



УДК 577.152.361\*1.04:577.113.3

## ВЛИЯНИЕ АНАЛОГОВ ПИРОФОСФАТА НА АКТИВНОСТЬ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ *E. coli*

© 2002 г. Н. Ф. Закирова<sup>#</sup>, А. В. Иванов, Ю. С. Скоблов, М. К. КухановаИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,  
119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 08.08.2001 г. Принята к печати 22.11.2001 г.

Изучено влияние аналогов неорганического пирофосфата на ферментативную активность неорганической пирофосфатазы *E. coli*. Показано, что гипофосфорная и дифосфористая кислоты ингибируют неорганическую пирофосфатазу, в то время как пирофосфористая кислота практически не влияет на гидролиз неорганического пирофосфата.

Ключевые слова: аналоги пирофосфата, неорганическая пирофосфатаза *E. coli*.

### ВВЕДЕНИЕ

ДНК-полимеразы осуществляют реакцию элонгации цепи ДНК, катализируя образование фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой 3'-концевого нуклеотида растущей цепи ДНК и α-фосфатным остатком dNTP. Эта реакция обратима и для большинства ДНК-полимераз описана реакция пирофосфоролита, т.е. образование dNTP в присутствии неорганического пирофосфата (PP<sub>i</sub>) с одновременным укорачиванием цепи ДНК [1].

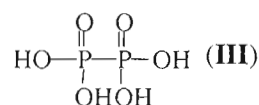
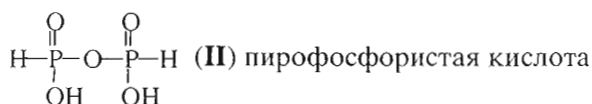
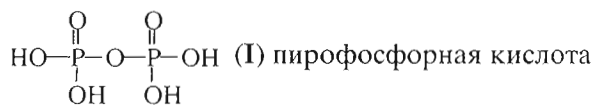
В ряде работ исследована зависимость действия аналогов PP<sub>i</sub> от их структуры на активность ДНК-полимераз и на репликацию вирусов [2–8]. Некоторые аналоги неорганического пирофосфата ингибируют ДНК- и РНК-полимеразы [4–8]. Фосфономуровиновая и фосфоноуксусная кислоты, которые можно рассматривать как аналоги неорганического пирофосфата, являются препаратами с широким спектром противовирусной активности [9]. Интерес к аналогам неорганического пирофосфата связан также с недавно опубликованной гипотезой о существенном вкладе пирофосфоролита в возникновение резистентности вируса иммунодефицита человека к таким нуклеозидным аналогам, как 3'-дезоксизидо-рибозилтимин и 3'-дезоксизидо-2',3'-дегидро-рибозилтимин [10, 11].

Таким образом, аналоги неорганического пирофосфата могут быть полезными как для изучения ферментов метаболизма нуклеиновых кислот, так и в вирусологических исследованиях.

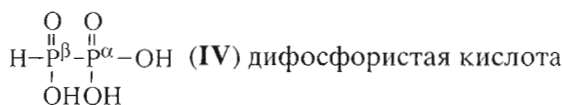
В нашей лаборатории продолжается изучение реакций элонгации и пирофосфоролита, катализируемых ДНК-полимеразой из различных источников. В данной работе нами были синтезированы аналоги неорганического пирофосфата и изучено их влияние на неорганическую пирофосфатазу из *E. coli* (ЕРР-аза, КФ 3.6.1.1).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы синтезировали пирофосфористую (II), гипофосфорную (III) и дифосфористую (IV) кислоты. В молекулах гипофосфорной и дифосфористой кислот расстояние между атомами фосфора составляет 2.19 Å, что на 27% меньше, чем в молекуле неорганического пирофосфата. Изменение расстояния между атомами может повлиять на субстратные свойства данных аналогов как в реакции пирофосфоролита, так и на взаимодействие с ЕРР-азой.



гипофосфорная (фосфорноватая) кислота



Сокращения: ЕРР-аза – неорганическая пирофосфатаза *E. coli*; PP<sub>i</sub> – пирофосфорная кислота (неорганический пирофосфат); P<sub>i</sub> – ортофосфорная кислота (ортофосфат).

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-65; эл. почта: chemov@imb.imb.ac.ru).

