

УДК 57.036:577.113.3

Каскад термофильных ферментов как инструмент создания модифицированных нуклеотидов

Р. С. Есипов^{*}, Ю. А. Абрамчик, И. В. Фатеев, И. Д. Константинова, М. А. Костромина, Т. И. Муравьева, К. Г. Артемова, А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: esipov@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 09.11.2015

Принята к печати 06.06.2016

РЕФЕРАТ Предложена новая стратегия биосинтеза биологически важных нуклеотидов, заключающаяся в мультиферментативном каскадном превращении *D*-пентоз в пуриновые нуклеотиды с использованием ферментов нуклеинового обмена термофильных микроорганизмов (рибокиназы, фосфорибозилпирофосфатсинтетазы и аденин-фосфорибозилтрансферазы). Клонирован ген рибокиназы термофильного микроорганизма *Thermus* sp. 2.9, два разных гена фосфорибозилпирофосфатсинтетазы (PRPP-синтетазы) и ген аденин-фосфорибозилтрансферазы (APR-трансферазы) из *Thermus thermophilus* HB27. Получены высокопродуктивные штаммы-продуценты *Escherichia coli*, разработаны методы выделения упомянутых ферментов, изучена их субстратная специфичность. Показана возможность использования этих ферментов для превращения *D*-пентоз в 5-фосфаты, а затем под действием рибокиназы и PRPP-синтетаз – в 5-фосфо- α -*D*-пентофуранозо-1-пирофосфаты, конденсация которых с аденином и рядом его структурных аналогов, катализируемая APR-трансферазой, приводила к получению искомым нуклеотидов. На примере 2-хлор(фтор)-аденозинмонофосфата (2Cl-AMP и 2F-AMP) показана возможность использования системы термофильных ферментов в одном реакционном объеме для получения биологически активных нуклеотидов из *D*-рибозы и соответствующих гетерооснований в присутствии АТФ, рибокиназы, PRPP-синтетазы и APR-трансферазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденин-фосфорибозилтрансфераза термофильных микроорганизмов, рибокиназа, субстратные свойства, ферментативный синтез нуклеотидов, фосфорибозилпирофосфатсинтетаза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БСА – бычий сывороточный альбумин; ИПТГ – изопропил- β -*D*-1-тиогактопиранозид; ПААГ – полиакриламидный гель; ПМСФ – фенилметансульфонилфторид; ПЦР – полимеразная цепная реакция; APR-трансфераза (*Tth*APRT) – аденин-фосфорибозилтрансфераза из *Thermus thermophilus*; LB – среда Луриа-Бертани (*Luria-Bertani*); PRPP-синтетаза (*Tth*PRPPS) – фосфорибозилпирофосфатсинтетаза из *T. thermophilus*; RK (*Tsp*RK) – рибокиназа из *Thermus* sp.; 2Cl-AMP – 2-хлораденозин-5'-монофосфат; 2F-AMP – 2-фтораденозин-5'-монофосфат; Pi – неорганический фосфат; PRPP – 5-фосфорибозил- α -1-пирофосфат.

ВВЕДЕНИЕ

5'-Фосфорилированные нуклеозиды являются важными метаболитами биосинтеза ДНК и РНК, а также косубстратами и кофакторами огромного числа биохимических превращений [1–3]. Важная роль этих соединений в живой клетке определяет интерес к синтезу не только природных представителей этого класса, но и их разнообразных аналогов с целью направленного влияния на метаболизм в норме и при патологии [4–8]. Большое число нуклеозидов, модифицированных по гетерооснованию и углеводному фрагменту, используются в качестве важных средств против вирусных инфекций и зло-

