



УДК 577.113.3

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ БИС(5'-НУКЛЕОЗИДИЛ)ТЕТРА- ИЛИ ТРИФОСФАТОВ

© 2005 г. А. Ю. Скоблов^{*,#}, М. В. Ясько^{**}, А. М. Мурабулдаев^{***},
М. К. Куханова^{**}, Ю. С. Скоблов^{*}

^{*}Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{**}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

^{***}ООО "Лаборатория высоких технологий", Москва

Поступила в редакцию 14.03.2005 г. Принята к печати 13.04.2005 г.

Показано, что бис(5'-нуклеозидил)олигофосфаты – Ar_4AZT , Ar_4d4T , Ar_43TC , Ar_4ACV , а также Ar_3AZT и Ar_3d4T образуются из $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$ и соответствующего нуклеозид-5'-трифосфата (или дифосфата) при катализе суммарной фракцией аминоксил-тРНК-синтетаз из *E. coli*. Синтезированные соединения устойчивы к действию щелочной фосфатазы и охарактеризованы ВЭЖХ. Ar_4AZT , Ar_4d4T и Ar_43TC образуются примерно с одинаковой эффективностью, в то время как эффективность синтеза Ar_4ACV , а также Ar_3AZT и Ar_3d4T в 3–5 раз ниже.

Ключевые слова: аминоксил-тРНК-синтетаза; динуклеозид-5',5"-олигофосфаты.

ВВЕДЕНИЕ

Способность аминоксил-тРНК-синтетаз синтезировать бис(5'-нуклеозидил)тетрафосфаты как *in vitro*, так и *in vivo* хорошо известна [1] и присуща ферментам из бактерий, дрожжей, млекопитающих и других источников. Наиболее изученным является процесс образования Ar_4A или Ar_3A [2], тем не менее была показана возможность образования *in vivo* и некоторых других природных динуклеозидолигофосфатов, например Ar_4G или Ar_4U [2]. Следует отметить, что не все аминоксил-тРНК-синтетазы способны синтезировать соединения типа Ar_4N' или Ar_3N' [1]. Образование подобных соединений с участием синтетических аналогов нуклеотидов в литературе не описано.

Модифицированные нуклеозиды широко применяются в медицинской практике для терапии вирусных инфекций. Механизм действия основан на их внутриклеточном фосфорилировании до соответствующих трифосфатов, которые после включения в цепь вирусной ДНК прекращают ее биосинтез [3]. Эффективность подавления действия вируса аналогами нуклеозидов определяется, во-первых, эффективностью их внутриклеточного фосфорилирования до трифосфатного производного, а во-вторых, способностью вирусных ДНК-полимераз распознавать модифицированный нук-

леозидтрифосфат. Сравнительно недавно было показано, что субстратами для ДНК-полимераз могут быть не только нуклеозид-5'-трифосфаты, но и динуклеозидтри- и тетрафосфаты общей структуры dN_n, dN' , где $n = 3$ или 4 , а dN и dN' – природные или модифицированные нуклеозиды [4].

В настоящей работе исследовали способность аминоксил-тРНК-синтетаз из *E. coli* катализировать *in vitro* в условиях синтеза Ar_4A [7] образование динуклеозид-5',5"-олигофосфатов типа Ar_4dN или Ar_3dN по схеме:



где $dNTP$ и $dNDP$ – 5'-три- и дифосфаты неприродных нуклеозидов: ACV , AZT , $d4T$ и $3TC$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы использовали суммарный препарат аминоксил-тРНК-синтетаз из *E. coli*, полученный фракционированием клеточного лизата сульфатом аммония, который по литературным данным должен содержать практически весь набор аминоксил-тРНК-синтетаз [5]. Ферментативную активность препарата аминоксил-тРНК-синтетаз определяли по его способности аминоксиллировать суммарную тРНК *E. coli* [3H]лейцином и [^{35}S]метионином [6]. Реакционная смесь для синтеза бис(5'-нуклеозидил)полифосфатов была аналогична, описанной ранее [7]. В качестве субстратов использовали аналоги нуклеозид-5'-дидили трифосфатов – $AZTTP$, $AZTDP$, $d4TTP$, $d4TDP$, $ACVTP$ и $3TCTP$. Для идентификации продуктов, образующихся при ферментативном

Сокращения: аббревиатура Ar_nN' применена для обозначения бис(5'-нуклеозидил)олигофосфатов; ACV – ацикловир, 9-[(2'-гидроксиэтокси)метил]гуанин; AZT – 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидин; $d4T$ – 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин; $3TC$ – L-2',3'-дидезокси-3'-тиоцитидин.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-69-47; факс: (095) 336-26-41; эл. почта: sur@ibch.ru).

