



УДК 577.113.6 : 577.152.277.04

© 1994 А. Л. Симанов, А. В. Гусаков,
А. П. Сеницын, В. А. Изумрудов

СИНТЕЗ ГОМОПОЛИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИНУКЛЕОТИДФОСФОРИЛАЗЫ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНОГО МИКРООРГАНИЗМА В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИКАТИОНА

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет;
СП «БиоХимМак»

Ключевые слова: полинуклеотидфосфорилаза; поли-N-этил-4-винилпиридиниевый катион синтетический; гомополирибонуклеотиды, синтез, регуляция молекулярно-массового распределения.

Изучено влияние поли-N-этил-4-винилпиридиниевого катиона (ПЭВП) на реакцию синтеза полигуаниловой и полицитидиловой кислот, катализируемую полинуклеотидфосфорилазой (ПНФ) из термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Обнаружена способность ПЭВП функционировать в роли кофактора ПНФ вместо ионов Mg^{2+} . Показано, что присутствие поликатиона в реакционной смеси приводит к изменению характера молекулярно-массового распределения образующихся полирибонуклеотидов, повышая относительное содержание более высокомолекулярных продуктов.

Полинуклеотидфосфорилаза (полирибонуклеотид: ортофосфат—нуклеотидилтрансфераза, КФ 2.7.7.8, ПНФ) катализирует обратимую реакцию синтеза полирибонуклеотидов:

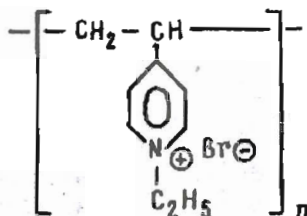


где NDP — нуклеозид-5'-дифосфат; $(NMP)_n$ — полирибонуклеотид со степенью полимеризации n , мономерной единицей которого является нуклеозид-5'-монофосфат; P_i — неорганический ортофосфат.

Синтез таких полинуклеотидов представляет определенный интерес, так как их дуплексы, например $poly(G) \cdot poly(C)$, обладают разнообразной биологической активностью [1, 2], причем эффективность действия дуплексов зависит от размера непрерывных комплементарных участков двуспиральных комплексов. Например, противовирусная активность комплекса $poly(G) \cdot poly(C)$ максимальна, если средняя длина таких участков больше 90 п.о. [3]. Одним из возможных путей увеличения степени конверсии является выведение полимерного продукта из сферы реакции, что должно приводить к сдвигу равновесия (1) вправо. В данной

Адрес для переписки: 119899 Москва, Ленинские горы, МГУ, кафедра химической энзимологии химического факультета, СП «БиоХимМак».

работе мы пытались решить эту задачу с помощью поли-N-этил-4-винилпиридинийбромида (ПЭВП), поликатиона с высокой плотностью заряда:



Как известно, подобные поликатионы образуют с полианионами устойчивые интерполиэлектролитные комплексы [4]. Продукты реакции (1) представляют собой полианионы, заряд которых обусловлен сахарофосфатным остовом. Способность интерполиэлектролитных комплексов находиться в растворимом или нерастворимом состоянии [5, 6] предполагалось использовать для выведения продукта из сферы реакции.

Другим возможным результатом внесения в реакционную среду ПЭВП могло бы стать изменение молекулярно-массового распределения (ММР) синтезируемого полирибонуклеотида, которое, как правило, достаточно широко [7—9]. Так как реакция, катализируемая ПНФ, протекает в щелочной среде (например, синтез полигуаниловой кислоты имеет рН-оптимум около 10,5 [10]), в присутствии катионов Mg^{2+} или Mn^{2+} и при высокой температуре (поскольку используется фермент из термофильного микроорганизма), при длительной инкубации возможна деструкция и сдвиг ММР полимерного продукта в низкомолекулярную область. Такая неспецифическая деструкция образующегося полимера приводит к накоплению продуктов (цепей, содержащих на 3'-конце фосфатную группу [11—13]), ингибирующих фермент [14, 15]. Можно ожидать, что образование интерполимерного комплекса ПЭВП с полинуклеотидом уменьшит скорость деструкции последнего, влияя таким образом на ММР продукта.