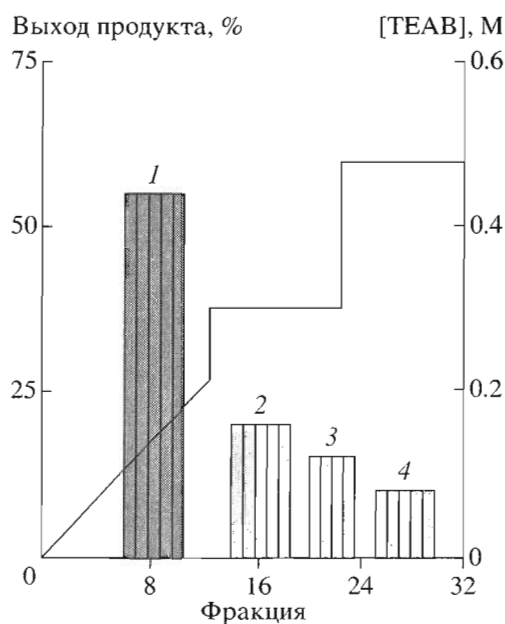


Рис. 1. Профиль элюции и выход продуктов реакции: 1 – смесь фосфорных кислот; 2 – гипофосфорная кислота (20%); 3 – пирофосфорная кислота (15%); 4 – дифосфористая кислота (10%).

Фосфонистый фрагмент соединений (II) и (IV) представляет собой однозарядный сильно сплюснутый тетраэдр, который может моделировать плоскую карбоксильную группу биологически активных фосфономуравьиной и фосфоноксусной кислот (см. схему). Поэтому можно предположить, что соединения (II) и (IV) способны проявлять биологическую активность.

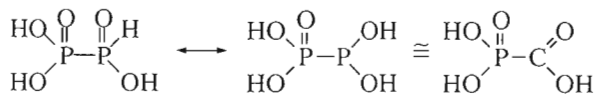


Схема.

Пирофосфористая кислота была синтезирована по методу [12]. Для синтеза гипофосфорной кислоты (III) использовали метод, описанный ранее [13, 14] и заключающийся в окислении красного фосфора в щелочной среде. В результате реакции наряду с желаемым соединением (III) образуется смесь фосфорных кислот, таких, как ортофосфорная  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , фосфорноватистая  $\text{H}_3\text{PO}_2$ ,

фосфористая  $\text{H}_3\text{PO}_3$ , а также пирофосфорная кислота  $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (I). Предложенный в литературе метод синтеза дифосфористой кислоты (IV) представляет собой гидролиз тригалогенида фосфора [15, 16]. Однако данная кислота (IV) была нами получена в качестве побочного продукта при синтезе гипофосфорной кислоты (III).

Описанный в литературе метод очистки веществ (III) и (IV), заключающийся в использовании бариевых солей, не позволяет получить соединения (III) и (IV) с достаточной степенью чистоты, поскольку происходит соосаждение как гипофосфата, так и дифосфита. Для очистки данных соединений нами была использована ионообменная хроматография.

При синтезе гипофосфат и дифосфит ((III) и (IV) соответственно) получаются в виде калиевых солей. Для их перевода в  $\text{NH}_4^+$ -форму, которая облегчает дальнейшую работу с данными соединениями, а также нейтрализации сильно щелочной среды (pH реакционной среды 13) использовали колонку с дауэксом 50 ( $\text{NH}_4^+$ ). Разделение соединений (III) и (IV) и их очистку от ортофосфорной  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , фосфорноватистой  $\text{H}_3\text{PO}_2$  и фосфористой  $\text{H}_3\text{PO}_3$  кислот производили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефадексом А-25. Разделение проводили в градиенте концентраций ТЕАВ (0–0.5 М, pH 7.5), собирая фракции по 30 мл. Так как данные аналоги не поглощают в УФ-области, содержание продуктов в каждой фракции определяли с помощью ТСХ с последующим прожиганием пластинок при 150–170°C. Профиль элюции и выход веществ представлены на рис. 1. Ортофосфорная  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , фосфорноватистая  $\text{H}_3\text{PO}_2$  и фосфористая  $\text{H}_3\text{PO}_3$  кислоты (пик 1) элюируются с колонки 0.12 М ТЕАВ, гипофосфорная кислота (пик 2) – 0.3 М, пирофосфорная (пик 3) – 0.3–0.4 М ТЕАВ и последней элюируется дифосфористая кислота (пик 4) при концентрации ТЕАВ 0.5 М. Следует отметить, что при очистке некоторые фракции, содержащие аналоги неорганического пирофосфата (III) и (IV), содержали следовые количества пирофосфорной кислоты (I).

