



## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.159

## РНК-ЛИГАЗА БАКТЕРИОФАГА Т4

Веньямина А. Г., Ямковой В. И.

*Новосибирский государственный университет*

В обзоре приведены литературные данные о биохимических и физико-химических свойствах РНК-лигазы бактериофага Т4. Описаны методы выделения, очистки и тестирования фермента. Рассмотрен механизм действия РНК-лигазы и ее специфичность. Приведены примеры практического использования фермента для синтеза олигорибонуклеотидов, олигодезоксирибонуклеотидов, смешанных и модифицированных олигонуклеотидов, а также примеры модификации природных полинуклеотидов.

РНК-лигаза бактериофага Т4 (полинуклеотидсинтетаза (АТР), КФ 6.5.1.3) была обнаружена в 1972 г. Силбером и соавт. [1]. Фермент катализировал АТР-зависимую внутримолекулярную реакцию циклизации одноцепочечных полинуклеотидов [1-4] и межмолекулярную реакцию «сшивания» олигорибонуклеотидов [5-10] и олигодезоксирибонуклеотидов [3, 4, 11]. Позднее было обнаружено свойство РНК-лигазы стимулировать ДНК-лигазную реакцию [12], а также способность катализировать реакцию присоединения фибрилл к базальным пластинкам на последней стадии морфогенеза фага Т4 [13].

Внимание исследователей в первую очередь привлекли синтетические возможности РНК-лигазы, что предопределило прикладной характер многих работ. Накопившиеся литературные данные частично обобщены в обзорных статьях [14, 15], однако попытки систематизировать весь материал по РНК-лигазе до сих пор не предпринимались. В настоящем обзоре использованы литературные данные, опубликованные в отечественных и основных зарубежных изданиях до декабря 1980 г., а также отдельные работы, опубликованные в 1981 г.

## 1. Физико-химические свойства РНК-лигазы

## 1.1. Источник фермента, выделение и очистка

РНК-лигазу продуцируют клетки *E. coli*, инфицированные бактериофагами Т2, Т4 и Т6; бактериофаги нечетной серии образование РНК-лигазы не индуцируют [1]. В настоящее время выделена, очищена и исследована только РНК-лигаза бактериофага Т4. Появлялись сообщения о

Сокращения:  $\epsilon\text{NAD}^+$  — никотинамид-1, N<sup>6</sup>-этноадезиндинуклеотид,  $\epsilon\text{NCD}^+$  — никотинамид-3, N<sup>4</sup>-этноцитозиндинуклеотид,  $\text{Sm}$  — 2'-О-метилцитидин,  $\epsilon\text{C}$  — 3, N<sup>4</sup>-этепидин,  $\epsilon\text{A}$  — 1, N<sup>6</sup>-этноаденозин,  $\epsilon\text{G}$  — 1, N<sup>2</sup>-этепогуаноин,  $\mu\text{G}$  — 1, N<sup>2</sup>-(2-метилаллилден)гуаноин,  $\text{lin A}$  — 1-( $\beta$ -D-рибофуранозил)-8-аминомидазо[4,5-g]-хиназолин. Остальные сокращения даны в соответствии с рекомендациями комиссии по биохимической номенклатуре IUPAC — IUB (J. Mol. Biol. (1971) 55, 299—310).

наличия РНК-лигазы в инфицированных различными вирусами и интактных клетках эукариот [16, 17]. Однако позднее в этих работах были обнаружены методические погрешности, и при использовании усовершенствованных методик обнаружить РНК-лигазу в этих же линиях клеток не удалось [18], поэтому вопрос о существовании РНК-лигазы у эукариот следует считать пока открытым.

Биомасса клеток *E. coli*, инфицированных бактериофагом T4, содержит значительное количество РНК-лигазы (до 0,5–1% общего растворимого белка) [13, 19, 20]. Первые стадии выделения фермента включают в себя, как правило, разрушение клеток ультразвуком [1, 5, 7, 16, 17, 20–22] или на френч-прессе [3, 19], осаждение нуклеиновых кислот стрептомицином [1, 5, 7, 16, 17, 19–21] или полвэтиленимином [20, 22] и фракционирование белков сульфатом аммония [1, 5, 7, 16, 17, 19–22].

Ранние способы очистки РНК-лигазы [1, 5, 16] в качестве последующих стадий включали в себя 1–2 хроматографии на DEAE-целлюлозе [1, 16] или DEAE-сефадексе [1, 5] и гель-фильтрацию на сефадексах G-75 [1, 5] или G-100 [10]. Полученные препараты фермента не были гомогенны и содержали значительное количество примесных нуклеаз, среди которых наиболее активна 3'-экзонуклеаза, обладающая повышенным сродством к олигодезоксирибонуклеотидам.

С целью увеличения чистоты РНК-лигазы в более поздних работах в схему очистки фермента была введена хроматография на гидроксипатите [3, 7, 8, 23]. Предлагалось также использовать хроматографию на ДНК-агарозе [3, 17] и центрифугирование в градиенте концентрации глицерина [17], однако последние модификации не получили широкого распространения. Введение дополнительных стадий очистки позволило получить РНК-лигазу в практически гомогенном состоянии (80–82% чистоты по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [3, 7]), но не решило проблему удаления примесной 3'-экзонуклеазы [4, 12, 19].

Дальнейшие попытки получения препаратов РНК-лигазы, пригодных для целей олигонуклеотидного синтеза, осуществлялись как путем повторного использования наиболее удачных из предложенных ранее хроматографических носителей [10, 12, 24], так и путем поиска иных способов очистки фермента [20, 21, 25]. Весьма интересны также попытки использовать для выделения РНК-лигазы мутантные штаммы *E. coli* и бактериофага T4, дефицитные по отдельным нуклеазам (например, [7, 25, 26]) или гиперпродуцирующие целевой фермент [19].

К сожалению, не всегда удовлетворительная характеристика получаемых препаратов, различия в методах определения примесных нуклеаз и разные способы определения активности РНК-лигазы не позволяют объективно оценить эффективность всех существующих способов очистки фермента. Судя по широте распространения и практическим результатам, полученным при синтезе конкретных полинуклеотидных последовательностей, наиболее совершенными в настоящее время следует считать способы очистки РНК-лигазы, использующие в качестве решающей стадии для удаления нуклеаз аффинную хроматографию на 2', 5'-ADP-сефарозе [25] и хроматографию на голубом цибакроне F3GA, ковалентно связанном с агарозными гранулами [20]. Описанная несколько ранее очистка РНК-лигазы на ДНК-агарозе в присутствии 0,1 М калий-фосфатного буфера [19] позднее не была воспроизведена [20]. Высокая степень чистоты РНК-лигазы, достигнутая в работе [19], является, вероятно, следствием использования в качестве исходного сырья для выделения фермента гиперпродуцирующих РНК-лигазу клеток *E. coli*, инфицированных мутантным по генам 44 и *regA* бактериофагом T4.

Существующие в настоящее время способы получения препаратов РНК-лигазы, пригодных для целей олигонуклеотидного синтеза, весьма трудоемки [19–21, 25]; как правило, они включают в себя от 4 до 6

хроматографических стадий. Поэтому дальнейший прогресс в области очистки РНК-лигазы, на наш взгляд, должен быть связан с попытками упрощения существующих способов получения фермента без снижения достигнутой степени его чистоты.

### 1.2. Стабильность РНК-лигазы

Препараты РНК-лигазы с концентрацией белка 0,5 мг/мл можно хранить в замороженном состоянии без потери активности по крайней мере в течение полугода [7]. В растворе 17% глицерина при 4°С фермент стабилен в течение 9 мес [17]. Большинство исследователей предпочитают хранить РНК-лигазу в 50% глицерине при -20°С [16, 19-21, 27-29]. В этих условиях фермент не теряет активности по крайней мере в течение года [19]. С целью стабилизации РНК-лигазы [13] некоторые исследователи в растворы при очистке и хранении фермента добавляют АТР [3, 19].

В противоположность относительно высокой стабильности при хранении РНК-лигаза быстро инактивируется в процессе работы, особенно при низких концентрациях фермента. Ряд авторов отмечали несоответствие между высокой начальной скоростью РНК-лигазной реакции и низкими, не достигающими расчетных значений, выходами продуктов [23, 28-30]. Причина низкой стабильности РНК-лигазы в процессе катализа не установлена.

### 1.3. Тестирование РНК-лигазы

РНК-лигаза была обнаружена впервые по своей способности катализировать реакцию циклизации одноцепочечных полирибонуклеотидов [1]. С этого времени реакция циклизации традиционно используется для определения активности фермента. Субстратом служит обычно [5'-<sup>32</sup>P]poly(A) с длиной цепи от 12 до 40 нуклеотидов [1-5, 7, 12, 13, 19, 20, 23-25]. Использование меченой по 5'-концевому фосфату poly(A) позволяет следить за выходом циклических продуктов реакции по количеству радиоактивного фосфата, не отщепляемого фосфомоноэстеразой. Реакция циклизации высокоспецифична и дает возможность измерять активность РНК-лигазы в присутствии таких близких по свойствам ферментов, как ДНК-лигаза. Недостатком этого метода является его трудоемкость.

В последнее время для определения активности РНК-лигазы стали широко использовать свойства фермента катализировать реакцию пирофосфатного обмена между АТР и [<sup>32</sup>P]пирофосфатом [17, 27, 31] и образовывать кислотонерастворимый АМР-лигазный комплекс с меченой АТР [17, 21, 22, 32, 33]. Реакции эти не столь специфичны, как реакция циклизации, однако значительно менее трудоемки. Кроме того, тестирование РНК-лигазы по образованию кислотонерастворимого АМР-лигазного комплекса при использовании меченой АТР с известной удельной радиоактивностью позволяет выражать содержание фермента в препаратах непосредственно в единицах концентрации [21].

### 1.4. Структура РНК-лигазы

РНК-лигаза появляется в клетках *E. coli* через 3 мин после инфекции бактериофагом Т4 и относится, таким образом, к группе ранних фаговых белков [1, 7]. Известно, что фермент представляет собой продукт гена 63 [13]. Наличие в молекуле РНК-лигазы функционально активной SH-группы показано в работах [1, 3, 13, 23]. Фермент инактивируется при взаимодействии с блокирующими сульфгидрильные группы реагентами (*n*-оксимеркурибензоат, *n*-хлормеркурибензосульфат, *N*-этилмалеимид), а для проявления активности требует присутствия дитиотреита или 2-мер-

каптоэтанола. На образце электрофоретически гомогенной РНК-лигазы с использованием меченой АТР было показано, что на молекуле фермента существует один участок связывания АМР [19]. Интересно, что образование АМР-лигазного комплекса сопровождается кажущимся увеличением молекулярного веса фермента на 4000 против ожидаемых 350 [19]. Форма молекулы РНК-лигазы близка к глобулярной [7]. Изоэлектрическая точка фермента равна 6,1 [21].