Прежде всего следовало выявить принципиальную возможность использования ПЭВП для решения поставленных задач. Для этого исследовали реакционную смесь после синтеза $poly(G)$, содержащую все компоненты, а priori способные к взаимодействию с поликатионом. В нее добавляли раствор ПЭВП и следили за образованием и растворением осадка по мутности среды, фиксируя оптическое пропускание раствора (T_{400}) на длине волны 400 нм. Как видно из рис. 1, добавление ПЭВП приводит к фазовому разделению реакционной смеси, что вызывает уменьшение величины пропускания. Это связано, по-видимому, с образованием в данных условиях нерастворимых комплексов поликатиона с отрицательно заряженными компонентами реакционной смеси. При последующем увеличении ионной силы растворение осадка (и соответственно увеличение пропускания) наблюдается только при концентрациях $NaCl > 0,55 M$, что обусловлено разрушением системы солевых связей в комплексах с ПЭВП [5]. Процесс растворения-осаждения происходит в узком интервале изменения концентрации соли и полностью обратим: разбавление водой гомогенного раствора реакционной смеси, содержащей большую концентрацию $NaCl$ (0,75 M), вновь приводило к фазовому разделению.

Введение поликатиона перед началом ферментативной реакции (1) не увеличивало выход продукта. При этом наблюдалось некоторое снижение степени конверсии низкомолекулярного субстрата как в реакции синтеза $poly(G)$ (рис. 2, 2), так и в реакции синтеза $poly(C)$ (рис. 3, 2). Добавление раствора поликатиона в среду перед началом реакции приводило к образованию осадка (более обильного в случае GDP). Специальные эксперименты по изучению взаимодействия ПЭВП с компонентами реакционной смеси (нуклеотидом, ферментом, полимерным продуктом) показали, что поликатион образует нерастворимые комплексы со всеми этими компонентами. Более интенсивное образование осадка наблюдалось при

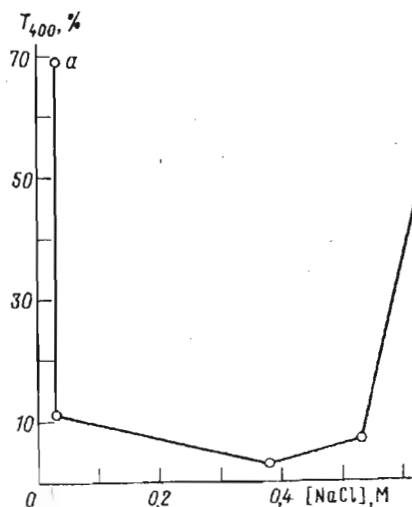


Рис. 1. Зависимость взаимодействия ПЭВП с компонентами реакционной смеси синтеза poly(G) из 5 мМ GDP в присутствии ПНФ (0,85 мг/мл; время реакции 3,5 ч; рН 9,0; 70° С) от концентрации NaCl. Точка «а» соответствует T₄₀₀ смеси в отсутствие ПЭВП. Концентрация ПЭВП эквимолярна концентрации синтезированной poly(G) (1,4 мМ)

комплексообразовании ПЭВП с GDP, имеющим в молекуле относительно гидрофобную группу пуринового основания гуанина, по сравнению с комплексом ПЭВП — CDP. Это указывает на то, что в стабилизации комплексов ПЭВП с низкомолекулярными субстратами большую роль играют помимо электростатических и гидрофобные взаимодействия. Проведение реакции в условиях, исключающих образование нерастворимого комплекса поликатиона с GDP (например, в присутствии 0,25 М NaCl), также вызывало снижение выхода. Разумно полагать, что наблюдаемое снижение степени конверсии субстрата в реакции полимеризации GDP и CDP, проводимой в этих условиях, связано с иммобилизацией различных форм фермента на цепях поликатиона и возникающими при этом диффузионными затруднениями.