Структура всех синтезированных соединений была доказана  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрами (таблица).

Нами было изучено влияние синтезированных аналогов на ферментативную активность неорганической пирофосфатазы.

Неорганическая пирофосфатаза *E. coli* является гомогексамером и описывается как димер тримеров. Фермент гидролизует пирофосфорную кислоту до ортофосфата, обеспечивая в клетке соотношение  $PP_i/P_i$ , необходимое для эффективного синтеза важнейших нуклеиновых кислот. Каталитический процесс протекает при связыва-

ЯМР-Характеристика соединений (I)–(IV)

Аналог	$\delta$ , м.д.	$J$ , Гц
(I)	–6.67 с	–
(II)	–4.62 дт	667 (P–H)
(III)	10.28 с	–
(IV)	30.51 дд; 11.09 дд	306 (P–P); 330 (P $^\alpha$ –H); 8.5 (P $^\beta$ –H)

нии в активном центре фермента 3–4 ионов двухвалентных металлов, среди которых наиболее эффективным является  $Mg^{2+}$  [17–19]. Вполне вероятно, что данный фермент можно использовать и для очистки фракций соединений (III) и (IV), загрязненных пирофосфорной кислотой.

Для выяснения влияния эффекта синтезированных аналогов (II)–(IV) на ЕРР-азу нами была изучена скорость гидролиза пирофосфата в их присутствии. Изучение данной ферментативной реакции проводили с использованием  $[^{32}P]$ пирофосфата. Введение радиоактивной метки позволяет количественно и с высокой чувствительностью и специфичностью контролировать протекающие процессы. Колориметрические методы определения неорганического ортофосфата [20] в нашем случае не позволяют достаточно точно контролировать ферментативную реакцию, так как синтезированные аналоги (II)–(IV) могут содержать примеси ортофосфата, нерегистрируемые  $^{31}P$ -ЯМР, и, следовательно, могут искажать результаты эксперимента.

На рис. 2 представлен радиоавтограф гидролиза  $^{32}P$ -меченого неорганического пирофосфата в присутствии соединений (I)–(IV) при инкубации реакционной смеси в течение 1 ч. Дорожка (1) представляет собой аликвоту реакционной среды без добавления фермента (контроль). Дорожка (2) показывает, что в данных условиях ферментативная реакция гидролиза пирофосфата в отсутствие синтетических аналогов протекает на 40%. Введение в реакционную среду гипофосфорной кислоты (III) существенно замедляет ферментативную реакцию (дорожка 3). Гидролиз неорганического пирофосфата в присутствии дифосфористой кислоты (IV) практически полностью прекращается (дорожка 4). Аналог (II) – пирофосфористая кислота – не оказывает видимого влияния на ферментативный гидролиз неорганического пирофосфата (дорожка 5). Как и следовало ожидать, введение в реакционную среду нерадиоактивного неорганического пирофосфата в той же концентрации (1.26 мМ) (изотопное разбавление), что и синтетических аналогов (II)–(IV), также снижает скорость накопления ортофосфата (дорожка 6).

Из рис. 3 видно, что введение в реакционную среду пирофосфористой кислоты (II) (1.26 мМ) практически не снижает скорость ферментативной реакции (кривая 2). При концентрации данного аналога 8.4 мМ скорость гидролиза снижается всего на 10% (кривая 3). В присутствии гипофосфорной кислоты (III) в концентрации 1.26 мМ скорость гидролиза неорганического пирофосфата падает почти в два раза (кривая 4). Введение дифосфористой кислоты (IV) в той же концентрации практически полностью ингибирует фер-