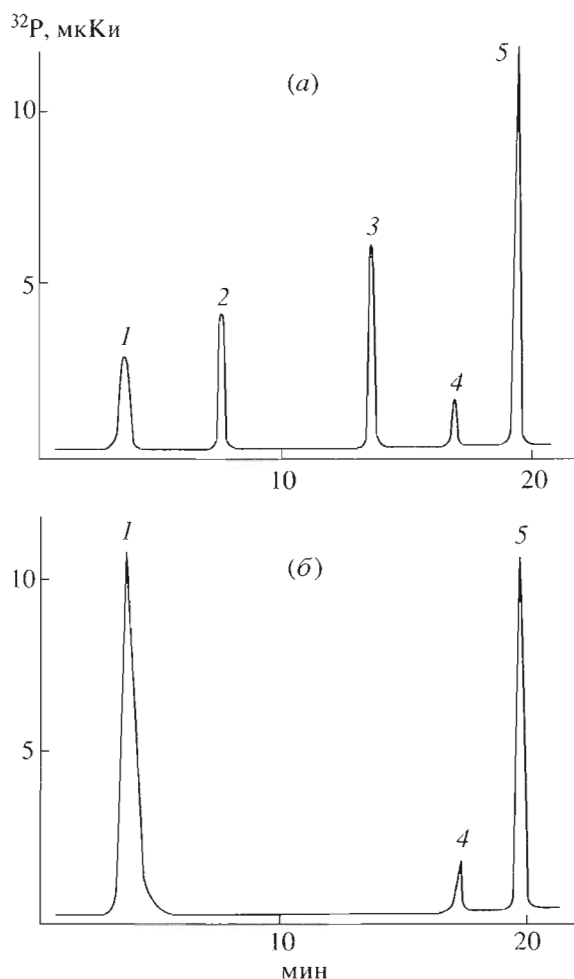


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ продуктов реакции ферментативного синтеза Ar_4AZT (а) и продуктов после обработки щелочной фосфатазой (б). 1 – H_3PO_4 , 2 – неидентифицированный; 3 – АТР; 4 – Ar_4A ; 5 – Ar_4AZT .

синтезе динуклеозидолигофосфатов, использовали Ar_4A , Ar_4AZT и Ar_3AZT , химически синтезированные согласно методу [8].

ВЭЖХ-анализ продуктов реакции образования бис(5'-нуклеозидил)олигофосфатов – Ar_4AZT , $\text{Ar}_4\text{d4T}$, Ar_4ZTC и Ar_4ACV , проведенный после остановки реакций прогреванием (рис. 1а) и последующей обработки реакционных смесей щелочной фосфатазой (рис. 1б), показывает наличие ^{32}P -меченых продуктов, отличных от $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и $[\text{}^{32}\text{P}]\text{ортофосфата}$. В качестве контроля использовали реакционные смеси без добавления препарата аминоксил-тРНК-синтетаз, которые обрабатывали и анализировали аналогично. В пробах был идентифицирован только $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, а после обработки щелочной фосфатазой весь радиоактивный материал элюировался в виде неорганического ортофосфата (данные не приведены).

В качестве положительного контроля в аналогичных условиях проводили реакцию ферментатив-

ного синтеза Ar_4A . Образовавшийся $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_4\text{A}$ хроматографически был идентичен химически синтезированному Ar_4A (хроматографические пики при совместной инъекции совпадают). Введение в реакционную смесь АТР-регенерирующей системы (пируваткиназа и фосфоенолпируват) играет важную роль, так как примеси фосфатаз в выделенном препарате аминоксил-тРНК-синтетаз быстро разрушали $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, снижая выход продуктов практически до нуля. Добавление неорганической пирофосфатазы значительно увеличивает выход, что уже отмечалось ранее [7].