Обнаружено, что синтез poly(G) и poly(C) в присутствии ПЭВП может осуществляться и в отсутствие ионов Mg²⁺, хотя и с низкой начальной скоростью и невысоким выходом (рис. 2 и 3, кинетические кривые 3). Это свидетельствует о том, что синтетический поликатион может играть роль кофактора фермента. До сих пор в роли кофакторов ферментов метаболизма нуклеиновых кислот и их компонентов рассматривались только катионы металлов [16—19]. Можно полагать, что положительно заряженная цепь ПЭВП стабилизирует нуклеопротеидный комплекс, образующийся в ходе реакции, катализируемой ПНФ [20—22], снижая электростатическое отталкивание фосфатных групп нуклеотида и синтезируемого полимера. Ранее отмечалось возможное участие природных поликатионов, например основных олиго- и полипептидов, в ферментативной реакции, катализируемой ПНФ [13, 23, 24].

Анализ ММР полимерных продуктов, синтезированных в отсутствие и в присутствии ПЭВП, осуществлялся с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Соответствующие денситограммы пластин геля после электрофореза приведены на рис. 4а для случая poly(G) и рис. 4б — для poly(C). Для сравнения показано положение на пластине геля рибосомных РНК *Escherichia coli*. Следует заметить, что в данном случае не удастся анализировать полинуклеотиды длиной около 90 и менее мономерных остатков. Как видно из рис. 4а,б, ММР полинуклеотидов, полученных в результате ферментативной реакции, достаточно широкое, при этом относительная доля высокомолекулярной фракции заметно выше в случае, когда реакция проводилась в присутствии ПЭВП (денситограммы 2, 3). Этот эффект более заметно выражен для poly(G) (рис. 4а). По-видимому, в системе происходит связывание ПЭВП преимущественно с более длинными цепями образующегося полирибо-

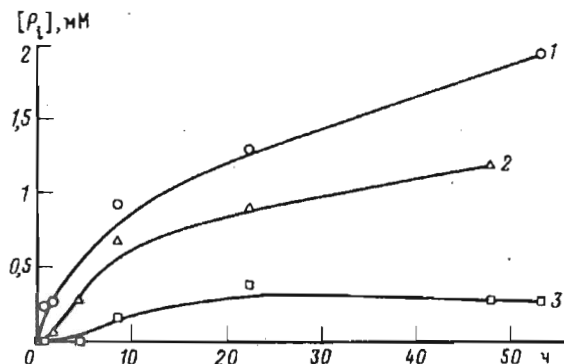


Рис. 2. Накопление фосфата в ходе реакции полимеризации 15 мМ GDP, катализируемой ПНФ (рН 9,4; 70° С), в отсутствие (1) и в присутствии 2,6 мМ ПЭВП (2, 3). [MgCl₂] 0 (3) и 7,2 мМ (1, 2)

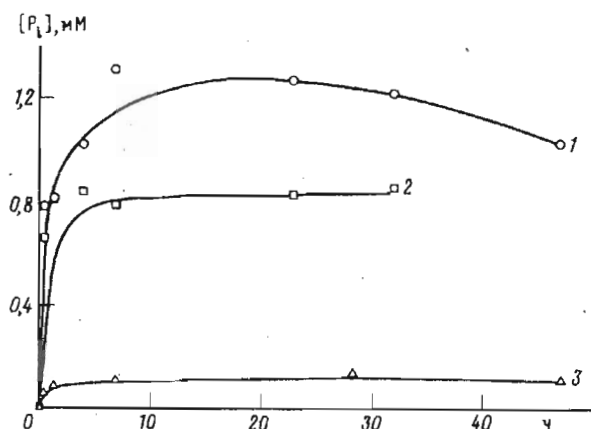


Рис. 3. Накопление фосфата в ходе реакции полимеризации 9,7 мМ CDP, катализируемой ПНФ (рН 9,0; 70° С), в отсутствие (1) и в присутствии 2,6 мМ ПЭВП (2, 3). [MgCl₂] 0 (3) и 3,2 мМ (1, 2)

нуклеотида и накопление их в осадке в виде нерастворимого интерполимерного комплекса. Можно полагать, что стабильность полирибонуклеотидов при образовании их комплексов с поликатионом растёт.