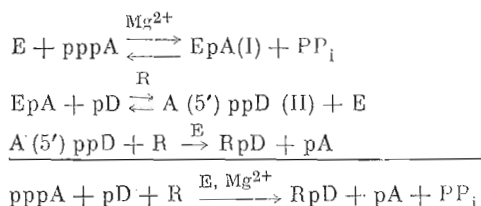
Значения молекулярного веса фермента ( $M$  52 000—43 000 по разным данным), определенные в педенатурирующих условиях [1, 7, 16, 21], хорошо совпадают со значениями ( $M$  45 000—41 000), полученными методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [3, 7, 20]. РНК-лигаза не диссоциирует на более мелкие субъединицы в додецилсульфате натрия даже после кипячения с 1 М 2-меркаптоэтанола [7]. В то же время препараты РНК-лигазы на всех стадиях очистки демонстрируют неожиданную S-образную зависимость активности от концентрации фермента [5, 7, 21, 28], характерную для олигомерных белков [7]. При большом разбавлении наблюдается не предотвращаемое добавлением альбумина исчезновение активности РНК-лигазы. Однако это явление полностью обратимо — при концентрировании фермента его активность восстанавливается [7]. При высоких концентрациях фермента Ласт и Андерсон [7] обнаружили склонность РНК-лигазы к агрегации. Позднее димер РНК-лигазы с молекулярным весом 81 000 был выделен в процессе очистки фермента методом гель-фильтрации на сефадексе G-100 [21]. Таким образом, совокупность экспериментальных данных позволяет предположить, что активной формой РНК-лигазы может быть олигомер, состоящий из субъединиц с  $M$  43 000—47 000.

## 2. Биохимические свойства РНК-лигазы

### 2.1. Механизм катализируемой РНК-лигазой реакции

Прогресс в установлении механизма РНК-лигазной реакции в значительной мере обусловлен сходством с механизмом реакции, катализируемой ДНК-лигазой [14, 34, 35]. На первой стадии РНК-лигаза реагирует в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  с АТР с образованием аденилированного фермента (I) и освобождением пирофосфата [4, 17, 19, 21, 32]. Далее остаток АМР переносится от фермента на 5'-концевой фосфат донора с образованием аденилированного донора (II), содержащего 5',5'-фосфоангидридную связь [4, 8, 10, 23, 32, 36]. Акцептор на этой стадии реакции выполняет роль кофактора [4, 23]. Образование фосфодиэфирной связи на последней стадии реакции происходит, вероятно, путем нуклеофильной атаки 3'-гидроксила акцептора на активированный 5'-фосфат донора с освобождением АМР [24, 31]. Описанную последовательность реакций иллюстрирует схема 1:

Схема 1



где pD и R — соответственно молекулы донора и акцептора.

Впервые существование АМР-лигазного комплекса (I) было показано в работе Кренстона и соавт. [17], которые обнаружили, что фермент

в отсутствие полинуклеотидного субстрата катализирует  $Mg^{2+}$ -зависимую реакцию обмена между АТР и  $[^{32}P]$ пирофосфатом, но не между АТР и  $[^3H]$ АМР. При этом GTP, CTP, UTP, ADP и AMP не заменяют АТР в реакции пирофосфатного обмена, а при замене АТР на dАТР скорость реакции уменьшается более чем в 7 раз. Образование АМР-лигазного комплекса при инкубации фермента с меченой АТР было продемонстрировано также в прямых экспериментах методами гель-фильтрации, электрофореза в полиакриламидном геле и ультрацентрифугирования в градиенте концентрации глицерина [4, 17, 19]. Радиоактивная метка мигрировала вместе с РНК-лигазой в случае, если перед фракционированием фермент был предынкубирован с  $[\alpha-^{32}P]$ - или  $[^3H]$ АТР, но не с  $[\gamma-^{32}P]$ -АТР. Выделенный методом гель-фильтрации, АМР-лигазный комплекс диссоциирует в присутствии терминированной 5'-фосфатом poly(A) с образованием АМР, в то время как АТР регенерируется при добавлении пирофосфата [17]. Кинетические закономерности реакции образования АМР-лигазного комплекса были исследованы в работах [21, 32]. Полученные результаты подтвердили обнаруженное ранее [17] явление повышения стабильности комплекса при пониженной температуре.

Первые данные в пользу существования промежуточного соединения — аденилированного донора (II) — были получены в работе [36]. Исследования [4, 8, 10, 23, 32] подтвердили строение этого соединения, накапливающегося в значительных количествах в реакционной смеси при использовании «плохих» акцепторов (например, [4, 28, 31, 37]). Условия образования аденилированного донора (оптимумы pH, температуры и концентрации ионов  $Mg^{2+}$ ) существенно отличаются от условий, оптимальных для образования конечного продукта [23, 31]. Однако аденилированный донор является истинным промежуточным соединением, а не побочным продуктом. Выделенное из реакционной смеси [4, 8] или химически синтезированное [10, 32], это соединение обладает способностью реагировать с акцептором в отсутствие АТР; при этом АМР освобождается в количестве, эквивалентном по отношению к «сшитому» продукту [4]. Как и в случае ДНК-лигазы [34], эту стадию реакции катализирует, вероятно, свободный, неаденилированный фермент [4, 31, 38, 39].

В ряде работ авторы ставили своей целью выяснить, какая стадия из последовательности реакций, указанных в схеме 1, лимитирует общую скорость процесса. Ингланд и Уленбек в кинетических экспериментах установили, что при использовании наименее реакционноспособных уридиловых акцепторов лимитирующей является последняя стадия РНК-лигазной реакции [28]. К такому же выводу на основании косвенных данных пришли авторы работ [4, 31], проводившие исследования на олигодезоксирибонуклеотидах. Недавно было показано, что реакционная способность «плохих» акцепторов увеличивается при снижении температуры реакции [28, 29, 31, 39, 40]. Этот феномен свидетельствует, вероятно, о том, что, как и в случае АМР-лигазного комплекса, пониженная температура стабилизирует комплекс Михаэлиса, образованный ферментом и акцептором на последней стадии реакции.

Несмотря на то что в общих чертах механизм действия РНК-лигазы можно считать установленным, отдельные детали его продолжают уточняться. Как видно из приведенной выше схемы, акцептор в РНК-лигазной реакции является не только субстратом, но и кофактором при аденилировании донора. Однако аденилированный донор не обязательно «сшивается» с акцептором, который стимулировал его образование. Явление «замены акцептора» было описано в работе [4]. Одним из вариантов объяснения этого явления служит предположение, что акцептор, а возможно, и активированный донор после осуществления второй стадии РНК-лигазной реакции отделяется от фермента, а на последней стадии снова с ним связывается [4, 28].

В противоположность полученным в работах [4, 23] данным Гумпорт

недавно показал, что для осуществления стадии активации донора присутствие акцептора не обязательно [31, 39]. В экспериментах Гумпорта, кроме того, активированный донор не только накапливался в реакционной смеси и переходил в конечный продукт, но и расходовался по неизвестному механизму [31] (что противоречит результатам работы Силбера и соавт. [1]). Причина данных противоречий не установлена. Не исключено, что они являются следствием различий в температурных условиях реакции, поскольку Гумпорт проводил свои эксперименты при  $17^{\circ}\text{C}$ , т. е. при температуре на  $20^{\circ}\text{C}$  ниже, чем авторы работ [1, 4, 23]. Представляется существенной также замена в работах Гумпорта ионов  $\text{Mg}^{2+}$  на ионы  $\text{Mn}^{2+}$ .

## 2.2. Специфичность и кинетические свойства РНК-лигазы

С целью упрощения изложения и систематизации литературных данных, касающихся субстратной специфичности РНК-лигазы, в этом и следующем разделах обзора выделены и рассматриваются отдельно три типа катализируемых РНК-лигазой АТР-зависимых реакций (внутримолекулярная реакция циклизации одноцепочечных полинуклеотидов, межмолекулярная реакция «сшивания» олигорибо- и олигодезоксирибонуклеотидов и реакция «сшивания» одноцепочечных разрывов в двуцепочечных полинуклеотидах) и два типа реакций АТР-независимых («сшивании» аденилированных молекул, содержащих  $5',5'$ -фосфоангидридную связь, с олигонуклеотидами и так называемая ТФА-реакция — см. раздел 2.3). В этих же разделах обсуждаются наиболее общие кинетические закономерности каждого из типов рассматриваемых здесь реакций.

Первой была обнаружена способность РНК-лигазы циклизовать одноцепочечные полирибонуклеотиды. В этой реакции донором и акцептором служат два конца одной и той же молекулы. Оптимум реакции циклизации лежит в области рН 7,5–8,2 [1]. Для работы фермента необходимо присутствие АТР и ионов  $\text{Mg}^{2+}$  [1]. Величина  $K_m$  для АТР равна 0,2 мкМ, для  $\text{Mg}^{2+}$  — 0,4 мМ [1]. Ионы  $\text{Mg}^{2+}$  в концентрации более чем 10 мМ заметно ингибируют реакцию циклизации, а GTP, CTP, UTP, ADP и AMP не замедляют АТР в этой реакции и не ингибируют ее [1]. При замене АТР на dАТР скорость реакции уменьшается в 5 раз [1]. Специфичность РНК-лигазы к нуклеотидному составу полирибонуклеотидов в реакции циклизации была исследована на гомополимерах в работах [1, 16, 17]. Интерпретация полученных результатов затруднена тем, что длина использованных полирибонуклеотидов была неодинакова [17]. Однако в среднем полипурины эффективнее полипиримидинов [1];  $\text{poly(U)}$  — наименее, а  $\text{poly(A)}$  — наиболее реакционноспособные субстраты в этой реакции [1, 16].

Кинетические закономерности реакции циклизации полирибонуклеотидов были установлены на полиаденилатах, которые циклизуются начиная с октамеров [2]. Скорость реакции резко повышается при увеличении длины цепи от 8 до 10 нуклеотидов, а затем остается постоянной до 16 [2]. При дальнейшем увеличении длины цепи субстрата скорость реакции постепенно понижается [1, 2]. Величина  $K_m$  для полирибоаденилатов с длиной цепи от 10 до 100 нуклеотидов практически одинакова ( $\sim 1$  мкМ), что послужило основанием для предположения о том, что участок связывания  $\text{poly(A)}$  с ферментом включает в себя только несколько нуклеотидных остатков [2]. Уменьшение скорости реакции циклизации при увеличении длины цепи полирибоаденилатов свыше 16 нуклеотидов обусловлено уменьшением максимальной скорости ферментативной реакции и, возможно, является следствием уменьшения вероятности сближения  $3'$ -гидроксильного и  $5'$ -фосфатного остатков  $\text{poly(A)}$  при увеличении ее длины [2]. Зависимость скорости реакции циклизации от длины цепи остальных гомополирибонуклеотидов не исследовалась.

Сноупэк и соавт. [3] показали, что одноцепочечные полидезоксирибонуклеотиды также представляют собой субстраты для РНК-лигазы, хотя



и значительно менее реакционноспособные. В одинаковых условиях  $(pdT)_{12-18}$  циклизуется со скоростью, равной  $1/12$  от скорости циклизации  $(pA)_{20}$  [3]. Способность РНК-лигазы циклизовать одноцепочечные полидезоксирибонуклеотиды не является следствием загрязнения ее примесью ДНК-лигазы. Из клеток *E. coli* В, инфицированных дефицитным по ДНК-лигазе штаммом бактериофага Т4 (*am E 13*), была выделена РНК-лигаза с такой же субстратной специфичностью, как и из продуцирующего ДНК-лигазу штамма *am* № 82 [3]. Дополнительные данные в пользу принадлежности РНК- и ДНК-циклизирующих активностей одному ферменту были получены в процессе очистки РНК-лигазы (отношение двух активностей при очистке не изменяется) и в экспериментах по термоинактивации фермента (кривые термоинактивации для двух активностей совпадают) [3].