В реакционные смеси для синтеза Ar_3AZT и $\text{Ar}_3\text{d4T}$ не добавляли пируваткиназу, так как избыток этого фермента превращал AZTDP и d4TDP в трифосфатные производные с последующим синтезом Ar_4AZT и $\text{Ar}_4\text{d4T}$ соответственно. Тем не менее, ВЭЖХ-анализ продуктов реакций показал наличие в реакционных смесях не только трифосфатов – $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_3\text{AZT}$ и $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_3\text{d4T}$, но и тетрафосфатов – $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_4\text{AZT}$ и $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_4\text{d4T}$ (рис. 2а, б). По-видимому, примесь пируваткиназы *E. coli* в препарате аминоксил-тРНК-синтетаз способна синтезировать заметное количество соответствующих трифосфатов, которые являются субстратами при образовании $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_4\text{AZT}$ и $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_4\text{d4T}$. Результат хроматографического анализа продуктов реакции синтеза Ar_3AZT приведен на рис. 2а. На рис. 2б показан анализ продуктов реакции после обработки щелочной фосфатазой.

Из данных, приведенных в таблице, можно видеть, что Ar_4AZT и $\text{Ar}_4\text{d4T}$ образуются примерно с одинаковой эффективностью. Весьма примечательным является тот факт, что выход продукта реакции, когда в качестве субстрата использовали ЗТСТР, был выше, чем для остальных аналогов dNTP. Эффективность синтеза Ar_4ACV примерно в 5 раз ниже по сравнению с другими аналогами dNTP. Ферментативный синтез динуклеозидтрифосфатов Ar_3AZT и $\text{Ar}_3\text{d4T}$ происходит менее эффективно, чем соответствующих динуклеозидтетрафосфатов – Ar_4AZT и $\text{Ar}_4\text{d4T}$. Однако сравнивать эффективность образования всех синтезированных соединений с Ar_4A следует весьма осторожно, так как концентрация $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ в реакционной смеси в 1000 раз ниже концентрации других трифосфатов (или дифосфатов) и проводить сопоставление скоростей реакций в этих условиях не корректно. Более того, несмотря на различия в концентрациях $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и AZTTP в реакционной смеси, среди продуктов реакции кроме $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_4\text{AZT}$ (рис. 1, пик 5) идентифицировано небольшое количество $[\text{}^{32}\text{P}]\text{Ar}_4\text{A}$ (пик 4), что свидетельствует о значительно более высокой субстратной активности АТР по сравнению с исследованными dNTP.

Можно предположить, что синтез несимметричных бис(5'-нуклеозидил)тетрафосфатов и бис(5'-

нуклеозидил)трифосфатов из АТР и синтетических аналогов три- (или ди-)фосфатов с помощью аминоксил-тРНК-синтетаз *in vitro*, который приведен в этой работе, может также происходить и *in vivo*, что расширяет наши представления о возможных путях метаболизма нуклеозидных и нуклеотидных аналогов. Во-первых, динуклеозидтрифосфаты являются субстратами ДНК-полимераз [8] и, следовательно, Ar_3AZT и Ar_3d4T могут вызывать терминацию биосинтеза ДНК, хотя и с более низкой эффективностью, чем модифицированные нуклеозид-5'-трифосфаты. Как известно, аналоги нуклеозидов, используемые в медицине как анти-вирусные агенты, должны пройти три стадии внутриклеточного фосфорилирования, чтобы стать субстратами ДНК/РНК-полимераз. Эффективность фосфорилирования определяется структурой аналога нуклеозида. Для некоторых производных нуклеозидов до сих пор не установлено, какие ферменты осуществляют третью стадию кинирования. Полученные в данной работе результаты показывают, что аминоксил-тРНК-синтетазы катализируют образование динуклеозидолигофосфатов, содержащих модифицированный нуклеозид.

Синтез динуклеозидолигофосфатов *in vivo* может представлять альтернативный путь получения трифосфорилированных форм аналогов нуклеозидов и таким образом частично решить проблему "третьего фосфорилирования" нуклеозидных производных. Преимуществом Ar_3dN и Ar_4dN по сравнению с $dNTP$ является их устойчивость к действию фосфатаз и АТР-аз. Мы сравнили стабильность АТР, Ar_3AZT и Ar_4AZT в нормальной сыворотке крови по описанному ранее методу [9]. Было показано, что время полугидролиза Ar_3AZT и Ar_4AZT составляет 45 и 35 мин соответственно, что в 2.5–3 раза выше, чем для АТР. Эти данные хорошо коррелируют с результатами, опубликованными ранее для аналогичных соединений [9]. За счет большей стабильности такие соединения могут играть роль своеобразных "депо-форм" для аналогов нуклеотидов.

