



УДК 577.113.6:577.152.277

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, СООТВЕТСТВУЮЩИХ 3'-КОНЦУ РНК ВИРУСА ГРИППА

**Женодарова С. М., Клягина В. П., Седельникова Э. А.,  
Смолянинова О. А., Хабарова М. И.**

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

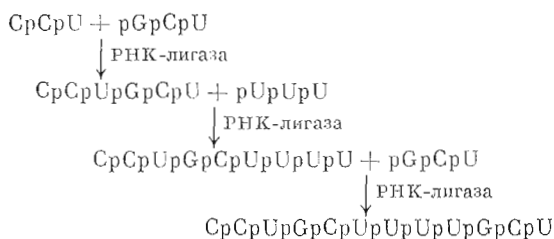
**Белова Е. Н., Манькин А. С.**

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория  
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Синтезирован додекануклеотид СрСрУрГрСрУрУрУрУрГрСрУ, соответствующий 3'-концу РНК вируса гриппа. Исходные блоки СрСрУ, ГрСрУ, рГрСрУ и рСрСрУр были получены ферментативным синтезом с использованием рибонуклеаз различной субстратной специфичности и полинуклеотидфосфорилазы, а рУрУрУ — гидролизом полиуридилевой кислоты эндонуклеазой *Serratia marcescens*. Для «сшивки» блоков применяли РНК-лигазу.

Вирус гриппа — РНК-содержащий вирус с сегментированным геномом [1]. Вирусы гриппа типов А и В имеют восемь сегментов, а типа С — семь; каждый сегмент кодирует вполне определенный вирусный белок. Сравнение 3'-концевых последовательностей этих генов выявило высокую степень консервативности их первичной структуры: многие гены вирусов А и С имеют на 3'-конце додекануклеотид СрСрУрГрСрУрУрУрУрГрСрУ с заменой в остальных случаях четвертого или пятого (с 3'-конца) остатка уридина цитидином [2]. Для понимания биологического смысла этой консервативности, ее роли в функционировании вирусной РНК и решения ряда других задач, связанных с изучением вируса гриппа, необходимо иметь модельные олигорибонуклеотиды, соответствующие 3'-концу вирусной РНК.

Настоящая работа посвящена синтезу додекануклеотида СрСрУрГрСрУрУрУрУрГрСрУ. Схема синтеза предусматривает «сборку» додекануклеотида из предварительно полученных тринуклеотидных блоков с помощью РНК-лигазы:

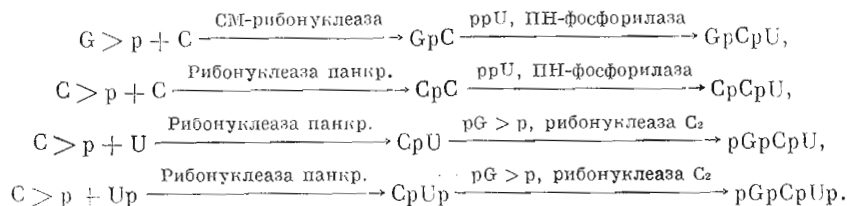


Сборка 12-членного олигонуклеотида из блоков, разумеется, может быть осуществлена и другими способами: из двух предварительно полученных гексануклеотидов, из трех тетрануклеотидов и т. д. Однако с точки зрения удобства получения блоков ферментативным путем наиболее рациональна выбранная нами схема. Почти равноценен ей вариант, включающий в себя сборку по схеме «6+6» (в этом случае добавляется стадия фосфорилирования второго гексануклеотида), все же остальные

Сокращения: ПН-фосфорилаза — полинуклеотидфосфорилаза, СМ-рибонуклеаза — рибонуклеаза, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой.

варианты по тем или иным причинам трудны для ферментативного синтеза. Не исключено, что выход олигонуклеотида будет выше при «сшивке» по схеме «6+6», но при разделении реакционной смеси большие трудности возникают в том случае, когда донор и акцептор имеют одинаковую длину: в результате обычно наблюдаемого частичного дефосфорилирования донора акцепторный гексануклеотид может быть загрязнен донорным.