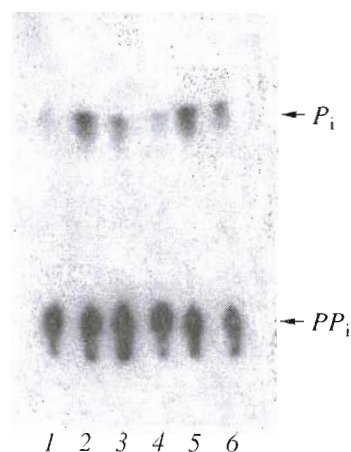


Рис. 2. Радиоавтограф реакционной смеси гидролиза  $[^{32}P]$ пирофосфата ЕРР-азой ( $40.5 \times 10^{-6}$  ед. акт./мл). Реакционная смесь без добавления фермента (1, контроль); в отсутствие аналогов (I)–(IV) (2); в присутствии 1.26 мМ аналогов: (III) – (3); (IV) – (4); (II) – (5); (I) – (6, изотопное разведение). Состав реакционной смеси см. “Эксперимент. часть”; инкубация 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ .

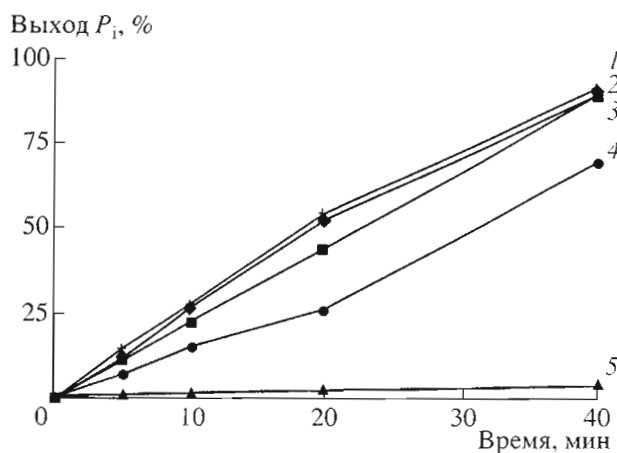


Рис. 3. Кинетические кривые гидролиза неорганического пирофосфата (0.42 мМ) ЕРР-азой ( $81 \times 10^{-6}$  ед. акт./мл) в отсутствие синтетических аналогов (1) и в присутствии: пирофосфита (II) в концентрации 1.26 (2) и 8.4 мМ (3), 1.26 мМ гипофосфата (III) – (4), 1.26 мМ дифосфита (IV) – (5). Реакционная смесь содержит компоненты, указанные в “Эксперимент. части”.

ментативную реакцию (кривая 5): за 40 мин глубина прохождения реакции составляет около 4%.

Таким образом, мы показали, что пирофосфористая кислота (II) практически не оказывает влияния на скорость ферментативного процесса, несмотря на то, что по своим геометрическим параметрам (длины связей и углы связей) наиболее близка к природному неорганическому пирофосфату. В то же время гипофосфорная (III) и дифосфористая (IV) кислоты, сильно отличающиеся

по своим геометрическим параметрам от молекулы природного неорганического пирофосфата, оказывают ингибирующее действие на ЕРР-азу. Такое снижение активности не может быть связано с полным выводом из реакционной среды ионов  $Mg^{2+}$ . В реакционной смеси содержится 1.26 мМ дифосфористая кислота, и, даже если вся она образует комплекс с  $Mg^{2+}$ , концентрация  $MgCl_2$  в смеси (4 мМ) достаточна для прохождения ферментативной реакции. Различное поведение исследованных аналогов пирофосфата связано, по-видимому, с их различной электронной структурой и разной способностью образовывать водородные и координационные связи [21].

Из результатов экспериментов видно, что неорганическая пирофосфатаза может быть использована для очистки гипофосфорной кислоты (III) от примесей пирофосфата. Однако это возможно лишь при большом избытке фермента, так как кислота (III) при высокой концентрации частично ингибирует ЕРР-азу. Ферментативная очистка от неорганического пирофосфата дифосфористой кислоты (IV) не представляется возможной из-за сильного ингибирования ею фермента.

Таким образом, нами было изучено влияние синтезированных аналогов неорганического пирофосфата на его гидролиз ЕРР-азой. Было показано, что пирофосфористая кислота не ингибирует фермент, в то время как гипофосфорная и дифосфористая кислоты заметно подавляют ферментативную активность.