Реакция циклизации полидезоксирибонуклеотидов так же зависит от АТФ и ионов  $Mg^{2+}$  и ингибируется неорганическим пирофосфатом и блокирующими сульфгидрильные группы реагентами, как и реакция циклизации полирибонуклеотидов [3]. Общий вид зависимости скорости реакции циклизации  $poly(dT)$  от длины цепи [3, 4] аналогичен таковому для  $poly(A)$  [2]. Минимальная длина циклизующегося полинуклеотида — 6 нуклеотидов, оптимальная — 15—20 [4]. Зависимость скорости реакции циклизации от длины цепи остальных гомополидезоксирибонуклеотидов, а также специфичность РНК-лигазы к нуклеотидному составу ДНК в этой реакции не исследовались.

В настоящее время наиболее полно изучена способность РНК-лигазы «сшивать» одноцепочечные олигорибо- и олигодезоксирибонуклеотиды конец в конец в межмолекулярной реакции. Характерной особенностью этой реакции является относительно низкое сродство фермента к «сшиваемым» олигонуклеотидам. В работе Кауфмана и соавт. [6] было показано, что величина  $K_m$  для акцептора  $(Ap)_3A$  при 0,5 мкМ концентрации донора  $(pA)_7$  равна 0,8 мМ. Это значение почти на три порядка превышает  $K_m$  для полирибоаденилатов в реакции циклизации. Хинтон и соавт. [31] определили  $K_m$  для донора и акцептора в реакции «сшивания»  $dA(pdA)_4$  с  $pdTp$  при постоянной концентрации одного из компонентов равной 0,25 мМ. Полученные значения (0,7 мМ для донора и 2,1 мМ для акцептора) имеют тот же порядок величины, что и в работе [6]. Близкие к этим значения  $K_m$  для донора (0,5 мМ) и акцептора (1,5 мМ) получены также при «сшивании»  $(pdT)_4pdCp$  с  $dA(pdA)_5$  [39]. Таким образом, для достижения высоких скоростей, сравнимых со скоростью реакции циклизации, необходимо проводить межмолекулярную РНК-лигазную реакцию при относительно высоких (миллимолярных) концентрациях «сшиваемых» олигонуклеотидов. Как и в случае реакции циклизации [7], начальная скорость межмолекулярной РНК-лигазной реакции S-образно зависит от концентрации фермента. При низких концентрациях РНК-лигазы наблюдается характерная потеря активности [5, 28], далее следует довольно протяженный линейный участок [23, 28—31, 39], а затем слабо выраженное плато [23].

Специфичность РНК-лигазы по отношению к молекулам донора и акцептора в АТФ-зависимой межмолекулярной реакции исследовалась в ряде работ как на олигорибо- [5, 6, 8, 10, 27, 28, 30, 37, 41], так и на олигодезоксирибонуклеотидах [4, 28, 30, 31, 38, 39]. При этом было установлено, что сродство фермента к акцептору зависит от его нуклеотидного состава и длины цепи. Олигодезоксирибонуклеотиды на 1—2 порядка менее реакционноспособные акцепторы, чем олигорибонуклеотиды [4, 31, 39]. Минимальная длина акцептора любого типа — тринуклеозидифосфат, динуклеозидмонофосфаты не реакционноспособны [6, 28, 30, 31, 39]. В одной из ранних работ [6] были приведены экспериментальные данные, из которых следует, что динуклеотид  $pApA$  является акцептором в межмолекулярной реакции. Более подробно акцепторные свойства динуклеотидов не исследовались. С увеличением длины цепи акцептора до 5—6 нуклеоти-

дов как для олигорибо-, так и для олигодезоксирибонуклеотидов скорость межмолекулярной реакции несколько увеличивается [5, 8, 28, 30, 31, 39], а при дальнейшем росте длины цепи уменьшается так, что акцепторы длиной в 10–20 нуклеотидов «сшиваются» со скоростью, равной половине от максимальной [30, 31, 39]. В экспериментах с олигорибонуклеотидами было установлено, что сродство РНК-лигазы к основаниям акцептора уменьшается в ряду:  $A > I > C \gg U$  [8, 10, 28, 30], при этом наибольшее значение для взаимодействия с ферментом имеют три ближайших к 3'-концу акцептора нуклеотида [28]. Так, если в любом из этих трех положений находится уридин, сродство РНК-лигазы к такому акцептору существенно уменьшается [28]. В случае олигодезоксирибонуклеотидов данные о влиянии нуклеотидного состава акцептора на его реакционную способность весьма противоречивы [31, 39], и поэтому этот вопрос требует дальнейшего выяснения.

Требования к донору в межмолекулярной РНК-лигазной реакции гораздо менее жесткие, чем к акцептору. Дезоксирибонуклеотидные доноры лишь несколько менее реакционноспособны, чем рибонуклеотидные [4, 27, 28]. Для последних было отмечено некоторое преимущество пиримидиновых доноров перед пуриновыми [5, 27, 28, 37], особенно в реакциях с пиримидиновыми акцепторами [27, 37]. Реакционная способность доноров не зависит от их длины как для РНК [28], так и для ДНК [30]. Минимальная длина донора любого типа — нуклеозид-3',5'-дифосфат [27, 28, 31], нуклеотиды в АТР-зависимой РНК-лигазной реакции неакционноспособны [27, 28]. Модифицированные по гетероциклическим основаниям и сахару нуклеозид-3',5'-дифосфаты по своей реакционной способности незначительно отличаются от их немодифицированных аналогов [41]. В ряде работ было показано, что нуклеозид-2',5'-дифосфаты не являются субстратами для РНК-лигазы [27, 28, 41], вместе с тем ингибиторные свойства этих соединений изучены пока недостаточно. Так, Ингланд и Уленбек сообщают [28], что двукратный избыток  $pA(2')p$  (по отношению к  $pA(3')p$ ) не влияет на скорость реакции «сшивания»  $pA(3')p$  с тетра-нуклеотидом  $(Ap)_3C$ , тогда как Сугиура и соавт. [25] показали, что 1000-кратный избыток  $pA(2')p$  (по отношению к  $(pA)_{20-30}$ ) ингибирует реакцию циклизации  $(pA)_{20-30}$  на 50%.

Альтернативным увеличению концентрации способом сближения концов донора и акцептора при «сшивании» их РНК-лигазой является реакция в комплексе с третьей, адапторной молекулой. Возможен ли такой тип реакции для РНК-лигазы? Однозначный ответ на этот вопрос до сих пор не получен. В случае двуцепочечной ДНК было установлено, что РНК-лигаза не «сшивает» одноцепочечные разрывы [3, 12]. Полученные на ДНК результаты согласуются с данными Кренстона и соавт. [17], которые показали, что 5'-фосфорилированные олигорибоаденилаты, гибридные с  $poly(U)$ , неакционноспособны, но противоречат результатам Личне и соавт. [16] по «сшиванию»  $poly(I)$  в комплексе с  $poly(C)$ .

Выше говорилось, что аденилированный донор обладает способностью реагировать с акцептором в отсутствие АТР (см. раздел 2.1). Эта АТР-независимая стадия РНК-лигазной реакции рассматривается здесь в качестве отдельной реакции ввиду того, что специфичность фермента к аденилированным молекулам резко отличается от специфичности к донору в полной межмолекулярной реакции. В АТР-независимой реакции РНК-лигаза эффективно переносит от двузамещенных пирофосфатов типа  $A(5')ppX$  на 3'-конец олигорибонуклеотидов  $pX$ -часть молекулы, где  $X$  может быть одним из основных рибо- или дезоксирибонуклеозидов [24, 32, 42], нуклеозидом, модифицированным по гетероциклическому основанию [42] или сахарному остатку [26, 42], а также нуклеозидом с защищенной 2',3'-*цис*-диольной группировкой [42]. Более того, специфичность фермента к  $pX$ -части пирофосфата  $A(5')ppX$  настолько незначительна, что в АТР-независимой реакции на 3'-конец олигорибонуклеотида-акцептора



может быть перенесен целый ряд соединений, в том числе и ненуклеотидной природы. Эффективными донорами в этой реакции являются  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\alpha\text{NAD}^+$ ,  $\text{ADP}$ -рибоза,  $\text{FAD}$ , дефосфо- $\text{CoA}$ ,  $\text{ADP}$ -цианоэтанол и  $\text{ADP}$ -нитробензол [24, 29, 43]. Единственная общая черта в строении перечисленных соединений — это фрагмент  $\text{A}(5')\text{pp}-\text{CH}_2-$ . Переносимая группа не может быть фосфатом, так как  $\text{ADP}$  в качестве донора в  $\text{ATP}$ -независимой РНК-лигазной реакции неактивна [24].

В противоположность отсутствию специфичности к переносимой рХ-части молекулы пирофосфата  $\text{A}(5')\text{ppX}$  РНК-лигаза высокоспецифична к остатку  $\text{AMP}$ . Субстраты с модифицированными аденином (симметричный 5'-пирофосфат 8-бромаденозина,  $\epsilon\text{NCD}^+$ , дезамино- $\text{NAD}^+$ ,  $\epsilon\text{NAD}^+$ ) или рибозой (симметричные 5'-пирофосфаты 2'-фтор- и 2'-азидоаденозина,  $\text{CoA}$ ,  $\text{NADP}^+$ ) неактивны [24, 42]. Это наблюдение хорошо согласуется с отмеченной выше высокой специфичностью РНК-лигазы к  $\text{ATP}$  в реакции циклизации. Интересно, что в  $\text{ATP}$ -независимой реакции специфичность РНК-лигазы снижена не только по отношению к рХ-части молекулы донора, но и по отношению к акцептору. В этой реакции, в частности, становятся более реакционноспособными урициловые акцепторы [42].

### 2.3. Необычные свойства РНК-лигазы

Несмотря на значительный прогресс в изучении биохимических свойств РНК-лигазы, биологическая роль этого фермента до сих пор не установлена. В связи с этим заслуживают внимания два свойства РНК-лигазы, именуемые здесь необычными. Так, РНК-лигаза стимулирует катализируемое ДНК-лигазой бактериофага Т4 «сшивание» дуплексной ДНК со спаренными концами [12]. В результате этой реакции образуются более длинные линейные дуплексы с небольшой примесью (до 11%) кольцевых молекул [12]. При концентрации ДНК-лигазы 3 мкг/мл добавление РНК-лигазы до концентрации 60 мкг/мл увеличивает скорость реакции в 20 раз [12]. Сама РНК-лигаза эту реакцию не катализирует [12]. Не «сшивает» она также и одноцепочечные разрывы на дуплексной ДНК, но стимулирует и эту ДНК-лигазную реакцию, хотя и в значительно меньшей степени, чем предыдущую (максимально в 2 раза) [12].