качественных новообразований [9–13]. Действие модифицированных нуклеозидов опосредовано через внутриклеточное превращение в первую очередь в 5'-монофосфаты и далее, как правило, в 5'-ди- и трифосфаты, которые и выступают в качестве антиметаболитов. Известно, что первая стадия метаболической активации модифицированных нуклеозидов – превращение в 5'-монофосфаты – определяет их биологические свойства. Следует также отметить, что нуклеозид-5'-монофосфаты, модифицированные по гетерооснованию и/или по углеводному фрагменту, представляют значительный интерес в качестве исходных соединений для хи-

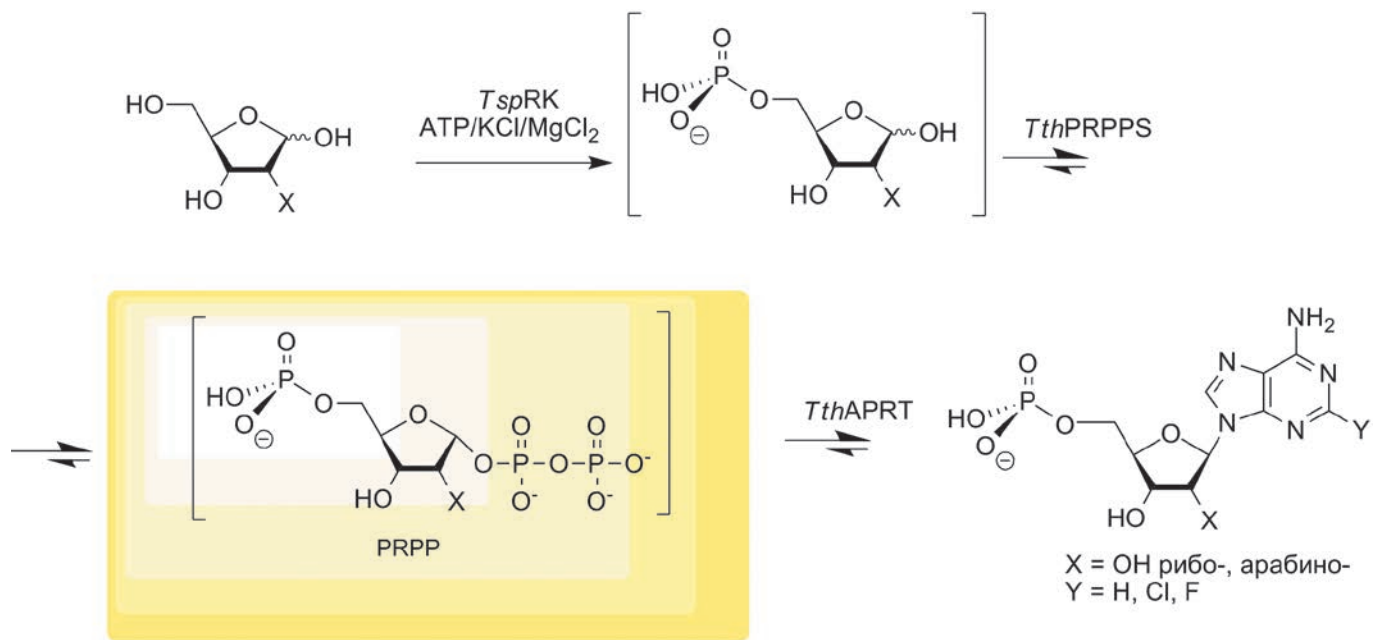


Рис. 1. Схема полиферментативного каскадного синтеза модифицированных аденозин-5'-монофосфатов

мического синтеза производных по фосфату (пролекарств) и ферментативного превращения в 5'-трифосфаты для последующего включения в олигонуклеотиды [14–16]. Разработка эффективных биосинтетических подходов к получению 5'-монофосфатов модифицированных нуклеозидов привлекает большое внимание исследователей, работающих в области повышения эффективности химиотерапевтических средств.