В настоящее время изучается активность соединений в реакции пирофосфоролиза, катализируемого ДНК-полимеразами и обратной транскриптазой вируса иммунодефицита человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали фосфор красный технический, NaOH, KOH,  $H_2O_2$ , пирофосфорную кислоту (Реахим, Россия), НЕРЕС (*N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N'*-этансульфоновая кислота)-NaOH (рН 8.5), фосфористую кислоту и уксусный ангидрид (Fluka, Швейцария), рентгеновскую пленку Stonex (Sterling Diagnostic Imaging, Inc., США). Все соли отечественного производства категории "ос.ч.". [ $^{32}P$ ]пирофосфат с молярной активностью 1000 Ки/ммоль производства Физико-энергетического института РАН (Обнинск, Россия). ЕРР-аза с активностью 1000 ед. акт./мг была любезно предоставлена С.А. Куриловой (лаборатория проф. С.М. Аваевой, НИИФХБ, МГУ). Колоночную хроматографию осуществляли на ионообменных смолах дауэкс 50 × 8 (Sigma, США) и DEAE-сефадекс А-25 (Aldrich, США). Спектры  $^{31}P$ -ЯМР регистрировали на спектрометре АМХ III-400 (Bruker) с рабочей частотой 162 МГц при темпера-

туре 27°C в  $D_2O$  (внешний стандарт – 85% ортофосфорная кислота).

ТСХ проводили на пластинках Silufol (UV 254, Kavalier, Чехия) в системе *t*BuOH–EtOH–25%  $NH_4OH$ – $H_2O$  (15 : 19 : 0.3 : 22.5) (система А) и PEI-Cellulose F (Merck, Германия) в 0.5 М  $K_2HPO_4$ -буфере (рН 4.0) (система Б) с обнаружением веществ прокаливанием пластинок при 150–200°C.

**Гидролиз неорганического [ $^{32}P$ ]пирофосфата** неорганической пирофосфатазой *E. coli* осуществляли при 37°C в 19 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ НЕРЕС, 4 мМ  $MgCl_2$ , 0.42 мМ нерадиоактивный пирофосфат, [ $^{32}P$ ]пирофосфат с объемной активностью 2 мКи/мл, ЕРР-азу (концентрацию ЕРР-азы смотри в подписях к рисункам) и аналог (II), (III) или (IV). В процессе реакции отбирали пробы по 1 мкл через 5, 10, 20, 40 и 60 мин. Продукты реакции анализировали хроматографией на PEI-Cellulose (Merck) в системе Б с последующей экспозицией с рентгеновской пленкой. Автограф совмещали с хроматограммой и зоны, содержащие  $^{32}P$ -меченые ортофосфат и пирофосфат, вырезали и просчитывали в сцинтилляционном счетчике.

**Гипофосфорная (III) и дифосфористая (IV) кислоты.** Красный фосфор (10 г, 0.32 ммоль) промывали водой до рН 7, суспендировали в 50 мл воды и добавили KOH (25.3 г, 0.45 ммоль). Реакционную массу охладили, после чего при охлаждении добавили 3%  $H_2O_2$  (200 мл). Через 4 ч реакционную массу отфильтровали от непрореагировавшего красного фосфора, фильтрат пропустили через дауэкс 50 ( $NH_4^+$ ) (40 × 140 мм), вещества элюировали водой. Элюат упарили, переупарили с водой (2 × 50 мл) и хроматографировали на DEAE-сефадексе А-25 (30 × 260 мм), вещества элюировали в линейном градиенте концентраций ТЕАВ (рН 7.5, 0 → 0.2 М, общий объем 420 мл) с последующей элюцией 0.3 и 0.5 М ТЕАВ (210 и 310 мл соответственно). В процессе элюции собирали фракции по 30 мл, анализировали их с помощью ТСХ в системе А. Фракции, содержащие целевые вещества, объединили, упарили, переупарили с водой (3 × 40 мл) и лиофилизировали. Выход гипофосфорной кислоты 200, дифосфористой кислоты 22 мг.