Кроме того, РНК-лигаза осуществляет «пришивание» фибрилл к базальным пластинкам на последней стадии морфогенеза фага Т4 [13]. Реакция «пришивания» фибрилл или ТФА-реакция — единственная ферментативная стадия в процессе сборки интактной частицы фага [44]. Ранее был выделен и исследован ТФА-белок, который катализирует эту реакцию [45]. Физически гомогенная РНК-лигаза осуществляет реакцию «пришивания» фибрилл с удельной активностью, равной таковой для почти гомогенных препаратов ТФА-белка [13]. Оптимальные условия ТФА-реакции существенно отличаются от условий «сшивания» олигонуклеотидов. ТФА-реакция не зависит от  $\text{ATP}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  и не ингибируется при добавлении  $\text{EDTA}$ , неорганического пирофосфата и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в концентрациях, которые полностью подавляют реакцию циклизации полирибонуклеотидов [13]. С другой стороны, обе реакции стимулируются восстанавливающими сульфгидрильные группы реагентами (дитиотреит, 2-меркаптоэтанол) и ингибируются реагентами, блокирующими эти группы [13].  $\text{ATP}$  одинаково увеличивает термостабильность как РНК-лигазы, так и ТФА-белка [13]. Оба белка — продукты одного гена, появляются в клетках *E. coli* одновременно через несколько минут после заражения фагом Т4, и в процессе очистки РНК-лигазы отношение циклизующей и ТФА-активности не изменяется [13]. Таким образом, несмотря на существенное различие условий реакции циклизации и ТФА-реакции, большинство экспериментальных фактов свидетельствует в пользу того, что продукт гена 63 — бифункциональный белок, катализирующий ковалентное «сшивание» нуклеи-

новых кислот и нековалентное «пришивание» фибрилл к базальным пластинкам фага. Механизм ТФА-реакции, как и механизм активации РНК-лигазой ДНК-лигазной реакции, пока не установлен.

### 3. Перспективы использования РНК-лигазы в практике олигонуклеотидного синтеза

#### 3.1. РНК-лигаза и синтез олигорибонуклеотидов

Химический и ферментативный синтез олигорибонуклеотидов с определенной последовательностью гетероциклических оснований до сих пор остается достаточно сложной задачей [15, 46]. В этой связи закономерен интерес многих исследователей к РНК-лигазе — ферменту, способному «сшивать» одноцепочечные олигорибонуклеотиды. Опубликован ряд работ по изучению специфических особенностей этой реакции [5—10, 27, 28, 37, 42, 43], оптимизации условий [23, 28, 40] и практическому применению для синтеза конкретных последовательностей [33, 43, 47—54].

Как было упомянуто выше (см. раздел 2.2), олигорибонуклеотиды с длиной цепи в 8 и более нуклеотидов циклизуются РНК-лигазой со скоростью, значительно превышающей скорость реакции межмолекулярного «сшивания». Поэтому в первой работе [5] межмолекулярная реакция была описана лишь для коротких олигорибонуклеотидов, не способных к циклизации. Для предотвращения побочной реакции самополимеризации донора в этой работе был использован более чем 1000-кратный избыток акцептора. Хотя отношение акцептор — донор в некоторых случаях может быть уменьшено без ущерба для выхода целевых продуктов [8, 33, 37, 50, 53, 54], более универсальным способом предотвращения побочных превращений донора является способ, основанный на блокировании его 3'-конца. Использование доноров с заблокированным 3'-концом позволяет проводить межмолекулярную РНК-лигазную реакцию с олигорибонуклеотидными блоками любой длины при экономичном эквимольном соотношении «сшиваемых» компонентов [9, 10, 23].

Предложено несколько способов блокирования 3'-конца донора. В работе [6] с этой целью *цис*-диольная группировка его 3'-концевого нуклеотида была модифицирована пернодатным окислением. Удобной защитной группой является 3'-фосфат [9, 10, 23, 27, 28, 37, 47]. В случае необходимости его легко ввести с помощью РНК-лигазы [43] и убрать с помощью фосфомоноэстеразы. Проблему блокирования 3'-конца донора решает также введение объемного заместителя в 2'-положение 3'-концевого нуклеотида. В работе [10] в качестве защитной группировки для 2'-гидроксила было предложено использовать  $\alpha$ -метоксиэтильную группу, которая легко удаляется слабой кислотой. Оцука и соавт. [37] с этой целью успешно использовали фотолabileную *o*-нитробензильную группу. Позднее для защиты 3'-концевого нуклеотида донора было предложено использовать 2',3'-циклофосфат (удаляется последовательной обработкой слабой кислотой и фосфомоноэстеразой) [48] и 2',3'-*O*-этоксиметилденную группу (удаляется слабой кислотой) [42, 48]. Применение лабильных защитных групп для блокирования 3'-конца донора позволяет вести катализируемый РНК-лигазой синтез полирибонуклеотидов в любом из двух возможных направлений, поскольку введение фосфата полинуклеотидкиназой в 5'-положение синтезированной молекулы превращает ее в новый защищенный донор, а удаление защитной группы приводит к получению акцептора для последующего удлинения его в 3'-направлении.

Как и в любом многостадийном синтезе, при синтезе полирибонуклеотидов с помощью РНК-лигазы решающее значение приобретает проблема выхода на каждой отдельной стадии элонгации полинуклеотидной цепи. Поэтому попытки оптимизировать условия реакции межмолекулярного «сшивания» олигорибонуклеотидов предпринимались неоднократно [23,

28, 40]. В работе Уленбека и Камерона [23] на примере «сшивания» донора  $(pU)_3pU$  с акцептором  $(Ap)_3C$  при эквимольном соотношении компонентов и температуре  $37^\circ C$  была исследована зависимость скорости реакции от концентрации олигонуклеотидов, АТР, дитиотреита,  $Mg^{2+}$  и pH реакционной смеси. При этом было обнаружено, что насыщающей концентрацией дитиотреита является 1 мМ, а для достижения максимальной скорости реакции достаточен двукратный избыток АТР по отношению к донору. Однако более чем 30-кратное увеличение концентрации дитиотреита сверх насыщающей и 15-кратный избыток АТР (по отношению к донору) не ингибируют реакцию. Начальная скорость реакции линейно увеличивается с увеличением концентрации донора и акцептора от 3,3 мкМ до 0,6 мМ. Ионы  $Mg^{2+}$  оказывают существенное влияние на реакцию. При низкой концентрации  $Mg^{2+}$  в реакционной смеси образуется мало конечного продукта и много промежуточного соединения  $A(5')ppU(pU)_3p$  (II) (см. схему 1). При увеличении концентрации  $Mg^{2+}$  отношение продукт — соединение (II) быстро увеличивается. Оптимальная концентрация  $Mg^{2+}$  для формирования продукта — 10–20 мМ, оптимум pH — 7,9. Реакцию предпочтительнее вести при pH 8,3. Связано это с тем, что оптимумы pH для формирования продукта (7,9) и соединения (II) (7,5) не совпадают, а отношение продукт — соединение (II) является функцией pH: оно минимально при pH 6 и максимально при pH 8,3. Попытка использовать неорганическую пирофосфатазу для увеличения скорости реакции путем разрушения образующегося на первой стадии реакции неорганического пирофосфата (см. схему 1) оказалась безуспешной. Пирофосфатаза увеличивает скорость образования продукта в зависимости от pH в 2–10 раз, но, к сожалению, в еще большей степени стимулирует накопление промежуточного соединения, так что при большинстве значений pH отношение количества продукта к количеству промежуточного соединения существенно уменьшается. Итак, в цитированной работе на примере синтеза новарибонуклеотида  $(Ap)_3Cp(U)_3$  подобраны оптимальные условия «сшивания» РНК-лигазой олигорибонуклеотидов.

Ингланд и Уленбек [28] сравнили реакционную способность в оптимизированных условиях доноров и акцепторов разного нуклеотидного состава и длины. В реакции с акцептором  $(Ap)_3C$  были испытаны в качестве доноров четыре рибонуклеозид-3',5'-дифосфата. Хотя эксперимент продемонстрировал некоторое преимущество пиримидиновых доноров, при увеличении концентрации фермента в реакционной смеси были получены количественные выходы продуктов для всех четырех основных рибонуклеозид-3',5'-дифосфатов. Реакционная способность олигонуклеотидных доноров в этих условиях не отличалась от реакционной способности мононуклеотидных с тем же акцептором и не зависела от длины цепи.

Как видно из табл. 1, реакционная способность акцепторов зависит от их нуклеотидного состава и длины цепи, но при увеличении концентрации фермента в реакционной смеси для всех акцепторов, за исключением уридиловых, достигаются вполне удовлетворительные выходы продуктов. С целью увеличения выхода  $(U)_3Ap$  при «сшивании» донора  $pAp$  с акцептором  $U_3pU$  Ингланд и Уленбек варьировали концентрацию субстратов и состав реакционной смеси. При этом было обнаружено, что увеличение концентрации акцептора не приводит к существенному увеличению выхода целевого продукта, в то время как снижение концентрации  $MgCl_2$  с 20 до 7,5 мМ удваивает его выход. Попытки увеличить выход добавлением солей одновалентных металлов или различных стабилизаторов (глицерин, формамид, мочевины, карбовакс) оказались безуспешными. Исключением является эксперимент с применением 15% диметилсульфоксида, в результате чего выход  $(U)_3Ap$  увеличился более чем в 2 раза. К сожалению, этот эффект не наблюдается в 7,5 мМ  $MgCl_2$ , а также в том случае, когда акцептором служит  $(Ap)_3C$ . На основании приведенных здесь экспериментальных данных Ингланд и Уленбек сделали вывод, что оптимальные

Зависимость выхода продуктов (%) реакции, катализируемой РНК-лигазой, от нуклеотидного состава и длины цепи акцептора при различных концентрациях фермента \*

Акцептор	Концентрация РНК-лигазы, ед. акт./мл				Акцептор	Концентрация РНК-лигазы, ед. акт./мл			
	14	35	170	350		14	35	170	350
ApA	0	0	0	0	(Up) <sub>3</sub> U		4	7	14
(Ap) <sub>2</sub> A	58	84	>95	>95	UpUpC		0	6	11
(Ap) <sub>3</sub> A	66	92	>95	>95	UpU(pC) <sub>2</sub>		13	46	78
(Ap) <sub>4</sub> A	78	93	>95	>95	UpU(pC) <sub>3</sub>		16	42	72
(Ap) <sub>5</sub> A	86	95	>95	>95	UpU(pC) <sub>4</sub>		17	35	57
IpI		0	0	0	UpU(pC) <sub>5</sub>		30	81	100
(Ip) <sub>2</sub> I		2	12	64	ApUpG		2	23	45
(Ip) <sub>3</sub> I		14	59	81	UpApG		4	14	80
(Ip) <sub>4</sub> I		16	53	53	UpCpG		8	46	79
(Ip) <sub>5</sub> I		21	66	87	UpCpA		8	18	32
UpU		0	0	0	GpApC		30	62	95
(Up) <sub>2</sub> U		0	6	15	GpApA		60	77	88
(Up) <sub>3</sub> U		0	5	13	ApApG		31	69	100
(Up) <sub>4</sub> U		0	5	19					

\* Донор pAp [28]; выход рассчитывали по количеству превращенного в продукт акцептора.

условия межмолекулярной реакции при «сшивании» олигорибонуклеотидов могут зависеть от нуклеотидного состава акцептора.

Этот вывод позднее был подтвержден и уточнен в работе [40], в которой были исследованы оптимальные температурные условия межмолекулярной реакции при «сшивании» РНК-лигазой гомогенных олигорибонуклеотидов разного типа и длины. Оказалось, что оптимум температуры данной реакции зависит от типа «сшиваемых» субстратов и pH реакционной смеси, но не зависит от длины акцептора. Обнаруженные закономерности позволили оптимизировать температурные условия РНК-лигазной реакции для субстратов разного типа и в оптимальных для уридиловых акцепторов условиях (20°С; pH 8,7; 48 ч; 1,2 мкМ РНК-лигаза) добиться 95% выхода продуктов в реакции самоконденсации гексарибонуридиловой кислоты [40].