Исходные блоки — тринуклеозиддифосфаты GrCrU, CrCrU и тринуклеотиды pGrCrU и pGrCrUp — были получены ферментативно в две стадии с использованием рибонуклеаз различной специфичности и ПН-фосфорилазы:



Препаративный синтез GrC, CrU и GrCrU описан нами в работе [3], CrCrU — в работе [4], а pGrCrU — в работе [5]. Тринуклеозиддифосфат CrCrU синтезировали, используя две различные ПН-фосфорилазы: *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus* (табл. 1). CrC более эффективно инициирует синтез CrCrU в присутствии ПН-фосфорилазы *M. luteus*, что наблюдали и для других праймеров [6, 7]. Двукратное увеличение концентрации ПН-фосфорилазы *E. coli* несколько повышает выход CrCrU, но при дальнейшем увеличении выход даже уменьшается.

Результаты препаративного синтеза исходных блоков приведены в табл. 2. Четвертый из необходимых блоков — тринуклеотид pUpUpU — подобно другим гомоолигонуклеотидам легко получается из полиуридилевой кислоты при обработке ее эндонуклеазой *Serratia marcescens* [8].

Для «сшивки» полученных блоков использовали РНК-лигазу Т4\*. «Сшивку» проводили в условиях, описанных нами ранее [8]. Концентрацию фермента меняли в зависимости от структуры субстратов. Реакционные смеси после инактивации фермента разделяли на колонке с DEAE-сефадексом в системе Томлинсона-Тенера. Пики, соответствующие отдельным компонентам, обессоливали на сефадексе G-15 и хроматографировали на бумаге в системе растворителей *n*-пропанол — конц. аммиак — вода (5:1:4). В табл. 3 приведены результаты синтезов с участием РНК-лигазы.

«Сшивка» двух первых блоков (CrCrU+pGrCrU, см. рис. 1а) проходит с довольно хорошим выходом (31%). В литературе отсутствуют примеры синтеза, когда «сшиваемые» РНК-лигазой субстраты имеют на 3'- и 5'-концах остатки уридина и 5'-фосфорилгуанозина соответственно, но часто повторяются данные о неэффективности акцепторов, содержащих уридин в одном из трех положений с 3'-конца [9]. Вероятно, оценивая эффективность субстратов РНК-лигазы, следует одновременно принимать во внимание структуру и донора, и акцептора. Действительно, акцептор, имеющий на 3'-конце остаток уридина, малоэффективен при сшивке с донором, начинающимся с остатка аденинловой кислоты, но хорошо сшивается с донором, начинающимся, например, с цитидиловой кислоты [10].

«Сшивка» GrCrU+pUpUpU, моделирующая следующую стадию (см. схему), проходит почти на 50% (рис. 2а). При замене GrCrU на CrCrUpGrCrU в «сшивке» с pUpUpU (рис. 1б) выход продукта снижается (36%), однако это явление наблюдали и для других субстратов при сравнении акцепторов различной степени удлиненности в 5'-направлении [3].

Для моделирования третьей стадии «сборки» додекануклеотида в качестве акцептора использовали пентануклеотид CrUpUpUpU и гексануклео-

\* РНК-лигаза была выделена В. Ф. Майстренко и Н. М. Пустопиловой в Научно-исследовательском конструкторско-технологическом институте биологически активных веществ (Новосибирск).

Таблица 1

**Синтез тринуклеозиддифосфата СрСрU в присутствии  
ПН-фосфорилаз *E. coli* и *M. luteus*  
[СрС]=0,01 М; [ррU]=0,05 М**

ПН-фосфорилаза	Концентрация фермента, ед. акт./мл	Время, ч	Выход СрСрU, %
<i>E. coli</i>	38	16	9
»	66	16	10
»	76	16	12
»	95	16	11
»	142	16	9
<i>M. luteus</i>	1,5 *	2	20
»	1,5 *	3	22
»	1,5 *	4	20

\* Концентрация ПН-фосфорилазы *M. luteus* приведена в мг/мл.

