуклеозидов, занимающих различное положение в акцепторе, на выход тетра nukлеотида при взаимодействии pGr с тринуклеозиддифосфатами. Эти данные свидетельствуют о том, что, как и в случае других мононуклеотидных доноров (pCr, pUr, pAr), эффективность присоединения pGr сильно зависит от состава и последовательности нуклеотидных остатков в акцепторе фосфата. Порядок изменения выхода, как правило, отличается от того, что был найден для тех же акцепторов и других pNr [1].

Как и при лигировании pCr, pUr и pAr с акцепторами, содержащими остатки U [1], в случае pGr наличие уридина в акцепторе не является безусловным признаком низкой эффективности последнего [4]. Так, для серии GrArN (см. табл. 1) установлен следующий «порядок предпочтительности»: C ≈ A > U > G; в акцепторах типа NrCrU и NrUrU U ≈ C и только для NrCrC и NrUrU более низкие выходы были получены, когда 5'-концевым остатком был уридин.

Изучая эффективность pGr при сшивании его с акцепторами различного состава, мы нашли, что среди мононуклеотидных доноров pGr действительно наиболее слабый донор, так как для получения выходов продуктов лигирования с pGr, сравнимых с величинами, получаемыми с другими pNr, требуется значительно более высокая концентрация РНК-лигазы (4000 вместо 1000 ед. акт./мл). Однако представляет интерес сравнить «относительную» эффективность * pGr с эффективностью других мононуклеотидных доноров, так как при построении рациональной схемы синтеза фрагментов РНК необходимо учитывать не «концентрационные ограничения», а структурные. Результаты подобного сравнения (табл. 2) различны для разных акцепторов: при использовании в качестве акцептора ArUrU выходы тетра nukлеотидов оказались примерно одинаковыми для доноров pGr и pUr, тогда как с ArUrC близкими по эффективности оказались pAr и pUr, с ArCrU — как pGr и pCr, так и pAr и pUr, с ArCrC — pGr, pCr и pUr, в случае UrUrC порядок эффективности донора pCr >> pUr ≈ pGr ≈ pAr и для UrCrC pCr ≈ pUr >> pAr > pGr, т. е. данные работы [3] не подтверждаются, даже если проводить лигирование с донором pGr при высоких концентрациях фермента.

* Если обычно за меру эффективности субстратов мы принимаем величину выхода продукта лигирования при соблюдении одинаковых условий, то «относительной» эффективностью мы называем величину, полученную при более высокой концентрации фермента.

Влияние нуклеозидов, занимающих различное положение в акцепторе фосфата, на выход тетра nukлеотида при взаимодействии рGr с тринуклеозиддифосфатами в присутствии РНК-лигазы T4 (время реакции 4 ч)

Акцептор	Выход тетра nukлеотида, %	Порядок изменения выхода *
Влияние 3'-концевого нуклеотида		
GpApC	53	C ≈ A > U > G
GpApU	45	
GpApA	51	
GpApG	19	
GpCpC	41	C > U
GpCpU	28	
ApCpC	75	C > U
ApCpU	58	
CpCpC	42	U ≈ C (C > U)
CpCpU	48	
UpCpC	30	U > C (C > U)
UpCpU	45	
GpUpC	37	U ≈ C (U > C)
GpUpU	40	
ApUpC	52	C > U (C > U)
ApUpU	42	
CpUpC	40	C > U (U > C)
CpUpU	33	
UpUpC	38	C > U
UpUpU	28	
Влияние среднего нуклеозидного звена акцептора		
ApCpC	75	C > U (U > C)
ApUpC	52	
ApCpU	58	C > U (U > C)
ApUpU	42	
GpCpC	41	C ≈ U
GpUpC	37	
GpCpU	28	U > C (U > C)
GpUpU	40	
UpCpC	30	U > C
UpUpC	38	
UpCpU	45	C > U
UpUpU	28	
CpCpC	42	C ≈ U (U > C)
CpUpC	40	
CpUpU	33	C > U (U > C)
CpCpU	48	
Влияние 5'-концевого нуклеотида		
ApCpC	75	A > C ≈ G > U (C > A ≈ U > G)
GpCpC	41	
CpCpC	42	
UpCpC	30	
ApCpU	58	A > C ≈ U > G (G > U ≈ A > C)
GpCpU	28	
CpCpU	48	
UpCpU	45	
ApUpC	52	A > C ≈ U ≈ G (A > U > C > G)
GpUpC	37	
CpUpC	40	
UpUpC	38	
ApUpU	42	A ≈ G > C ≈ U (A > G > C > U)
GpUpU	40	
CpUpU	33	
UpUpU	28	

* Для примера в скобках приведены «порядки предпочтительности» для рСр [1].