Итак, технологичный источник, наличие эффективных способов очистки и широкая субстратная специфичность РНК-лигазы позволяют считать ее основным инструментом ферментативного синтеза олигорибонуклеотидов с определенной последовательностью гетероциклических оснований. РНК-лигаза пригодна как для ступенчатого наращивания полирибонуклеотидной цепи [24, 27, 28, 32, 42, 47], так и для «сшивания» олигорибонуклеотидных блоков [15], не требует комплементарной матрицы и не катализирует деградацию РНК. Поскольку РНК-лигаза не насыщается донором и акцептором вплоть до 1 мМ концентрации последних, реакцию можно проводить при относительно больших (миллимолярных) концентрациях «сшиваемых» субстратов. При высоких выходах, достигаемых в большинстве случаев, это позволяет получать большое количество продукта с использованием умеренных количеств фермента. Из 100 г биомассы *E. coli*, инфицированной бактериофагом T4, можно получить около 10 мг РНК-лигазы [20]. Этого количества фермента достаточно для количественного присоединения pAp к 280 мг (Ap)<sub>3</sub>C [28].

В настоящее время с помощью РНК-лигазы синтезированы фрагменты нескольких тРНК [33, 37, 48, 50, 53], фрагмент гена бактериофага Q $\beta$ , кодирующего белок оболочки [47], и два олигорибонуклеотида, являющихся моделями мРНК [43, 54]. Однако наибольшим успехом в этой области является, несомненно, осуществленный Оцукой полный химико-ферментативный синтез тРНК<sup>Met</sup> [51, 52].

### 3.2. РНК-лигаза и синтез олигодезоксирибонуклеотидов

Успехи, достигнутые в олигодезоксирибонуклеотидном синтезе, общеизвестны [15]. На их фоне трудно оценить значение экспериментов по применению РНК-лигазы. В этой области опубликовано пока только несколько поисковых работ. Первое сообщение о способности РНК-лигазы катализировать реакцию циклизации одноцепочечных олигодезоксирибонуклеотидов в условиях, аналогичных применяемым к олигорибонуклеотидам, появилось в 1976 г. [3]. Однако выходы продуктов межмолекулярной реакции при «сшивании» в этих условиях олигодезоксирибонуклеотидов были незначительны [4]. Позднее несколькими группами исследователей было показано, что «сшивание» РНК-лигазой олигодезоксирибонуклеотидов с практически приемлемыми выходами возможно лишь в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  [11, 30, 31, 38, 39]. Интересно, что замена  $Mg^{2+}$  на  $Mn^{2+}$  не только увеличивает выход целевых продуктов при «сшивании» олигодезоксирибонуклеотидов, но и снижает одновременно более чем в 3 раза скорость деградации акцептора примесными ДНКазами [38]. Однако при работе с солями  $Mn^{2+}$  возможны осложнения. Так, при температуре ниже  $17^\circ C$   $Mn^{2+}$  в виде соли  $Mn_2P_2O_7$  выводится из реакционной смеси в осадок [38]. Предварительные результаты показывают, что при этом соосаждается неаденилированная РНК-лигаза [38].

В работе Хинтона и соавт. [31] было установлено, что для достижения высоких выходов (более 40%) при «сшивании» олигодезоксирибонуклеотидов кроме ионов  $Mn^{2+}$  необходимы высокие концентрации фермента (до 50 мкМ), длительная инкубация (до 7 сут) при pH 8,3 и низкой температуре ( $17^\circ C$ ) и избыток донора (восьмикратный по отношению к акцептору и четырехкратный по отношению к АТФ).

В подобранных условиях Хинтон и соавт. сравнили реакционную способность различных олигодезоксирибонуклеотидов-акцепторов при «сшивании» их с 2'-дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатами. Результаты этой работы (табл. 2) свидетельствуют о том, что акцепторы  $dA(pdA)_n$ -серии ( $n=2, 3, 4$  и  $11$ ) реагируют с донорами  $pdTp$  и  $pdCp$  с начальными скоростями, различающимися не более чем в 2,5 раза. Наиболее реакционноспособны при этом акцепторы с длиной цепи в 4–5 нуклеотидов. Аналогичная зависимость реакционной способности акцепторов  $dA(pdA)_n$ -серии ( $n=2, 3, 5, 7$  и  $11$ ) от длины цепи при «сшивании» их с донором  $(pdT)_4pdCp$  (при эквимольном соотношении компонентов) была описана в работе [39]. Выходы продуктов, достигнутые Хинтоном и соавт. при «сшивании» олигодезоксирибонуклеотидов с донорами  $pdTp$  и  $pdCp$ , во всех случаях за 6 сут реакции составляли 60–80%.

Варьирование нуклеотидного состава акцептора (см. табл. 2) практически не влияет на его реакционную способность в реакции с донорами  $pdTp$  и  $pdCp$ , за исключением случая с акцептором  $dT(pdT)_7(pdC)_2$ , отличающимся повышенной реакционной способностью. Выходы продуктов, полученные при варьировании нуклеотидного состава акцептора, лежали в пределах 40–50% ( $dU$ ), 60–70% ( $dA, dG$  и  $dT$ ) и 80–100% ( $dC$ ). Противоположный результат был получен при «сшивании» различных акцепторов с донором  $(pdT)_4pdCp$  при эквимольном соотношении компонентов [39]. В этом случае акцептор  $dC(pdC)_5$  обладал наименьшей реакционной способностью. Причина обнаруженного противоречия не установлена.

Хинтон и соавт. сравнили также реакционную способность различных 2'-дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатов в реакции с акцептором  $dT(pdT)_4$ . В этом случае доноры  $pdGp, pdTp, pdUp$  и  $pdAp$  обладали практически одинаковой реакционной способностью, в то время как реакционная способность  $pdCp$  была значительно более высокой (начальная скорость реакции с донором  $pdCp$  в 4–9 раз превышала скорости с остальными донорами). Аналогичная повышенная реакционная способность  $pdCp$  по сравнению с остальными 2'-дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатами в



Зависимость начальной скорости (пмоль/ч) реакции, катализируемой РНК-лигазой, от нуклеотидного состава и длины цепи акцептора (доноры pdTp и pdCp) [31]

Акцептор	pdTp	pdCp	Акцептор	pdTp	pdCp
dApdA	0	0	dA(pdA) <sub>3</sub>	6,3	23
dA(pdA) <sub>2</sub>	3,4	22	dT(pdT) <sub>3</sub>	3,9	22
dA(pdA) <sub>3</sub>	6,2	23	dT(pdT) <sub>7</sub> (pdC) <sub>2</sub>	11,8	73
dA(pdA) <sub>4</sub>	5,2	29	dT(pdT) <sub>7</sub> pdG	3,9	22
dA(pdA) <sub>11</sub>	3,8	11	dU(pdU) <sub>3</sub>	8,6	21

Примечание. Для удобства сравнения значения начальных скоростей реакции отнесены нами к одной концентрации фермента.

реакции с тетрарибонуклеотидом (Ap)<sub>3</sub>C была отмечена также Ингланом и Уленбеком [28]. Выходы, полученные Хинтоном и соавт. для различных доноров за 6 сут реакции, составляли 20, 41, 41, 60 и 63% для pdGp, pdTp, pdUp, pdAp и pdCp соответственно. Несколько более высокий выход продуктов (от 32% для pdGp до 75% для pdAp и pdCp) был зарегистрирован в работе [38] при «сшивании» в аналогичных условиях 2'-дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатов с акцептором dA(pdA)<sub>4</sub>.

Попытка увеличить выход в реакции «сшивания» pdGp с dA(pdA)<sub>4</sub> повышением концентрации донора (при постоянной концентрации акцептора, равной 0,25 мМ) оказалась безуспешной. При увеличении концентрации pdGp от 2 до 10 мМ выход dA(pdA)<sub>4</sub>pdGp упал с 32 до 15% [38]. Ингибирование реакции избытком донора было отмечено также в работе [39] при «сшивании» dA(pdA)<sub>5</sub> с (pdT)<sub>7</sub>pdCp. Авторы объясняют это явление конкуренцией донора с акцептором за место связывания акцептора на молекуле фермента. Увеличение концентрации АТР в реакционной смеси от 0,5 до 1 мМ при постоянных концентрациях донора (2 мМ) и акцептора (0,25 мМ) приводит к увеличению выхода целевого продукта при «сшивании» dA(pdA)<sub>4</sub> с pdGp с 32 до 47% [38]. Однако значительно более высокий выход (72%) был получен при низкой концентрации АТР (~0,1 мМ), поддерживаемой на постоянном уровне АТР-регенерирующей системой (фосфокреатин, креатинкиназа и миокиназа) [38]. АТР-регенерирующая система, состоящая из фосфоенолпируватной кислоты и пируваткиназы, также пригодна для этой цели, но менее эффективна [38].

С целью дальнейшего увеличения выхода продуктов в межмолекулярной РНК-лигазной реакции с олигодезоксирибонуклеотидами авторы работы [38] вносили в реакционную смесь целый ряд соединений. При этом было обнаружено, что добавление этанола, тритона X-100, стеклянных шариков, ДНК-лигазы *E coli* и бактериофага Т4 практически не влияет на реакцию «сшивания» dA(pdA)<sub>4</sub> с 2'-дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатами, в то время как небольшое снижение рН реакционной смеси (с 8,3 до 7,9), добавление РНКазы А (в эквимольном к акцептору количестве) и спермина (до 2 мМ концентрации) увеличивает как начальную скорость, так и выход продуктов в этой реакции. РНКазы А в концентрации, меньшей концентрации акцептора, не влияет на начальную скорость реакции, но увеличивает выход [38]. Вместо спермина с несколько меньшим эффектом могут быть использованы спермидин и путресцин [38]. Влияние рибонуклеазы А и полиаминов на РНК-лигазную реакцию обусловлено, вероятно, способностью этих соединений связываться с одноцепочечными олигодезоксирибонуклеотидами. В противоположность результатам, полученным с РНК-субстратами [28, 29], добавление диметилсульфоксида (до 20% по объему) ингибировало реакцию присоединения pdGp к dA(pdA)<sub>4</sub>, как в присутствии, так и в отсутствие АТР-регенерирующей системы [38].

Однако 10% диметилсульфоксид увеличивал выход при «сшивании»  $dC(pdC)_5$  с  $(pdT)_4pdCp$  [39].

Предложенные в работе [38] усовершенствования позволили при «сшивании» РНК-лигазой акцептора  $dA(pdA)_5$  с пятью различными 2'-дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатами увеличить выход целевых продуктов до 85–95% [38], а также с выходом 40–60% «сшить» два олигодезоксирибонуклеотида —  $dA(pdA)_5$  и  $(pdT)_4pdCp$  [39]. Поэтому, хотя процесс оптимизации условий межмолекулярной РНК-лигазной реакции для ДНК-субстратов не закончен [39], в ближайшее время следует ожидать появления работ, в которых фермент будет использован как инструмент синтеза олигодезоксирибонуклеотидных последовательностей, представляющих практический интерес.