Таблица 2

**Препаративный синтез олигонуклеотидных блоков**

Субстраты		Фермент	Олигонуклеотид	Выход	
донор	акцептор			мкмоль	% *
G>р	С	СМ-рибонуклеаза	GrC	100	40
C>р	С	Рибонуклеаза панкр.	CrC	200	22
C>р	U	»	CrU	24	12
C>р	Ur	»	CrUr	20	20 **
ррU	GrC	ПН-фосфорилаза <i>E. coli</i>	GrCrU	9	20
ррU	CrC	ПН-фосфорилаза <i>M. luteus</i>	CrCrU	20	20
рG>р	CrU	Рибонуклеаза C <sub>2</sub>	рGrCrU	15	15
рG>р	CrUr	»	рGrCrUr	1	5

\* Определено в расчете на субстрат, взятый без избытка.

\*\* Определено в расчете на субстрат, израсходованный в реакции.

Таблица 3

**Синтез олигонуклеотидов, входящих в состав 3'-конца РНК вируса гриппа,  
в присутствии РНК-лигазы**

Начальная концентрация донора фосфата ~1 мМ

Акцептор фосфата	Донор фосфата	[Акцептор] [Донор]	[РНК-лигаза], ед. акт./мл	Выход		Возврат, %	
				нмоль	%	акцептор	Донор
GrCrU	рUrUrU	2-3	1000	465	47	30	20
CrCrU	рGrCrU	3	1000	545	31	61	22
CrCrUrGrCrU	рUrUrU	2	1000	320	36	35	34
GrCr(Uр) <sub>3</sub> U	рGrCrU	2	3000	10	6	48	30
»	рGrCrUr	1	3000	23	7	50	40
CrCrUrGrCr(Uр) <sub>3</sub> U	»	1	3000	61	8	30	40

тид GrCrUrUrUrU. Оказалось, что в первом случае при концентрации фермента 1000 ед. акт./мл, несмотря на двукратный избыток акцептора, образуется в основном продукт «самоконденсации» донора фосфата — гексануклеотид рGrCrUrGrCrU (7,5%). При повышении концентрации РНК-лигазы до 2500 ед. акт./мл были выделены оба продукта: CrUrUrUrUrGrCrU и рGrCrUrGrCrU с выходами в обоих случаях ~5%. При концентрации 5000 ед. акт./мл октануклеотид образуется с таким же выходом. Поэтому «сшивку» GrCrUrUrUrU и рGrCrU проводили при концентрации РНК-лигазы 3000 ед. акт./мл и получили новануклеотид GrCrUrUrUrUrGrCrU с выходом ~6% (рис. 2б).

Замена донора рGrCrU на рGrCrUr, содержащий 3'-концевой фосфатный остаток, исключаяющий «самоконденсацию», позволила использовать эквивалентные концентрации донора и акцептора фосфата. Пик III на

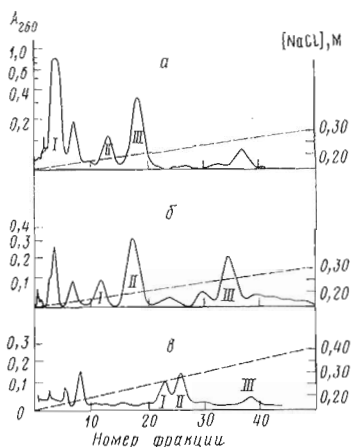


Рис. 1

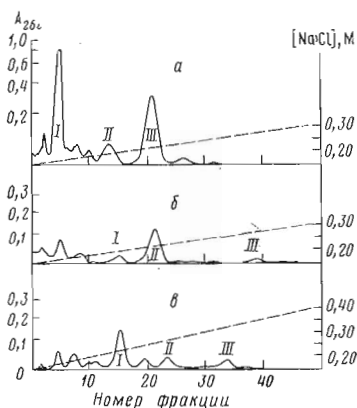


Рис. 2

Рис. 1. Разделение реакционных смесей, полученных в синтезе додекануклеотида на колонке (0,9×22 см) с DEAE-сефадексом А-25 в системе Томлинсона-Тенера. а – первая «сшивка»: I – СрСрU, II – рGrCpU, III – СрCpUpGrCpU; б – вторая «сшивка»: I – рUpUpU, II – СрCpUpGrCpU, III – СрCpUpGrCpUpUpUpU; в – третья «сшивка»: I – рGrCpUp, II – СрCpUpGrCp(Up)<sub>3</sub>U, III – СрCpUpGrCpUpUpUpUpGrCpUp