Моно- и полиферментативному синтезу нуклеозид-5'-моно- и 5'-трифосфатов посвящено большое число публикаций [17–21], среди которых наше внимание привлекли фосфорибозилтрансферазы, недавно успешно использованные в каскадном пятикомпонентном синтезе пуриновых рибозид-5'-монофосфатов [22–24]. Известно, что нуклеозид-фосфорилазы термофильных микроорганизмов менее чувствительны к структуре субстратов [25, 26], что позволяет работать при 70–80°C и существенно увеличивает эффективность ферментативной реакции за счет повышения растворимости гетероциклических субстратов [27]. Все эти данные вызвали наш интерес к получению рекомбинантных ферментов: рибокиназы, фосфорибозилпирофосфат-синтетазы и аденин-фосфорибозилтрансферазы из термофильных микроорганизмов и изучению их субстратных свойств с целью определения потенциала этих ферментов в каскадном синтезе пуриновых нуклеозид-5'-монофосфатов согласно схеме на рис. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование

Гены TT_RS05985, TT_RS06430, TT_RS06315, кодирующие *TthPRPPS1*, *TthPRPPS2* и *TthAPRT*, соответственно амплифицировали на матрице геномной ДНК штамма *Thermus thermophilus* HB27 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием синтетических праймеров. Ген QT17_05185, кодирующий РК из *Thermus* sp. 2.9, был оптимизирован по встречаемости кодонов для экспрессии в *Escherichia coli* и синтезирован химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов. Все гены клонировали в экспрессионный вектор pET-23d+ по сайтам узнавания рестриктаз NcoI и XhoI.

Культивирование штаммов-продуцентов

Штаммы *E. coli* BL21(DE3), Rosetta(DE3) и C3029/pGTf2 трансформировали полученными экспрессионными векторами pER-PRPPS1-Tth, pER-PRPPS2-Tth, pER-APRT-Tth и pER-RK-Tsp. Штаммы-продуценты, производные *E. coli* BL21(DE3) и Rosetta(DE3), культивировали при 37°C в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование штаммов-продуцентов, производных *E. coli* C3029/pGTf2, проводили в среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, 20 мкг/мл хлорамфеникола и 1 нг/мл тетрациклина. После достижения культурами оптической плотности

$A_{595} = 0.8$ вносили ИПТГ до конечной концентрации 0.4 мМ и продолжали культивирование при 23 и 37°C. Длительность выращивания варьировала от 4 до 16 ч в зависимости от штамма. По окончании культивирования клеточную биомассу отделяли центрифугированием, гомогенизировали в соотношении 1 : 10 (w/v) в буферном растворе 50 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 150 мМ NaCl, 2 мМ ПМСФ и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic P (Sartorius, Германия) в течение 10 мин при 4°C (цикл – 0.4 с, амплитуда – 30%). Содержание целевых ферментов в растворимой и нерастворимой клеточных фракциях определяли денситометрическим анализом электрофоретических гелей с помощью программы ImageLab 5.0 (Bio-Rad, США) [28]. Выбор остановили на штаммах-продуцентах, содержащих максимальное количество целевого белка в супернатанте: *E. coli* BL21(DE3)/pER-APRT-Tth (культивирование в течение 4 ч при 37°C после внесения ИПТГ), *E. coli* Rosetta(DE3)/pER-PRPPS1-Tth (4 ч при 37°C), *E. coli* C3029/pGTf2/pER-PRPPS2-Tth (5 ч при 37°C) и *E. coli* C3029/pGTf2/pER-RK-Tsp (16 ч при 23°C). Штаммы выращивали в 5–6 л культуральной среды.