Зависимость выхода тетра- и пентануклеотида (%) от структуры акцептора

Донор фосфата	Акцептор					
	ArUrU	ArUrC	ArCrU	ArCrC	UrCrC	UrUrC
pGr	42	52	58	75	30	38
pAr	22	62	52	64	40	34
pUr	40	65	50	72	70	40
pCr	91	100	61	75	72	80

Считают, что донорный сайт РНК-лигазы Т₄ узнает только 5'-концевой нуклеотид и не распространяется на область рNp, поэтому выводы относительно эффективности доноров, сделанные на основе исследований с мононуклеотидными донорами, должны быть справедливы для олигомерных доноров: эффективность олигомерного донора определяется 5'-концевым нуклеотидом, соответствуя порядку, установленному для минимальных доноров, и не зависит от длины донора [2, 4–6]. Правомерность этого утверждения уже подвергалась сомнению [7], так как имевшиеся экспериментальные данные свидетельствовали о существенном влиянии соседних с 5'-концевым нуклеотидных остатков и размера донора на его эффективность [8, 9].

В настоящей работе мы изучили лигирование динуклеотидных доноров, в которых меняли 3'-концевой нуклеозид при постоянном 5'-концевом (pArA, pArC, pArU) или 5'-концевой нуклеозид при постоянном 3'-концевом (pArC, pGrC, pCrC и pArU, pUrU) с одним и тем же минимальным акцептором GrUrC. Полученные результаты приведены в табл. 3. Анализ всех приведенных данных показывает, что динуклеотидные доноры, имеющие пуриновый нуклеотид на 5'-конце, более эффективны при сшивании с минимальным акцептором, чем соответствующие мононуклеотидные; выход пентануклеотида GrUrCrCrC практически одинаков с выходом тетра- и пентануклеотида GrUrCrCr, а выход пентануклеотида GrUrCrUrU несколько ниже выхода тетра- и пентануклеотида GrUrCrUr.

Таким образом, в изученных примерах отношение эффективностей динуклеотидного и мононуклеотидного донора неодинаково и зависит от 5'-концевого нуклеозида. Иными словами, размер донора влияет на его эффективность, но влияние это неоднозначно и связано со структурой по крайней мере 5'-концевого нуклеозида.

Порядок изменения эффективности динуклеотидных доноров в зависимости от структуры 5'-концевого нуклеозида не совпадает с тем, который определен для мононуклеотидных доноров: при одинаковом 3'-концевом нуклеозиде (pArC, pGrC, pCrC) эффективность динуклеотидных доноров уменьшается в ряду A>C>G, тогда как для мононуклеотидных доноров мы получили C>U≈A>G (последнее совпадает с литературными данными [2]). Сравнивая результаты лигирования таких доноров, как pAr, pUr и pArU, pUrU, можно видеть, что pArU более эффективен, чем pUrU, тогда как эффективность pAr и pUr при лигировании с GrUrC оказалась одинаковой.

Используя в качестве доноров pGr и pGrC, мы сравнили влияние изменений в нуклеотидном составе акцептора на выход тетра- и пентануклеотида соответственно (табл. 4). Оказалось, что нуклеотидный состав акцептора оказывает влияние в случае мононуклеотидного донора и не влияет, когда донор — динуклеотид. Однако на примере pUrU были получены другие результаты: выход пентануклеотида изменяется в ряду GrUrCr·UrU>GrCrUrUrU>ArCrUrUrU>UrUrCrUrU. Можно предположить, что для успеха реакции лигирования большое значение имеет «подходящее» сочетание нуклеотидного состава обоих субстратов. Этот результат непосредственно связан с ранее сделанным выводом о том, что каждая пара субстратов имеет свой оптимум для сшивки РНК-лигазой Т₄ [7, 10, 11].

Влияние состава и последовательности нуклеотидов в доноре фосфата на выход (%) пента(тетра)нуклеотида при сшивании рNpN' (или рNp) с GrUpC действием РНК-лигазы Т4

Донор фосфата	Время реакции, ч			
	1	2	3	4
рАр	25	35	48	60
рАрА	29	43	63	82
рАрС	32	43	50	81
рАрU	28	36	48	66
рGr	2	5	8	10
рGr *	9	18	27	37
рGrС	6	9	15	20
рGrС *	12	24	33	46
рСр	46	53	60	68
рСрС	42	50	55	65
рUp	37	47	51	60
рUpU	10	20	33	50
рUpU *	16	21	59	80
рUpU **	18	34	53	70

* Концентрация РНК-лигазы Т4 составляла 4000, в остальных случаях 1000 ед. акт./мл.

** Реакцию проводили при 17° С.

Таблица 4

Влияние изменений в нуклеотидном составе акцептора фосфата на выход (%) в реакции лигирования моно- и динуклеотидного донора

Донор фосфата	Акцептор			
	АрСрU	GrСрU	GrUpC	UpUpC
рGr *	58	28	37	—
рGrС	17	20	20	—
рUpU	40	45	50	15
рUpU	—	—	—	30 *

* Концентрация РНК-лигазы Т4 2000, в остальных случаях 1000 ед. акт./мл.

Таким образом, эффекты, наблюдаемые для гомоолигомерных субстратов, не могут быть перенесены на гетероолигомерные субстраты: нуклеотидный состав и последовательность оснований не только в акцепторе, но и в доноре, как и размер последнего, несомненно, влияют на размещение субстрата в активном центре и связывание его с ферментом.