Рис. 2. Разделение реакционных смесей, полученных в синтезах, моделирующих отдельные стадии синтеза додекануклеотида, в условиях, приведенных на рис. 1. а – вторая «сшивка»: I – GrCpU, II – рUpUpU, III – GrCpUpUpUpU; б – третья «сшивка»: I – рGrCpU, II – GrCpUpUpUpU, III – GrCpUpUpUpUpGrCpU; в – третья «сшивка»: I – GrCpUpUpUpU; II – рGrCpUp, III – GrCpUpUpUpUpGrCpU (p)

рис. 2в содержит продукт, не изменяющийся при обработке щелочной фосфатазой *E. coli*, т. е. не имеющий конечного фосфатного остатка. По-видимому, нонануклеотид в процессе выделения теряет 3'-концевую фосфатную группу. Прямое химическое секвенирование по методу Питти [11] подтвердило структуру нонануклеотидов СрCpUpGrCpUpUpUpU и GrCpUpUpUpUpGrCpU (рис. 3а, б).

Нонануклеотид СрCpUpGrCpUpUpUpU и тринуклеотид рGrCpUp «сшивали» РНК-лигазой при концентрации фермента 3000 ед. акт./мл. Выход додекануклеотида составил ~8%. Таким образом, переход от более короткого акцептора (гексануклеотидного) к более длинному (нонануклеотидному, в котором шесть нуклеотидных остатков с 3'-конца повторяют структуру гексануклеотида) в этом случае не сопровождался уменьшением выхода в РНК-лигазной реакции. Полученный результат отличается от наблюдавшегося при описанном выше переходе от тринуклеотидного акцептора к гексануклеотидному, а также от литературных данных: в работе [12] при «сшивании» одного и того же гексануклеотидного донора с гексануклеотидом и ундекануклеотидом, в котором шесть остатков с 3'-конца повторяют структуру гексануклеотида, получили целевые продукты с выходом соответственно 16 и 5%. По-видимому, это расхождение может быть связано или с разной длиной субстратов, в частности донора фосфата (тринуклеотид в настоящей работе и гексануклеотид в работе [12]), или с субстратной специфичностью РНК-лигазы (нуклеотидный состав и последовательность нуклеотидов в субстратах для обсуждаемых случаев совершенно различны), или, что не менее вероятно, с тем, что при «сшивании» гексануклеотида GrCpUpUpUpU и тринуклеотида рGrCpUp можно подобрать условия для получения более высокого выхода, чем достигнутый нами в настоящей работе.

Для определения нуклеотидной последовательности к додекануклеотиду, обработанному фосфомоноэстеразой *E. coli*, присоединяли [5'-<sup>32</sup>P]рCp с помощью РНК-лигазы и подвергали прямому химическому секвенированию [11]. После разделения образующегося набора фрагментов электрофорезом в полиакриламидном геле получили автордиограмму, подтверждающую структуру додекануклеотида (рис. 3в).