Таким образом, несмотря на то что при ферментативном синтезе полирибонуклеотидов в присутствии ПЭВП не удастся повысить общий выход полимерного продукта за счёт сдвига равновесия ферментативной реакции, участие поликатиона в реакции изменяет характер ММР образующегося полирибонуклеотида с увеличением относительного содержания более высокомолекулярного продукта. Кроме того, использование ПЭВП позволяет, в принципе, проводить ферментативный синтез в отсутствие ионов Mg²⁺.

Экспериментальная часть

В работе использовали очищенный препарат ПНФ из термофильной бактерии *Thermus thermophilus* (НПО «Биолар», Латвия). Концентрацию белка и содержание нуклеиновых кислот определяли по соотношению поглощения раствора фермента на длинах волн 280/260 нм по методу, описанному Е. Layne [25], на спектрофотометре «PU 8630» (Philips, Англия). За единицу активности принимали количество фермента, обеспечивающее выделение 1 мкмоль неорганического фосфата (P_i) при полимеризации аденозин-5'-дифосфата (ADP, 20 мМ) за 1 мин

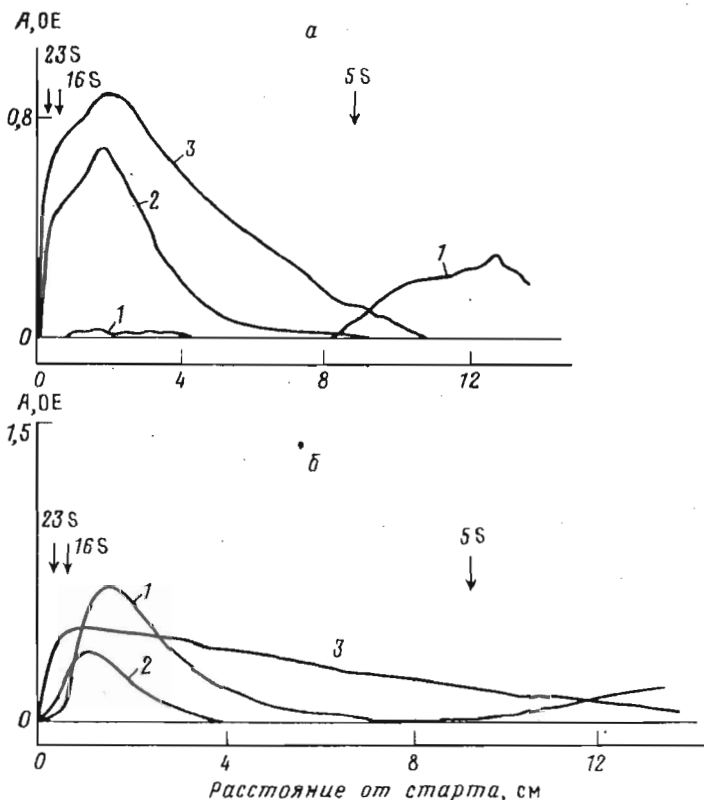


Рис. 4. Денситограммы пластин ПААГ после электрофореза полирибонуклеотидов poly(G) (а) и poly(C) (б), синтезированных в присутствии ПНФ в растворах, содержащих 2,6 мМ ПЭВП (2, 3), и без ПЭВП (1), через 53 ч инкубации в отсутствие (3) и в присутствии MgCl₂ (1, 2). а: [GDP] 15 мМ, [MgCl₂] 7,2 мМ; б: [CDP] 9,7 мМ, [MgCl₂] 3,2 мМ. Стрелками обозначено положение на пластине маркерных рибосомных РНК из *E. coli* (23S, 16S, 5S).

при рН 8,1 и 70° С. При определении активности реакцию останавливали, добавляя равный объем 5% НСlO₄, реакционную смесь центрифугировали 5 мин при 6500 об/мин на микроцентрифуге и в супернатанте определяли количество выделившегося фосфата по модифицированной методике [26].