**Пирофосфористая кислота (II).** К водному раствору (100 мл) фосфористой кислоты (8.4 г, 0.1 моль) добавили NaOH (4 г, 0.1 моль), раствор перемешивали 10 мин при комнатной температуре, полученный фосфит натрия лиофилизировали. К смеси лиофилизата и фосфористой кислоты (8.4 г, 0.1 моль) добавили уксусный ангидрид (135 мл), реакционную массу перемешивали при комнатной температуре 1 ч, после чего обрабатывали ультразвуком в течение 3 ч. Выпавший осадок отфильтровали и перекристаллизовали из смеси этанол–вода (65 : 95). Выход 11.1 г.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность С.А. Куриловой (МГУ) за предоставление фермента, В.П. Тимофееву за помощь в идентификации полученных соединений, а также Л.А. Александровой (Институт молекулярной биологии РАН) за проявленный интерес к данной работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 02-04-48951) и МНТЦ (проект 1989).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg A. DNA Replication. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1980.
2. Розовская Т.А., Тарусова Н.Б., Минасян Ш.Х., Атражев А.М., Куханова М.К., Краевский А.А., Чиджевадзе З.Г., Библиашвили Р.Ш. // Молекулярная биология. 1989. Т. 23. С. 862–871.
3. Rozovskaya T., Tarusova N., Minassian S., Atrazhev A., Kukhanova M., Kravetsky A., Chidgevadze Z., Beablashvili R. // FEBS Lett. 1989. V. 27. P. 289–292.
4. Eriksson B., Larsson A., Helgstrand E., Johansson N.-G., Oberg B. // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 607. P. 53–64.
5. Eriksson B., Oberg B., Wahren B. // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 696. P. 115–123.
6. Andreeva O.I., Paduykova N.S., Efimtseva E.V., Mikhailov S.N., Kochetkov S.N., Karpievsky M.Ya. Current Problems of Molecular Genetics and Cell Biology. Simp. Moscow, 2000. P. 168–181.
7. Rodrigues C.O., Scott D.A., Bailey B.N., Souza W., Benchimol M., Moreno B., Urbina J.A., Oldfield E., Morena S.N.J. // Biochem. J. 2000. V. 349. P. 737–745.
8. Gordon-Weeks R., Parmar T.G., Davies E., Leigh R.A. // Biochem. J. 1999. V. 349. P. 737–745.
9. Vrang L., Oberg B. // Antimicrob. Agents Chemother. 1986. V. 29. P. 867–872.
10. Meyer P.R., Matsuura S.E., So A.G., Scott W.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13471–13476.
11. Meyer P.R., Matsuura S.E., Schinazi R.F., Scott W.A. // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 3465–3472.
12. Yamamoto Y., Baba Y., Mizokushi M., Onoe M., Sumiyama T., Tsubako M., Yoza N., Ohashi S. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1988. V. 61. P. 3217–3223.
13. Vogel F. // Angew. Chem. 1929. V. 42. P. 263.
14. Руководство по препаративной неорганической химии: Пер. с нем. М.: ИЛ, 1956.
15. von Thilo E., Heinz D. // Chemie Band. 1955. V. 281. P. 303–321.
16. Ван Везер. Фосфор и его соединения: Пер. с англ. М.: ИЛ, 1962. С. 310–319.
17. Baykov A., Schestakov A., Kasho V., Vener A., Ivanov A. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 194. P. 879–887.
18. Harutyunyan E.H., Kuranova I.P., Vainstein B.K., Huhne W.E., Lamzin V.S., Dauter Z., Teplyakov A.V., Wilson K.S. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 239. P. 220–228.
19. Аваева С.М. // Биохимия. 2000. Т. 3. С. 428–441.
20. Baykov A.A., Awaeva S.M. // Anal. Biochem. 1981. V. 116. P. 1–4.
21. Аваева С.М., Воробьева Н.Н., Курилова С.А., Назарова Т.И., Поляков К.М., Родина Е.В., Самыгина В.П. // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 442–458.

## The Effect of Pyrophosphate Analogues on the Inorganic Pyrophosphatase from *Escherichia coli*

N. F. Zakirova<sup>#</sup>, A. V. Ivanov, Yu. S. Skoblov, and M. K. Kukhanova

<sup>#</sup> Phone: +7 (095) 135-6065; e-mail: chernov@imb.imb.ac.ru

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP Moscow, 119991 Russia

The effect of inorganic pyrophosphate analogues on the enzymic activity of inorganic pyrophosphatase from *E. coli* was studied. Hypophosphoric and diphosphonic acids were shown to inhibit inorganic pyrophosphatase, whereas pyrophosphorous acid exerts almost no effect on the hydrolysis of inorganic pyrophosphate. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

**Key words:** pyrophosphate analogues; inorganic pyrophosphatase from *E. coli*