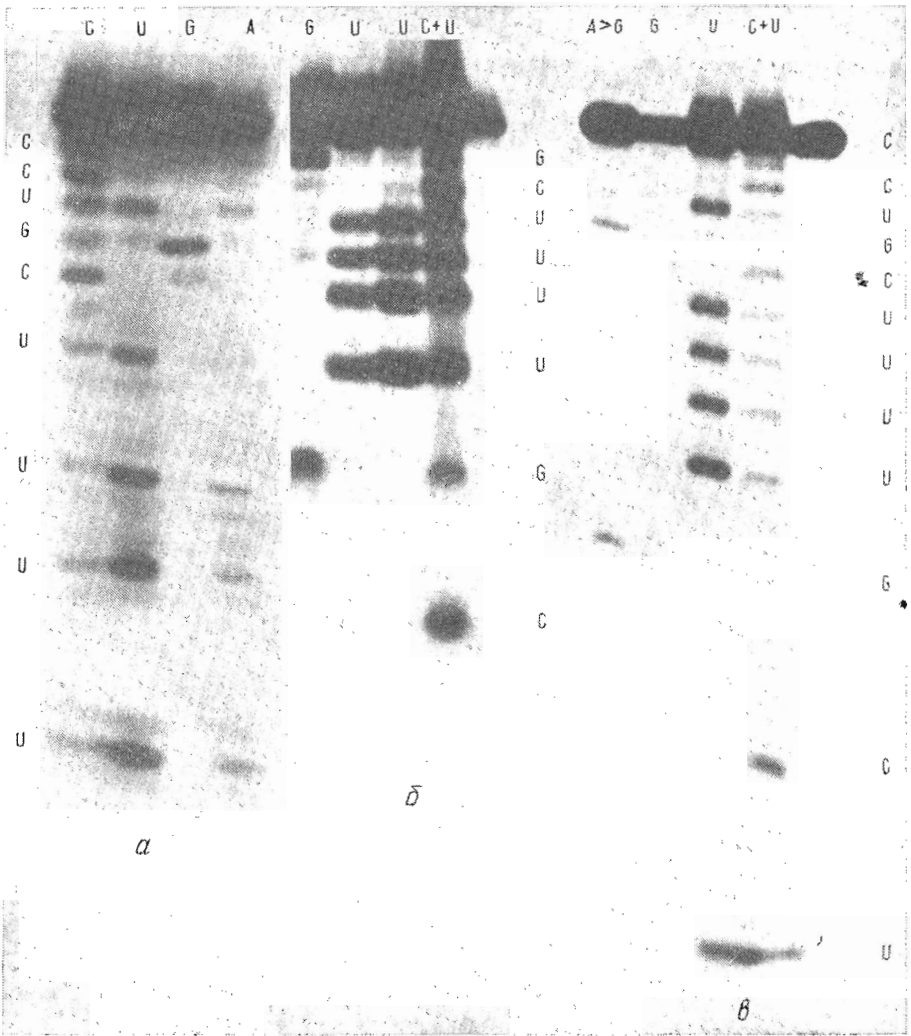


Рис. 3. Радиоавтограмма полиакриламидного геля, полученная при определении первичной структуры  $CpCpUpGpCpUpUpUpU$  (а),  $GpCpUpUpUpUpGpCpU$  (б) и  $CpCpUpGpCpUpUpUpUpUpGpCpU$  (в) по методу Питти [11]. XС - положение красителя ксиленицианола, ВР - бромфенолового синего, К - контроль (исходный олигонуклеотид)

### Экспериментальная часть

В работе использовали цитидин, уридин, натриевые соли 2'(3')-фосфатов цитидина и уридина, UDP и АТР, панкреатическую рибонуклеазу (Reanal, Венгрия), циклогексилгуанидиниевую соль гуанозин-2',3'-циклофосфата, DEAE-целлюлозу Cellex D, ПН-фосфорилазу *M. luteus* (Calbiochem, США), мета-*n*-толуолсульфонат *N*-циклогексил-*N'*-(2-морфолиноэтил)карбодимид, дитиоэритрит (Serva, ФРГ), сефадексы G-10, G-15, DEAE-сефадекс А-25 (Pharmacia, Швеция), ПН-фосфорилазу *E. coli* и эндонуклеазу *Ser. marcescens* отечественного производства.

Цитидин-2',3'-циклофосфат, нуклеозид-2'(3'),5'-дифосфаты и соответствующие 5'-фосфорилнуклеозид-2',3'-циклофосфаты синтезировали как описано в работах [5, 8]. Циклогексилгуанидиниевую соль G>p превращали в аммониевую соль обработкой дауэксом 50 W ( $NH_4^+$ -форма).