Гуанозин-5'-дифосфат (GDP), ADP, цитидин-5'-дифосфат (CDP) производства НИО «Биолар» содержали не менее 98% основного вещества.

Использовали ПЭВП, который получали исчерпывающим алкилированием бромистым этилом фракции поли-4-винилпиридина, со средневесовой степенью полимеризации $P_w = 300$ [27]. Концентрацию ПЭВП выражали в молярности мономерных остатков.

Кинетические эксперименты по синтезу poly(C) и poly(G) проводили при 70° С в 50 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 1 мМ EDTA, при оптимальных значениях рН и концентрации MgCl₂ [10]. Использовали фермент с содержанием нуклеиновых кислот 0,5%, концентрация белка в реакционной смеси составляла 0,04 мг/мл. Ход реакции оценивали по накоплению в среде неорганического фосфата по схеме, аналогичной способу определения активности.

ММР высокомолекулярных фракций poly(G) и poly(C) анализировали методом электрофореза в ПААГ. Электрофорез проводили в градиенте ПААГ от 4 до 16% в присутствии 8 М мочевины, используя 0,1 М трис-боратный буфер, рН 8,3, содержащий 4 мМ EDTA. В пробы, отобранные в ходе реакции, вносили поливинилсульфат калия (ПВСК) до конечной концентрации, эквиволярной

концентрации ПЭВП. Пробы инкубировали 1 сут при 4 °С, центрифугировали 2 мин при 1500 об/мин на микроцентрифуге. Контрольный эксперимент показал, что в таких условиях ПВСК практически полностью замещает прочие лиганды и образует с ПЭВП нерастворимый комплекс, причем сосаждения полинуклеотида, а также изменений в его ММР при этом не происходит. Супернатант обессоливали на биогеле Р-2 (Bio-Rad, США), лиофилизовали и растворяли в 6 мкл стартового буфера (электродный буфер, разбавленный в 10 раз и содержащий бромфеноловый синий, 25% глицерина и 8 М мочевины). Перед нанесением на гель пробы выдерживали 2 мин при 70° С, а пластину геля прогревали 30—40 мин, пропуская ток при постоянном напряжении 70 В. По окончании процесса электрофореза пластины геля окрашивали серебром [28], высушивали и сканировали на видеоденситометре фирмы Bio-Rad (США), модель 620, используя нейтральный светофильтр. 23S, 16S, 5S РНК *E. coli* предоставлены А. Г. Балакиным (кафедра химии природных соединений химического факультета МГУ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вильнер Л. М., Тимковский А. Л., Тихомирова-Сидорова Н. С.//Итоги науки и техники. Сер. «Вирусология». 1977. Т. 6. С. 114—159.
2. Цанов Ц.//Проблемы онкологии. 1986. Т. 14. № 1. С. 55—58.
3. Сидорова Н. С., Коган Э. М., Платонова Г. А., Дятлова Н. Г.//Синтез, структура и свойства полимеров/Ред. М. М. Котон. Л.: Наука, 1989. С. 214—218.
4. Харенко О. А., Харенко А. В., Касакин В. А., Зезин А. Б., Кабанов В. А.//Высокомолекуляр. соединения. 1979. Т. А21. № 12. С. 2726—2733.
5. Марголин А. Л., Изумрудов В. А., Шерстюк С. Ф., Зезин А. Б., Швабас В. К.//Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. Вып. 5. С. 1001—1008.
6. Кабанов В. А., Мустафаев М. И.//Высокомолекуляр. соединения. 1981. Т. А23. № 2. С. 255—260.
7. Тимковский А. Л., Аксенов О. А., Бреслер С. Е., Коган Э. М., Смородиных А. В., Тихомирова-Сидорова Н. С.//Вопр. вирусологии. 1973. № 3. С. 350—355.
8. Kikuchi Y., Hirai K., Hishinuma F., Sakaguchi K.//Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 476. № 4. P. 287—294.
9. Sulewski M., Marchese-Ragona S. P., Johnson K. A., Benkovic S. J.//Biochemistry. 1989. V. 28. № 14. P. 5855—5864.
10. Гусаков А. В., Симанов А. Л., Беккер Е. Г., Сеницын А. П.//Вестн. МГУ. 1991, Сер. 2. Химия. Т. 32. № 5. С. 523—526.
11. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978. С. 203, 371.
12. Marzilli L. G., Kistenmacher T. J.//Nucleic Acid — Metal Ion Interactions. V. 1. Ser. «Metal Ions in Biology»/Ed. T. G. Spiro. N. Y.—L.: Wiley-Interscience, 1980. P. 180—250.
13. Fitt P. S., Wille H.//Biochem. J. 1969. V. 112. № 4. P. 497—503.
14. Grunberg-Manago M.//J. Mol. Biol. 1959. V. 1. № 1. P. 240—253.
15. Singer M. F.//J. Biol. Chem. 1958. V. 232. № 5. P. 211—228.
16. Прангшвили Д. А., Библиашвили П. Ш.//Успехи биол. химии. 1979. Т. 20. С. 5—26.
17. Loeb L. A., Zakour R. A.//Nucleic Acid — Metal Ion Interactions (V. 1 in «Metal Ions in Biology» ser.)/Ed. T. G. Spiro. N. Y.—L.: Wiley-Interscience, 1980. P. 116—144.
18. Mildvan A. S.//Magnesium. 1987. V. 6. № 1. P. 28—33.
19. Godefroy-Colburn T., Grunberg-Manago M.//The Enzymes, 3rd. V. 7/Ed. P. D. Boyer. N.Y.—L.: Acad. Press, 1972. P. 533—574.
20. Godefroy T.//Eur. J. Biochem. 1970. V. 14. № 2. P. 222—231.
21. Chou J. Y., Singer M. F.//J. Biol. Chem. 1970. V. 245. № 5. P. 1005—1011.
22. Thang M. N., Harvey R. A., Grunberg-Manago M.//J. Mol. Biol. 1970. V. 53. № 2. P. 261—280.
23. Fitt P. S., Dietz G. W., Jr., Grunberg-Manago M.//Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 151. № 1. P. 99—113.
24. Fitt P. S., Wille H.//Biochem. J. 1969. V. 112. № 4. P. 489—495.
25. Warburg O., Christian W.//Meth. Enzymol./Eds S. O. Colowick, N. O. Kaplan. N. Y.—L.: Acad. Press, 1957. V. 3. P. 447—454.
26. Leloir L. F., Cardini C. E.//Meth. in Enzymol. V. 3/Eds S. O. Colowick, N. O. Kaplan. N. Y.—L.: Acad. Press, 1957. P. 840—850.