Априорным преимуществом РНК-лигазы перед ДНК-лигазой в олигодезоксирибонуклеотидном синтезе является отсутствие потребности в комплементарной матрице. Синтезированную же с помощью РНК-лигазы одноцепочечную ДНК легко превратить в дуплексную, используя ДНК-полимеразу I [55]. К сожалению, разработанные к настоящему времени условия реакции не позволяют «сшивать» олигодезоксирибонуклеотиды с такой же скоростью, как и олигорибонуклеотиды. Например, в то время как любой из рибонуклеозид-3',5'-дифосфатов может быть присоединен с близким к количественному выходом к тетрарибонуклеотиду  $(Ap)_3C$  менее чем 5 мкМ РНК-лигазой за 1 ч при 37° С [28], реальные выходы с олигодезоксирибонуклеотидами требуют 10–50 мкМ фермента и 2–10 сут инкубации при 17° С [31, 38, 39]. Высокая концентрация фермента и длительная инкубация накладывают в этом случае жесткие ограничения на количества примесных дезоксирибонуклеаз в используемых препаратах РНК-лигазы. 3'-Фосфат в случае олигодезоксирибонуклеотидов не может считаться хорошей защитой 3'-концевого нуклеотида донора. В работе [39] было показано, что при «сшивании» донора  $(pdT)_4pdCp$  с акцептором  $dA(pdA)_5$  идет побочная реакция модификации 3'-конца аденилированного донора (II) (схема 1), особенно интенсивная при избытке АТР. Предполагаемая структура побочного соединения —  $A(5')ppdT(pdT)_3 \cdot pdCpPA$  [39]. Альтернативные способы защиты 3'-концов дезоксирибонуклеотидных доноров в литературе пока не описаны.

### 3.3. РНК-лигаза и синтез смешанных олигонуклеотидов

Олигодезоксирибонуклеотиды являются почти такими же хорошими донорами в РНК-лигазной реакции, как и олигорибонуклеотиды (раздел 2.2). В связи с этим получение смешанных молекул типа РНК — ДНК с помощью РНК-лигазы не представляет особых трудностей. Описаны примеры присоединения 2'-дезоксирибонуклеозид-3',5'-дифосфатов [27, 28, 41], олигодезоксирибонуклеотидов [3, 4, 11, 39] и высокомолекулярных ДНК [30] к олигорибонуклеотидам-акцепторам в условиях, типичных для «сшивания» как олигорибонуклеотидов [3, 4, 27, 28, 41], так и олигодезоксирибонуклеотидов [11, 30, 39]. Синтез смешанных молекул типа ДНК — РНК в принципе также возможен, поскольку найдены условия, в которых олигодезоксирибонуклеотиды являются достаточно эффективными акцепторами (см. раздел 3.2).

### 3.4. РНК-лигаза и синтез модифицированных олигонуклеотидов

Нуклеозид-3',5'-дифосфаты служат эффективными донорами в АТР-зависимой межмолекулярной РНК-лигазной реакции, а соответствующие 2',5'-изомеры не являются в этой реакции ни субстратами, ни ингибиторами (см. раздел 2.2). Это обстоятельство в сочетании с разработанной универсальной методикой синтеза модифицированных нуклеозид-3'(2'),5'-дифосфатов позволило Баррио и соавт. [41] использовать РНК-лигазу для введения модифицированных нуклеотидов на 3'-конец олигорибонуклеоти-

дов. В реакции были использованы непосредственно образующиеся при фосфорилировании нуклеозидов пиррофосфорилхлоридом смеси 3'(2'),5'-изомеров нуклеозиддифосфатов без выделения реакционноспособного компонента. Таким методом в условиях, оптимальных для реакции межмолекулярного «сшивания» олигорибонуклеотидов, Баррио и соавт. к 3'-концу модельного акцептора (Ap)<sub>3</sub>C присоединили с выходом 40–96% пять различных нуклеозид-3',5'-дифосфатов с модифицированными гетероциклическими основаниями (pGp, pGp, pAp, pinAp и pSp) и один — с модифицированным по 2'-положению сахарным остатком (pSp).

Удаление 3'-фосфатного остатка у олигорибонуклеотида с присоединенным к нему модифицированным нуклеотидом превращает продукт в новый возможный акцептор. В качестве примера, иллюстрирующего возможность такой реакции, Баррио и соавт. описывают присоединение донора pAp к модифицированным олигорибонуклеотидам (Ap)<sub>3</sub>CrA и (Ap)<sub>3</sub>CrSm. В этом случае за 18 ч при 4°С выходы продуктов достигали соответственно 85 и 36%. Таким образом, РНК-лигаза позволяет эффективно вводить модифицированные по гетероциклическим основаниям и сахару нуклеотиды и во внутренние позиции олигорибонуклеотидных последовательностей. Относительно низкая реакционная способность акцептора с метилированной 2'-гидроксильной группой рибозы 3'-концевого нуклеотида является, вероятно, следствием стерических препятствий, так как введение в 2'-положение более объемного заместителя ( $\alpha$ -метоксиэтил [10], нитробензил [37]) делает 3'-гидроксильную группу акцептора неактивной.

Чрезвычайно перспективной для получения модифицированных олигорибонуклеотидов является также способность РНК-лигазы в отсутствие АТР переносить от пиррофосфатов типа A(5')ppX на 3'-конец олигорибонуклеотидов-акцепторов рX-часть молекулы [24, 42]. Выше уже приводились данные, что X в этой реакции может быть соединением и не нуклеозидной природы (см. раздел 2.2). Оцука и соавт. [42] ввели недавно таким способом на 3'-конец тринуклеотида ApCrC в условиях, близких к оптимальным для «сшивания» олигорибонуклеотидов, пять производных аденозина (8-бром-, 2'-фтор-, 2'-азидо-, 8,2'-О-цикло- и 8,2'-S-циклоаденозин) и арабинозиладенин. Достигнутые в АТР-независимой реакции выходы продуктов (32–100% [24], 58–95% [42]) позволяют надеяться, что данная реакция окажется полезной для введения на 3'-конец олигорибонуклеотидов радиоактивных меток, антигенных детерминантов, реакционноспособных, флуоресцентных и специфических защитных групп.

Описанные здесь способы получения модифицированных олигорибонуклеотидов в соответствующих условиях применимы, вероятно, и к олигодезоксирибонуклеотидам [31].

### 3.5. Модификация природных полинуклеотидов

В предыдущих разделах настоящей главы было показано, что РНК-лигаза является эффективным инструментом синтеза различных олигонуклеотидов. Однако этот фермент может быть использован и в реакциях с участием молекул природных полинуклеотидов. Описаны примеры использования РНК-лигазы для модификации 3'-концов высокомолекулярных [56, 57] и тРНК [9, 26, 29, 57], 5'-концов 5S рРНК [58] и ДНК [30], а также внутреннего участка тРНК<sup>Phe</sup> [36].

Акцепторные свойства 3'-концов молекул тРНК были детально исследованы Бруком и Уленбеком [29] на модельной реакции присоединения меченого цитидин-3',5'-дифосфата с 3'-концу тРНК<sup>Phe</sup>. Соотношение донор — АТР — акцептор в реакционной смеси было выбрано равным 2 : 5 : 1, а концентрация тРНК<sup>Phe</sup> — 1,2 мкМ, т. е. на 3 порядка меньше, чем обычно используется в межмолекулярных реакциях. При данном соотношении реагентов Брук и Уленбек подобрали условия количественного присоеди-

нения рСр к 3'-концу тРНК<sup>Phe</sup>. Оптимумы рН (7,2–7,8) и концентрации ионов Mg<sup>2+</sup> (10–20 мМ) этой реакции практически не отличаются от приведенных выше значений (см. раздел 3.1) для межмолекулярной реакции с участием олигорибонуклеотидов. В противоположность этим параметрам оптимальные температурные условия реакции (0–15°С) резко отличаются от условий, характерных для «сшивания» олигорибонуклеотидов, и близки к условиям, типичным для «сшивания» олигодезоксирибонуклеотидов. Как и в случае уридиловых акцепторов [28], выход продуктов в реакции с участием тРНК<sup>Phe</sup> существенно увеличивается в присутствии 15–20% диметилсульфоксида. Суммарная тРНК обладает такими же акцепторными свойствами в РНК-лигазной реакции, как и тРНК<sup>Phe</sup>, а модифицированный донор 5-[<sup>125</sup>I]подцитидин-3',5'-дифосфат по своей реакционной способности почти не отличается от его немодифицированного аналога [29].

С целью проверки универсальности данной реакции Ингланд и Уленбек [56] исследовали акцепторные свойства 3'-концов 12 различных высокомолекулярных РНК, включая рРНК, мРНК, двух- и одноцепочечные РНК вирусов, с длиной цепи от ~870 до ~15 000 нуклеотидов. Условия реакции соответствовали описанным выше для тРНК, за исключением того, что концентрация РНК в реакционной смеси была в 5–100 раз меньше (12–220 нМ), а концентрация РНК-лигазы – в 3 раза больше (5 мкМ). Хотя все 12 использованных РНК являлись акцепторами в реакции с мечеными рСр и рАр, выход продуктов существенно варьировал (от 8 до 100%). Различия в реакционной способности высокомолекулярных РНК авторы объясняют возможными различиями в последовательности оснований и вторичной структуре их 3'-концов. Низкий выход (8%) наблюдался, в частности, в случае двухцепочечной РНК реовируса со спаренными (тупыми) концами. Абсолютно неакционноспособны при этом 3'-гидроксильные группы 7-метилгуанозина «кэп»-структур 5'-концов РНК реовируса, вируса мозаики костра или мРНК овальбумина.

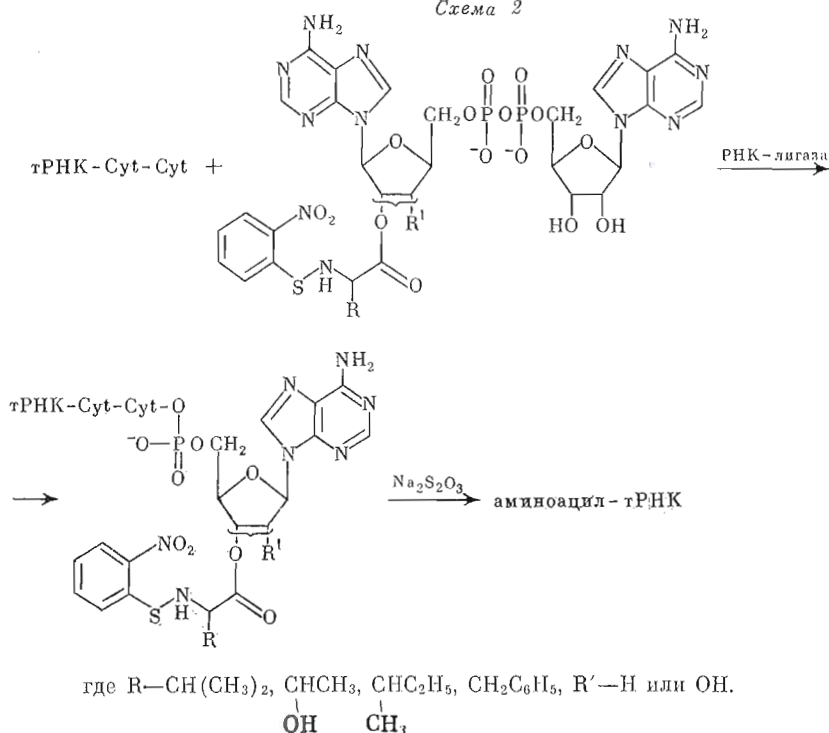
Акцепторные свойства 3'-концов ДНК в РНК-лигазной реакции не исследовались.