Неспецифичная рибонуклеаза *Penicillium brevicompactum* (КФ 2.7.7.17), ковалентно связанная с СМ-целлюлозой, была приготовлена как описано в работе [13]. Гуанилспецифичная рибонуклеаза *Aspergillus clavatus* С<sub>2</sub> (КФ 2.7.7.26) получена от С. И. Безбородовой (ВНИИ генети-

ки и селекции промышленных микроорганизмов). РНК-лигаза Т4 была выделена В. Ф. Майстренко и Н. М. Пустошиловой (НИКТИ БАВ, Новосибирск).

Хроматографию и электрофорез на бумаге, микроколоночную хроматографию и УФ-спектрофотометрию проводили в соответствии с работой [8]. Олигонуклеотиды, представленные в табл. 2, получали как описано в работах [3–5]. Тринуклеозиддифосфат СрСрU синтезировали в условиях, указанных в табл. 1. Обработку реакционной смеси и препаративное выделение проводили в соответствии с работой [6]. Тринуклеотид рUpUpU выделяли из гидролизата poly(U), обработанного эндонуклеазой *Ser. marcescens*, как описано в работе [8].

Синтезы олигонуклеотидов с участием РНК-лигазы Т4 и разделение реакционных смесей проводили в условиях, подробно описанных в работе [8]. Результаты синтезов представлены в табл. 3.

Авторы приносят сердечную благодарность С. И. Безбородовой, В. Ф. Майстренко и Н. М. Пустошиловой за ферментные препараты, а также сотрудникам кафедры химии природных соединений МГУ В. Л. Друце и А. А. Пурмалю за содействие в проведении колоночной хроматографии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Каверин Н. В. Молекулярная биология, 1980, т. 14, № 2, с. 245–260.
2. Desselberger U., Rasaniello V. R., Zarra J. J., Palese P. Gene, 1980, v. 8, № 3, p. 315–328.
3. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. Биоорганическая химия, 1982, т. 8, № 8, с. 1077–1083.
4. Хабарова М. И., Смолянинова О. А., Багдопас А. С., Коваленко М. П., Женодарова С. М. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 6, с. 740–744.
5. Женодарова С. М., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Антонович Е. Г. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1516–1521.
6. Женодарова С. М., Клягина В. П., Смолянинова О. А. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1505–1515.
7. Ренлоф Р. Ф., Шеринь Л. А., Микелсоне Л. Х., Грен Э. Я. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 2, с. 228–235.
8. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Смолянинова О. А., Хабарова М. И., Майстренко В. Ф., Пустошилова Н. М. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 4, с. 524–533.
9. England T. E., Uhlenbeck O. C. Biochemistry, 1978, v. 17, № 11, p. 2069–2076.
10. Kikuchi Y., Hishinuma F., Sakaguchi K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 3, p. 1270–1273.
11. Peattie D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 76, № 4, p. 1760–1764.
12. Ohtsuka E., Nishikawa S., Markham A. F., Tanaka S., Miyake T., Wakabayashi T., Ikehara M., Sugiura M. Biochemistry, 1978, v. 17, № 23, p. 4894–4899.
13. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 5, с. 736–742.

Поступила в редакцию  
23.II.1983

#### ENZYMATIC SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES CORRESPONDING TO THE 3'-TERMINUS OF INFLUENZA VIRUS RNA

ZHENODAROVA S. M., KLYAGINA V. P., SEDELNIKOVA E. A.,  
SMOLYANINOVA O. A., KHABAROVA M. I., BELOVA E. N.,  
MAN'KIN A. S.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR, Pushchino;  
A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,  
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

Dodecanucleotide CpCpUpGpCpUpUpUpUpGpCpU corresponding to 3'-terminus of influenza virus RNA has been synthesized. The initial blocks CpCpU, GpCpU, pGpCpU and pGpCpUp were prepared enzymatically in the presence of ribonucleases of different substrate specificity and polynucleotide phosphorylase *M. luteus*. pUpUpU was obtained by enzymatic degradation of polyuridylic acid. The initial blocks were joined by T4 RNA-ligase.