27. Fuoss R. M., Strauss U. P.//J. Polym. Sci. 1948. V. 3. № 2. P. 246—263.
28. Merril C. R., Goldman D., Sedman S. A., Ebert M. H.//Science. 1981. V. 211. № 4489.
P. 1437—1438.

Поступила в редакцию
7.IX.1993

После доработки
18.II.1994

A. L. Simanov, A. V. Gusakov, A. P. Sinitsyn, V. A. Izumrudov

**SYNTHESIS OF HOMOPOLYRIBONUCLEOTIDES USING
POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE FROM A THERMOPHILIC
MICROORGANISM IN THE PRESENCE OF SYNTHETIC POLYCATION**

*Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University,
«BioChemMack» Joint Venture, Moscow*

Key words: polynucleotide phosphorylase, poly-N-ethyl-4-vinylpyridine cation, homopolyribonucleotides, synthesis, regulation of molecular weight distribution.

The effect of the poly-N-ethyl-4-vinylpyridine cation (PEVP) on the synthesis of polyguanylic and polycytidylic acids catalyzed by polynucleotide phosphorylase (PNP) from *Thermus thermophilus* was studied. An ability of PEVP to play a role of PNP's cofactor instead of Mg^{2+} was found. The presence of PEVP led to changes in the molecular weight distribution of the synthesized polyribonucleotides resulting in a higher content of heavier high-molecular products.