Высокая реакционная способность 3'-концов тРНК [29, 57] и большинства исследованных высокомолекулярных РНК [56, 57] в качестве акцепторов в РНК-лигазной реакции позволяет использовать эту реакцию для введения радиоактивной метки на 3'-конец РНК *in vitro*, а также открывает практически неограниченные возможности для модификации этих концов. Введение метки с помощью РНК-лигазы дополняет известные способы мечения РНК *in vitro*, однако имеет перед ними ряд преимуществ [29, 56]. Во-первых, 3'-концы РНК обычно свободны и не требуют предварительной подготовки, в то время как, например, введение метки на 5'-конец РНК с помощью полинуклеотидкиназы требует предварительного удаления 5'-фосфатов или «кэп»-структур. Во-вторых, в РНК-лигазной реакции образуется меньше меченых низкомолекулярных примесей, чем в реакции с полинуклеотидкиназой. Объясняется это тем, что продукты эндонуклеазного гидролиза РНК чаще всего терминированы 3'-фосфатом и 5'-гидроксильной группой и, следовательно, не могут служить акцепторами в РНК-лигазной реакции. В-третьих, в отличие от других способов мечения возможность введения метки с помощью РНК-лигазы не ограничена одним изотопом, так как нуклеозид-3',5'-дифосфаты могут быть получены с <sup>3</sup>H-, <sup>14</sup>C- и <sup>125</sup>I-метками в нуклеозиде или с 5'-<sup>32</sup>P-меткой. И наконец, данная реакция идет с высоким выходом и не требует больших избытков меченых соединений.

В плане модификации 3'-концов РНК следует отметить, что присоединение различных олигорибонуклеотидов к -С-С-А-концам тРНК позволяет конструировать субстраты для изучения специфичности ферментов процессинга тРНК [29]. Взаимодействие же «укороченной» тРНК (тРНК-С-С) с нуклеозид-3',5'-дифосфатами дает возможность достраи-



Схема 2



вать -С-С-концы любыми нуклеотидами, в том числе и модифицированными [29].

3'-Концы тРНК способны также в отсутствие АТР реагировать с пирофосфатами типа А(5')ppX [26, 29]. На этом, в частности, основан предложенный недавно оригинальный метод «химического аминоацилирования» тРНК (см. схему 2) [26]. Данный метод позволяет с выходом 25–79% ацилировать тРНК любыми аминокислотами (в том числе и не природными), а также конструировать аминоацил-тРНК, в которых 3'-концевой аденозин модифицирован или заменен на другой нуклеозид.

Способность 5'-фосфатных концов природных полинуклеотидов (тРНК, 5S рРНК и ДНК) выполнять функции доноров в РНК-лигазной реакции с участием олигорибонуклеотидов-акцепторов была исследована в работах [29, 30, 58]. При этом было обнаружено, что терминированные 5'-фосфатом молекулы ДНК с длиной цепи от 10 до 6000 нуклеотидных пар различной структуры от полностью одноцепочечной ДНК до душной ДНК со спаренными (тулыми) или выступающими (липкими) 5'-концами являются одинаково эффективными донорами в этой реакции [30]. И наоборот, 5'-фосфатные концы интактных 5S рРНК и тРНК<sup>Phe</sup> неактивны при любом варьировании условий реакции, сохраняющих вторичную структуру этих молекул [29, 36, 58]. Образование аденилированного донора (II) (схема 1) в этом случае также незначительно [29, 36]. Брук и Уленбек [29] показали, что низкая реакционная способность 5'-фосфата интактной тРНК<sup>Phe</sup> в РНК-лигазной реакции — следствие стерических препятствий, возникающих при спаривании 5'-концевого остатка гуанозина с противолежащим ему в акцепторном стебле остатком цитидина. Если вторичная структура 5'-конца тРНК нарушена (как в случае тРНК<sup>Met</sup>), то 5'-фосфат такой молекулы реакционноспособен [29]. Аналогичные результаты дало исследование 5'-половинки 5S рРНК, полученной ограниченным гидролизом РНКазой T<sub>2</sub> [58]. Таким образом, реакционная способность 5'-концов природных полинуклеотидов в РНК-лигазной реакции определяется не столько нуклеотидным составом, длиной



цепи или общей конформацией молекулы донора, сколько состоянием его 5'-концевого нуклеотида.

Практическим следствием работ по выяснению реакционной способности 5'-фосфатных концов молекул РНК явилось создание искусственных субстратов для рибонуклеазы М5 — фермента, превращающего предшественник 5S рРНК в 5S рРНК [58]. В данной работе в условиях, оптимальных для «сшивания» олигорибонуклеотидов, к 5'-концам 5'-половинок 5S рРНК с помощью РНК-лигазы было присоединено четыре олигорибонуклеотида: (Ap)<sub>3</sub>C, (Ap)<sub>6</sub>C, (Up)<sub>3</sub>G и (Cp)<sub>6</sub>G. Синтезированные таким способом молекулы после «сплавления» с 3'-половинками 5S рРНК или предшественника 5S рРНК были использованы для тестирования рибонуклеазы М5 и выяснения ее субстратной специфичности. Определенное практическое значение имеет также описанный в работе [30] способ наращивания гомогенными олигорибонуклеотидами разного типа и длины 5'-концов интактных или обработанных рестриктазами (*Hae* III, *Eco* RI) молекул ДНК природного происхождения. Этот способ дополняет известные процедуры удлинения 3'-концов ДНК с помощью полинуклеотидфосфорилазы [59] и концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы [60].

РНК-лигаза является уникальным инструментом модификации концов природных полинуклеотидов, однако с помощью этого фермента можно модифицировать также и внутренние участки молекул РНК в одноцепочечных районах структур типа «петель» или «шпилек». Так, например, была успешно осуществлена модификация антикодоновой петли дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> [36]. В данной работе РНК-лигазой была «защита» брешь в антикодоновой петле, образовавшаяся после удаления 37-го нуклеотида с гипермодифицированным Y-основанием.

Итак, за неполные 10 лет, прошедших со дня открытия РНК-лигазы, был достигнут значительный прогресс в изучении ее биохимических свойств. Полученные результаты позволили широко внедрить данный фермент в практику олигонуклеотидного синтеза. В последние годы к РНК-лигазе увеличился и чисто теоретический интерес. За время подготовки обзора к печати были опубликованы работы, в которых предприняты попытки выяснить биологическую роль этого фермента [61, 62], разобраться в интимном механизме катализируемой им реакции [63], проникнуть в структуру его активного центра [64]. Вместе с тем продолжает расти поток прикладных синтетических работ [65—69], совершенствуются и методы выделения РНК-лигазы [70].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, v. 69, № 10, p. 3009—3013.
2. Kaufmann G., Klein T., Littauer U. Z. T4 RNA ligase: substrate chain length requirements.— FEBS Lett., 1974, v. 46, № 1, p. 271—275.
3. Snopek T. J., Sugino A., Agarwal K. L., Cozzarelli N. R. Catalysis of DNA joining by bacteriophage T4 RNA ligase.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, v. 68, № 2, p. 417—424.
4. Sugino A., Snopek T. J., Cozzarelli N. R. Bacteriophage T4 RNA ligase. Reaction intermediates and interaction of substrates.— J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 5, p. 1732—1738.
5. Walker G. C., Uhlenbeck O. C., Bedows E., Gumpert R. I. T4-induced RNA ligase joins single-stranded oligoribonucleotides.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1975, v. 72, № 1, p. 122—126.
6. Kaufmann G., Kallenbach N. R. Determination of recognition sites of T4 RNA ligase on the 3'-OH and 5'-P termini of polyribonucleotide chains.— Nature, 1975, v. 254, № 5499, p. 452—454.
7. Last J. A., Anderson W. F. Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase.— Arch. Biochem. and Biophys., 1976, v. 174, № 1, p. 167—176.
8. Ohtsuka E., Nishikawa S., Sugiura M., Ikehara M. Joining of ribooligonucleotides with T4 RNA ligase and identification of the oligonucleotide-adenylate intermediate.— Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 6, p. 1613—1623.

9. Юодка Б., Уленбек О. Олигонуклеотиды и нуклеотидопептиды. XXIII. Применение T4 РНК-лигазы для сшивания олигорибонуклеотидов.— Биорган. химия, 1976, т. 2, № 7, с. 898—902.
10. Sninsky J. J., Last J. A., Gilham P. T. The use of terminal blocking groups for the specific joining of oligonucleotides in RNA ligase reactions containing equimolar concentrations of acceptor and donor molecules.— Nucl. Acids Res., 1976, v. 3, № 11, p. 3157—3166.
11. Юодка Б. А. Сшивание олигодезоксирибонуклеотидов с помощью РНК-лигазы.— Биорган. химия, 1976, т. 2, № 11, с. 1583—1584.
12. Sugino A., Goodman H. M., Heyneker H. L., Shine J., Boyer H. W., Cozzarelli N. R. Interaction of bacteriophage T4 RNA and DNA ligases in joining of duplex DNA at base-paired ends.— J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 11, p. 3987—3994.
13. Snopek T. J., Wood W. B., Conley M. P., Chen P., Cozzarelli N. R. Bacteriophage T4 RNA ligase is gene 63 product, the protein that promotes tail fiber attachment to the baseplate.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 8, p. 3355—3359.
14. Соколова Н. Н. ДНК- и РНК-лигазы.— Биохимия, 1976, т. 41, вып. 9, с. 1722—1725.
15. Ikehara M., Ohtsuka E., Markham A. F. The synthesis of polynucleotides.— In: Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. N. Y.: Acad. Press, 1979, v. 36, p. 135—213.
16. Linne T., Öberg B., Philipson L. RNA ligase activity in phage-infected bacteria and animal cells.— Eur. J. Biochem., 1974, v. 42, № 1, p. 157—165.
17. Cranston J. W., Silber R., Malathi V. G., Hurwitz J. Studies on ribonucleic acid ligase. Characterization of an adenosine triphosphate-inorganic pyrophosphate exchange reaction and demonstration of an enzyme-adenylate complex with T4 bacteriophage-induced enzyme.— J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 23, p. 7447—7456.
18. Bedows E., Wachsmann J. T., Gumpert R. I. Absence of detectable RNA ligase activity in eukaryotic cells.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, v. 67, № 3, p. 1100—1107.
19. Higgins N. P., Geballe A. P., Snopek T. J., Sugino A., Cozzarelli N. R. Bacteriophage T4 RNA ligase: preparation of a physically homogeneous, nuclease-free enzyme from hyper-producing infected cells.— Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 9, p. 3175—3186.
20. McCoy M. I. M., Lubben T. H., Gumpert R. I. The purification of nuclease-free T4-RNA ligase.— Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 562, № 1, p. 149—161.
21. Василенко С. К., Веняминаева А. Г., Ямковой В. И., Майоров В. И. РНК-лигаза бактериофага Т4. I. Очистка, тестирование, димерная форма.— Биорган. химия, 1979, т. 5, № 4, с. 621—627.
22. Болезнин М. И., Смолянинов В. В. Выделение ДНК-лигазы, РНК-лигазы, полинуклеотидкиназы и ДНК-полимеразы из клеток *E. coli*, инфицированных фагом Т4.— Биорган. химия, 1980, т. 6, № 6, с. 908—913.
23. Uhlenbeck O. C., Cameron V. Equimolar addition of oligoribonucleotides with T4 RNA ligase.— Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 1, p. 85—98.
24. England T. E., Gumpert R. I., Uhlenbeck O. C. Dinucleoside pyrophosphates are substrates for T4-induced RNA ligase.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 11, p. 4839—4842.
25. Sugiura M., Suzuki M., Ohtsuka E., Nishikawa S., Uemura H., Ikehara M. Purification of T4 RNA ligase by 2',5'-ADP sepharose chromatography.— FEBS Lett., 1979, v. 97, № 1, p. 73—76.
26. Hecht S. M., Alford B. L., Kuroda Y., Kitano S. «Chemical aminoacylation» of tRNAs.— J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 13, p. 4517—4520.
27. Kikuchi Y., Hishinuma F., Sakaguchi K. Addition of mononucleotides to oligoribonucleotide acceptors with T4 RNA ligase.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 3, p. 1270—1273.
28. England T. E., Uhlenbeck O. C. Enzymatic oligoribonucleotide synthesis with T4 RNA ligase.— Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2069—2076.
29. Bruce A. G., Uhlenbeck O. C. Reactions at the termini of tRNA with T4 RNA ligase.— Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 10, p. 3665—3677.
30. Higgins N. P., Geballe A. P., Cozzarelli N. R. Addition of oligonucleotides to the 5'-terminus of DNA by T4 RNA ligase.— Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 3, p. 1013—1024.
31. Hinton D. M., Baez J. A., Gumpert R. I. T4 RNA ligase joins 2'-deoxyribonucleoside 3',5'-bisphosphates to oligodeoxyribonucleotides.— Biochemistry, 1978, v. 17, № 24, p. 5091—5097.
32. Юодка Б. А., Снежуге М. А., Янушоните Л. М., Маркуцкас А. Я. О промежуточных продуктах РНК-лигазной реакции.— Биохимия, 1979, т. 44, вып. 4, с. 599—604.
33. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Антонович Е. Г., Манькин А. С., Прокофьев М. А., Загребельный С. Н., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М., Болезнин М. И., Смолянинов В. В. Ферментативный синтез попануклеотида GpTpUpCpGpApUpCpC—аналога ТФ-петли дрожжевой тРНК<sup>Val</sup>.— Биорган. химия, 1980, т. 6, № 7, с. 1037—1046.
34. Harvey C. L., Gabriel T. F., Wilt E. M., Richardson C. C. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. IX. Synthesis and properties of the deoxyribo-