Таким образом, впервые показана возможность ферментативного синтеза несимметричных бис(5'-нуклеозидил)тетра- и бис(5'-нуклеозидил)трифосфатов с участием неприродных аналогов нуклеотидов, катализируемого аминоксил-тРНК-синтетазами. Дальнейшие исследования покажут, насколько обоснованными являются предположения о возможности протекания аналогичных реакций *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали $[\alpha\text{-}^{32}P]ATP$ (1000 Ки/ммоль, 10 мКи/мкл), полученный из Института реакторных материалов (Россия); $[^3H]$ лейцин и $[^{35}S]$ метионин фирмы "Amersham" (Англия); пируваткиназу и щелочную фосфатазу

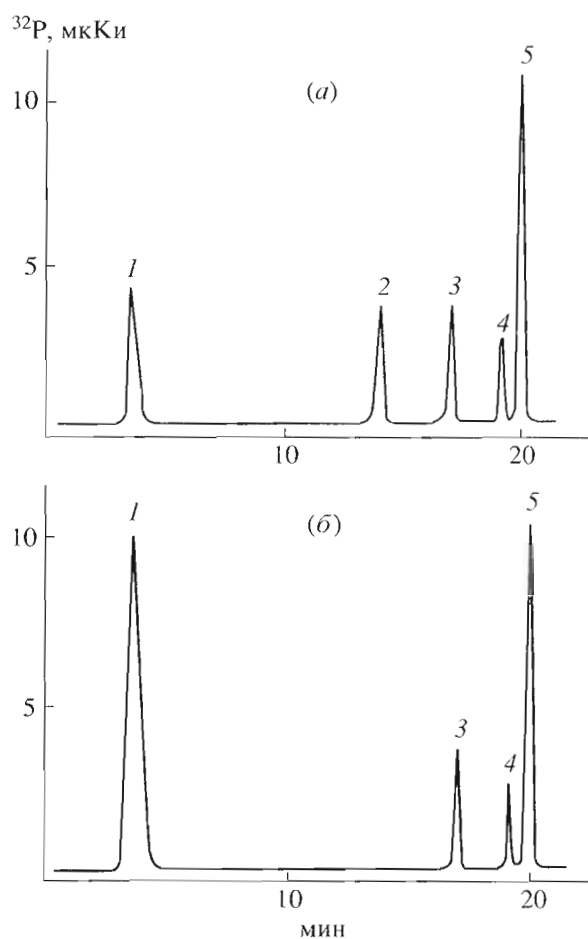


Рис. 2. ВЭЖХ-анализ продуктов реакции синтеза Ar_3AZT (а) и продуктов после обработки щелочной фосфатазой (б). 1 – H_3PO_4 ; 2 – АТР; 3 – Ar_4A ; 4 – Ar_4AZT ; 5 – Ar_3AZT .

фирмы "Sigma" (США) и неорганическую пирофосфатазу *E. coli* (100 ед. акт./мг), любезно предоставленную проф. С.М. Аваевой (НИИФХБ МГУ). Препарат суммарной фракции аминоксил-тРНК-синтетаз из *E. coli* выделяли по методу [5], а ее ферментативную активность по способности присоединять $[^3H]$ лейцин и $[^{35}S]$ метионин к суммарной тРНК *E. coli* как описано в работе [6]. Исходные нуклеозиды были предоставлены компанией "Ассоциация АЗТ" (Москва). Химический синтез Ar_4A , Ar_4AZT и Ar_3AZT проводили как описано ранее [4, 8]. $AZTTP$, $AZTDP$, $d4TTP$, $d4TDP$, $ACVTP$ и $3TCPTP$ были синтезированы по методу [10].

Анализ продуктов ферментативных реакций проводили на хроматографе Gilson (Франция) с использованием проточного детектора радиоактивности тип 170 Beckman (США). Хроматографию проводили на колонке LiChrosorb RP-18 (Merck, 7 мкм, 4 × 150 мм) в градиенте концентрации буфера Б (70% EtOH) в буфере А (50 мМ TEAB), скорость элюции 0.5 мл/мин. Программа гради-

Некоторые характеристики изученных $Ap_n dN$

Продукт реакции	Время удерживания при ВЭЖХ, мин	Количество образованного продукта, пмоль	Выход, % от исходного $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$
Ap_4A	16.8	8	16
Ap_4AZT	19.6	14.5	29
Ap_4d4T	18.6	12	24
Ap_43TC	18.0	18	36
Ap_4ACV	21.0	3.2	6.4
Ap_3AZT	20.1	4.8	9.6
Ap_3d4T	19.0	5.6	11.2

ента буфера Б: 0–5 мин – 0%; 5–10 мин – 10%; 10–40 мин – до 15% и 45–50 мин – до 100%. Элюат, содержащий радиоактивные продукты, собирали и измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-4000 Intertequnic (Франция).