Экспериментальная часть

В работе использовали гуанозин (Reanal, Венгрия), который превращали в 2'(3'),5'-дифосфат по методу [12], дитиотреит, аденилил-(3'-5')-гуанозин (Serva, ФРГ), сорбент Partisil 10 SAX (Whatman, Англия), DEAF-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), poly(A), poly(U), poly(C), АТФ, эндонуклеазу *Serratia marcescens* (НИКТИ БАВ, Бердск), СМ-рибонуклеазу Рb₂ с уд. акт. 0,13 ед. акт./мг [13].

Выделение РНК-лигазы Т4 и синтез тринуклеозиддифосфатов типа NpСрС, NpСрN, NpUpC и NpUpU описаны в работе [1]. Тринуклеозиддифосфаты типа GrApN получали как в работе [14]. рАрА, рСрС и рUpU выделяли из гидролизата соответствующих полинуклеотидов, обработанных эндонуклеазой *S. marcescens* [7].

Динуклеотиды рАрС, рАрU, рGrС синтезировали с СМ-рибонуклеазой

Pb₂ в стандартных условиях: [pN>p]=0,25 M; [акцептор]/[донор]=3; СМ-Pb₂=13-25 мг/мл; 0,2 M фосфатный буфер (рН 7,0); 0° С; время инкубации 72, 65 и 62 ч соответственно. Нуклеотидные компоненты реакционных смесей разделяли, комбинируя электрофорез и хроматографию на бумаге, как описано в работе [15]. Выходы (после выделения и очистки) составили 26, 17 и 15% соответственно.

Синтезы с участием РНК-лигазы Т4 и анализ реакционных смесей проводили в условиях, описанных в работе [1].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Женодарова С. М. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1553-1560.
2. Uhlenbeck O. C., Gumpert R. I. // The Enzymes. V. XVb. N. Y.: Acad. Press, 1982. P. 31-58.
3. Ohtsuka E., Miyake T., Nagao K., Uemura H., Nishikawa S., Sugiura M., Ikehara M. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 3. P. 601-610.
4. Gumpert R. I., Uhlenbeck O. C. // Gene Amplification and Analysis. Analysis of Nucleic Acid Structure by Enzymatic Methods. V. II. North-Holland: Elsevier, 1981. P. 312-355.
5. Moseman McCoy M. I., Gumpert R. I. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 4. P. 635-642.
6. Middleton T., Herlihy W. C., Schimmel P. R., Munro H. N. // Anal. Biochem. 1985. V. 144. № 1. P. 110-117.
7. Женодарова С. М. // Итоги науки и техники. Сер. «Биоорганическая химия». М., 1987. Т. 11.
8. Ohtsuka E., Doi T., Uemura H., Taniyama Y., Ikehara M. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 17. P. 3909-3916.
9. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. // Биоорганич. химия. 1981. Т. 7. № 4. С. 524-533.
10. Uhlenbeck O. C., Kameron V. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 1. P. 85-98.
11. Ohtsuka E., Nishikawa S., Fukumoto R., Tanaka S., Markham A. F., Ikehara M., Sugiura M. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 81. № 2. P. 285-291.
12. Barrio J. R., Barrio M. C. G., Leonard N. J., England T. E., Uhlenbeck O. C. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 11. P. 2077-2081.
13. Соболева И. А., Хабарова М. И., Женодарова С. М. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 1. С. 36-42.
14. Женодарова С. М., Смолянинова О. А., Соболева И. А., Хабарова М. И. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1023-1030.
15. Женодарова С. М., Седельникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И. // Биоорганич. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1516-1521.

Поступила в редакцию
20.V.1988

После доработки
29.VII.1988

SUBSTRATE SPECIFICITY OF T4 RNA LIGASE. THE EFFECT OF SIZE AND NUCLEOTIDE COMPOSITION OF THE PHOSPHATE DONOR ON THE EFFICIENCY OF INTERMOLECULAR LIGATION

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., MAISTRENKO V. F.*, PUSTOSHILOVA N. M.*,
SMOLYANINOVA O. A., SOBOLEVA I. A.

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

Nucleoside 2'(3'),5'-diphosphates, dinucleotides pApA, pApC, pApU, pGpC, pCpC, pUpU (phosphate donors), and trinucleoside diphosphates, such as NpCpC, NpCpU, NpUpC, NpUpU and GpApN (N=U, C, A or G; phosphate acceptors) were used to study the substrate specificity of T4 RNA ligase. Relative efficiency of the mono- and dinucleotide donors depends on the 5'-terminal nucleoside moiety of the dinucleotide: upon ligation with the minimal phosphate acceptor GpUpC, dinucleotides pApA, pApC, and pApU are more effective than nucleotide diphosphate pAp; pGpC is more effective than pGp; efficiencies of pCpC and pCp are almost identical, and efficiency of pUpU is slightly lower than that of pUp. In relative efficiency, dinucleotide donors, varying only in 5'-terminal unit, do not correspond to mononucleotides: pApC>pCpC>pGpC and pCp>pUp≈pAp>pGp. The effects observed for homoooligomeric substrates cannot be extrapolated on heterooligomers.