- nucleic acid adenylate in the phage T4 ligase reaction.— *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, № 14, p. 4523—4530.
35. *Lehman I. R.* DNA ligase: structure, mechanism, and function.— *Science*, 1974, v. 186, № 4166, p. 790—797.
  36. *Kaufmann G., Littauer U. Z.* Covalent joining of phenylalanine transfer ribonucleic acid half-molecules by T4 RNA ligase.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, № 9, p. 3741—3745.
  37. *Ohtsuka E., Nishikawa S., Fukumoto R., Tanaka S., Markham A. F., Ikehara M., Sugiura M.* Joining of synthetic ribotrinucleotides with defined sequences catalyzed by T4 RNA ligase.— *Eur. J. Biochem.*, 1977, v. 81, № 2, p. 285—291.
  38. *Hinton D. M., Gumpert R. I.* The synthesis of oligodeoxyribonucleotides using RNA ligase.— *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 7, № 2, p. 453—464.
  39. *McCoy M. I. M., Gumpert R. I.* T4 ribonucleic acid ligase joins single-strand oligo-(deoxyribonucleotides).— *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 4, p. 635—642.
  40. *Ямковой В. И.* РНК-лигаза бактериофага Т4. II. Оптимальные температурные условия реакции образования межнуклеотидной связи при «спивании» олигорибонуклеотидов.— *Биоорган. химия*, 1980, т. 6, № 12, с. 1808—1812.
  41. *Barrio J. R., Barrio M. C. G., Leonard N. J., England T. E., Uhlenbeck O. C.* Synthesis of modified nucleoside 3',5'-bisphosphates and their incorporation into oligoribonucleotides with T4 RNA ligase.— *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 11, p. 2077—2081.
  42. *Ohtsuka E., Miyake T., Nagao K., Uemura H., Nishikawa S., Sugiura M., Ikehara M.* Elongation of oligonucleotides in the 3'-direction with activated mononucleotides and their analogs using RNA ligase.— *Nucl. Acids Res.*, 1980, v. 8, № 3, p. 601—610.
  43. *Ohtsuka E., Uemura H., Doi T., Miyake T., Nishikawa S., Ikehara M.* A new method for 3'-labelling of polyribonucleotides by phosphorylation with RNA ligase and its application to the 3'-modification for joining reactions.— *Nucl. Acids Res.*, 1979, v. 6, № 2, p. 443—454.
  44. *Ленинджер А. Л.* Биохимия. М.: Мир, 1974, с. 861—865.
  45. *Wood W. B., Henninger M.* Attachment of tail fibers in bacteriophage T4 assembly: some properties of the reaction in vitro and its genetic control.— *J. Mol. Biol.*, 1969, v. 39, № 3, p. 603—618.
  46. *Михайлов С. И., Флоренгель В. Л.* Химический синтез олигорибонуклеотидов.— *Биоорган. химия*, 1976, т. 2, № 10, с. 1293—1317.
  47. *Kikuchi Y., Sakaguchi K.* Enzymatic synthesis of a segment of bacteriophage Q $\beta$  coat protein gene.— *Nucl. Acids Res.*, 1978, v. 5, № 2, p. 591—598.
  48. *Ohtsuka E., Nishikawa S., Markham A. F., Tanaka S., Miyake T., Wakabayashi T., Ikehara M., Sugiura M.* Joining of 3'-modified oligonucleotides by T4 RNA ligase. Synthesis of a heptadecanucleotide corresponding to the bases 61—77 from *Escherichia coli* tRNA<sup>Met</sup>.— *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 23, p. 4894—4899.
  49. *Studies on polynucleotide synthesis. VII. Synthesis of hexadecanucleotide (CUCGUCCACUCGUCCA) with RNA ligase.*— *Шэнъю хуасюэ юй шэнъю ули сюэбао (Acta biochim. et biophys. Sinica)*, 1978, v. 10, № 2, p. 193—198.
  50. *Studies on the synthesis of polynucleotides, synthesis of a dodecaribonucleoside undecaphosphate and a hexadecaribonucleoside pentadecaphosphate.*— *Scientia Sinica*, 1978, v. 21, № 5, p. 687—697.
  51. *Ikehara M., Ohtsuka E.* Полный синтез транспортной рибонуклеиновой кислоты.— *Кагаку (Chemistry)*, 1979, v. 34, № 11, p. 878—884.
  52. *Ohtsuka E.* Искусственный синтез тРНК.— *Тампакусидзу какусан косо (Protein, Nucl. Acid and Enzyme)*, 1980, v. 25, № 1, p. 71—74.
  53. *Ohtsuka E., Nishikawa S., Fukumoto R., Uemura H., Tanaka T., Nakagawa E., Miyake T., Ikehara M.* Synthesis of 5'-fragments of formylmethionine transfer ribonucleic acid and their reconstitution with a natural three-quarter molecule.— *Eur. J. Biochem.*, 1980, v. 105, № 3, p. 481—487.
  54. *Веньяминова А. Г., Франк Л. А., Ямковой В. И.* РНК-лигаза бактериофага Т4. III. Синтез нонарибонуклеотида, содержащего кодон инициации на 5'-конце молекулы.— *Биоорган. химия*, 1981, т. 7, № 1, с. 98—102.
  55. *Richardson C. C., Inman R. B., Kornberg A.* Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. XVIII. The repair of partially single-stranded DNA templates by DNA polymerase.— *J. Mol. Biol.*, 1964, v. 9, № 1, p. 46—69.
  56. *England T. E., Uhlenbeck O. C.* 3'-Terminal labelling of RNA with T4 RNA ligase.— *Nature*, 1978, v. 275, № 5680, p. 560—561.
  57. *England T. E., Bruce A. G., Uhlenbeck O. C.* Specific labeling of 3'-termini of RNA with T4 RNA ligase.— In: *Methods in Enzymology. Vol. 65. Nucleic Acids. Part I.* N. Y.: Acad. Press, 1980, p. 65—74.
  58. *Meyhack B., Pace B., Uhlenbeck O. C., Pace N. R.* Use of T4 RNA ligase to construct model substrates for a ribosomal RNA maturation endonuclease.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 7, p. 3045—3049.
  59. *Gillam S., Waterman K., Smith M.* Enzymatic synthesis of oligonucleotides of defined sequence. Addition of short blocks of nucleotide residues to oligonucleotide primers.— *Nucl. Acids Res.*, 1975, v. 2, № 5, p. 613—624.
  60. *Roychoudhury R., Jay E., Wu R.* Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase.— *Nucl. Acids Res.*, 1976, v. 3, № 4, p. 863—877.

61. David M., Vekstein R., Kaufmann G. RNA ligase reaction products in plasmolyzed *Escherichia coli* cells infected by T4 bacteriophage.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, № 11, p. 5430–5434.
62. Hall D. H., Sargent R. G., Trojatter K. F., Russell D. L. Suppressors of mutations in the bacteriophage T4 gene coding for both RNA ligase and tail fiber attachment activities.—J. Virol., 1980, v. 36, № 1, p. 103–108.
63. Bryant F. R., Benkovic S. J. On the mechanism of T4 RNA ligase.—J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 3, p. 696–697.
64. Юодка Б. А., Маркуцкас А. Я., Спечкуте М. А., Жилинскаене В. Ю., Дрыгин Ю. Ф. О структуре РНК-лигазного-аденилатного комплекса.—Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1733–1734.
65. Neilson T., Gregoire R. J., Fraser A. R., Kofoed E. C., Ganoza M. C. Synthesis of biologically active portions of an intercistronic region by use of a new 3'-phosphate incorporation method to protect 3'-OH and their binding to ribosomes.—Eur. J. Biochem., 1979, v. 99, № 3, p. 429–437.
66. Ohtsuka E., Doi T., Uemura H., Taniyama Y., Ikehara M. Comparison of substrate base sequences for RNA ligase reactions in the synthesis of a tetradecanucleotide corresponding to bases 21–34 of *E. coli* tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>—Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 17, p. 3909–3916.
67. Изучение полинуклеотидного синтеза. VIII. Синтез GpCpm<sup>3</sup>PrΨpGpGp с помощью РНК-лигазы.—Шэньчжэнь хуасяоэ той шэньчжэнь ули сюэбаю, Acta biochim. et biophys. Sinica, 1980, v. 12, № 1, p. 29–36.
68. Желодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. П., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. Синтез аналогов фрагментов антикодонной ветви дрожжевой валиновой тРНК<sub>f</sub>.—Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 4, с. 524–533.
69. Wang G. H., Zhu L. Q., Yuan J. G., Liu F., Zhang L. F. Joining of yeast alanine transfer ribonucleic acid half molecules to form a whole molecule by T4 RNA ligase.—Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 652, № 1, p. 82–89.
70. Dolganov G. M., Chestukhin A. V., Shemyakin M. F. A new procedure for the simultaneous large-scale purification of bacteriophage-T4-induced polynucleotide kinase, DNA ligase, RNA ligase and DNA polymerase.—Eur. J. Biochem., 1981, v. 114, № 2, p. 247–254.

Поступила в редакцию  
12.XII.1980

## BACTERIOPHAGE T4 RNA LIGASE

VENIYAMINOVA A. G., YAMKOVY V. I.

*Novosibirsk State University*

A review concerns the biochemical and physico-chemical properties of the bacteriophage T4 ligase. The methods for isolation, purification and assay of this enzyme are described. The mechanism of action of RNA ligase as well as its specificity are discussed. Several examples of application of this enzyme for the synthesis of oligoribonucleotides, oligodeoxyribonucleotides, mixed and modified oligonucleotides are given, and modification of natural polynucleotides is also exemplified.