Реакционная смесь для синтеза бис(5'-аденозил)тетрафосфата объемом 30 мкл содержала: 0.05 М буфер Трис-НСl pH 7.8, 5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ дитиотреит, 0.2 М КСl, смесь аминокислот (Phe, Lys, Val, Met, Trp, 5 мкг/мл каждой), 0.05 мМ $ZnCl_2$, 0.05 М фосфонолпириват, 50 мкКи $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 0.2 ед. акт. неорганической пирофосфатазы *E. coli*, 1 ед. акт. пируваткиназы, 100 мкг препарата аминоацил-тРНК-синтетаз из *E. coli*.

Для синтеза других бис(5'-нуклеозидил)тетрафосфатов в пробу добавляли соответствующий нуклеозид-5'-трифосфат до конечной концентрации 1 мМ.

Смесь инкубировали при 37°C 15 мин, затем реакцию останавливали прогреванием при 95°C в течение 2 мин, центрифугировали 1 мин при 14000 об/мин для удаления денатурированного белка и супернатант делили на две равные части. Одну часть анализировали с помощью ВЭЖХ, а

вторую – инкубировали 30 мин с 1 мкл щелочной фосфатазы (0.2 ед. акт.) при 37°C, а затем также анализировали ВЭЖХ.

Реакционные смеси для синтеза бис(5'-нуклеозидил)трифосфатов были аналогичны приведенным выше, но не содержали пируваткиназы, а вместо нуклеозид-5'-трифосфатов использовали соответствующие нуклеозид-5'-дифосфаты.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 04-04-49454), а также программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plateau P., Blanquet S. // Synthesis of $Np_n N'$ in vitro and in vivo / Ed. McLennan A.G. Boca Raton: CRC Press, 2000. P. 63–80.
2. Coste H., Brevet A., Plateau P., Blanquet S. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 12096–12103.
3. De Clercq E. // Nature Reviews. 2004. V. 2. P. 704–720.
4. Victorova L., Sosunov V., Skoblov A., Shipitsin A., Kraevsky A. // FEBS Lett. 1999. V. 453. P. 6–10.
5. Kelmers A.D., Novelli G.D., Stulberg M.P. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. P. 3979–3983.
6. Kosakowski M.H., Bock A. // Eur. J. Biochem. 1970. V. 12. P. 67–73.
7. Goerlich C., Foekler R., Holler E. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 126. P. 135–142.
8. Скоблов А.Ю., Сосунов В.В., Викторова Л.С., Скоблов Ю.С., Куханова М.К. // Биооргани. химия. 2005. Т. 31. С. 54–64.
9. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Skoblov Y.S., Victorova L.S., Goryunova L.Y., Beabekashvilli R.S., Pronyaeva T.R., Fedyuk N.V., Zolin V.V., Pokrovsky A.G., Kukhanova M.K. // J. Med. Chem. 2002. V. 45. P. 1284–1291.
10. Дяткина Н.Б., фон Янта-Липински М., Минасян Ш.Х., Куханова М.К., Краевский А.А., Чиджавад-зе З.Г., Бибилашвили Р.Ш. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. С. 1366–1374.

Enzymatic Synthesis of Bis(5'-Nucleosidyl) Tetra- and Triphosphates

A. Yu. Skoblov^{##}, M. V. Yas'ko^{**}, A. M. Murabuldaev^{***},
M. K. Kukhanova^{**}, and Yu. S. Skoblov^{*}

[#] Phone: +7 (095) 330-6947; fax: +7 (095) 336-2641; e-mail: sur@ibch.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991

^{***} OOO Laboratory of High Technologies, Moscow, Russia

The total fraction of aminoacyl-tRNA synthases from *Escherichia coli* has been shown to catalyze the synthesis of the bis(5'-nucleosidyl) oligophosphates Ap_4AZT , Ap_4d4T , Ap_43TC , and Ap_4ACV , as well as Ap_3AZT and Ap_3d4T , from $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ and the corresponding nucleoside-5'-tri(or di)phosphate. The resulting compounds, characterized by HPLC, are resistant to alkaline phosphatase. Ap_4AZT , Ap_4d4T , and Ap_43TC are formed with approximately equal efficiency, whereas the efficiencies of the synthesis of Ap_4ACV , Ap_3AZT , and Ap_3d4T are three- to fivefold lower. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: aminoacyl-tRNA synthase, 5',5'-dinucleosidyl oligophosphates