Выделение и очистка *TthPRPPS1*, *TthPRPPS2* и *TspRK*

Клеточную биомассу штаммов-продуцентов *TthPRPPS1*, *TthPRPPS2* и *TspRK* ресуспендировали в буферном растворе 50 мМ Трис-НСl, рН 8.7, 1 мМ ПМСФ в соотношении 1 : 10 (w/v) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic P в течение 20 мин при +4°C (цикл – 0.5 с, амплитуда – 50%). Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 30 мин при +4°C на центрифуге Hermle Z383K (HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). При выделении *TspRK* осветленный клеточный лизат подвергали термической обработке в течение 10 мин при 65°C для осаждения примесных белков и ДНК. Осадок отделяли центрифугированием. Дальнейшее выделение ферментов осуществляли по одной схеме. Осветленный клеточный лизат наносили на колонку XK 16/20 (GE Healthcare, США) с сорбентом Ni²⁺-IDA (Qiagen, Германия), предварительно уравновешенным буферным раствором 50 мМ Трис-НСl, рН 8.7. Отмывали от балластных белков буферным раствором 50 мМ Трис-НСl, рН 8.7, 50 мМ имидазол. Целевой белок элюировали буферным раствором 50 мМ Трис-НСl, рН 8.7, 200 мМ имидазол. После аффинной хроматографии к фракциям, содержащим целевой белок, добавляли EDTA до 5 мМ и концентрировали при помощи ультрафильтрационной ячейки Amicon 8200 объемом 200 мл (Millipore, США) на мембране YM 10 кДа (Millipore) при выделении *TthPRPPS1*

и *TthPRPPS2*, YM 30 кДа (Millipore) при выделении *TspRK*. Последующую очистку проводили на колонке HiLoad 16/60 с сорбентом Superdex 200 (GE Healthcare) в буферном растворе 20 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 1 мМ АТФ, 1 мМ MgCl₂, 5% глицерина, 0.04% NaN₃. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали с помощью ультрафильтрации до конечной концентрации 12 ± 1 мг/мл как описано ранее. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд, используя БСА в качестве стандарта [29]. Чистоту белка определяли с помощью белкового электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [28]. Выделенные ферменты хранили при -80°C.

Выделение и очистка *TthAPRT*

Разрушение клеточной биомассы штамма-продуцента *TthAPRT* осуществляли по методике, описанной для других ферментов. В осветленный клеточный лизат добавляли NaCl до концентрации 300 мМ и проводили термическую обработку в течение 10 мин при 65°C. После осаждения осадка белка центрифугированием лизат наносили на колонку PD-10 с сорбентом Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare, США), уравновешенным буферным раствором 20 мМ Трис-НСl, рН 9.0, 1.0 мМ EDTA. Раствор белка после обессоливания наносили на колонку XK 16/20 с сорбентом Q Sepharose XL (GE Healthcare, США), уравновешенным тем же буферным раствором. Целевой белок элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (от 0 до 400 мМ). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и наносили на колонку XK 16/20 с Phenyl Sepharose HP (GE Healthcare, США), уравновешенной буферным раствором, содержащим 20 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 1 М (NH₄)₂SO₄, 1.0 мМ EDTA. *TthAPRT* элюировали в линейном градиенте (NH₄)₂SO₄ (от 1 до 0 М). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией на полисульфоновой мембране PBGC 10 кДа до конечной концентрации 5.0 ± 0.5 мг/мл как описано ранее. Окончательную очистку проводили на колонке HiLoad 16/60 с сорбентом Superdex 200 20 мМ Трис-НСl-буфере рН 8.0, содержащем 50 мМ NaCl, 5% глицерина, 0.04% NaN₃. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали путем ультрафильтрации до конечной концентрации 12 ± 1 мг/мл. Концентрацию и чистоту белка определяли как описано ранее [28, 29]. Выделенный фермент хранили при -80°C.

Определение активности ферментов

Активность *TspRK* определяли радиохимическим методом по образованию *D*-рибофуранозо-5-[³²P]-фосфата в присутствии [³²P]АТФ. Реакционная

смесь (0.05 мл, 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0) содержала 0.4 мМ динатриевой соли АТР, 1 мМ *D*-рибозы, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 1 мМ КН₂РО₄, 6 мкКи [γ-³²P]АТР и 0.15 мкг *Tsp*RK. Смесь термостатировали при 75°C. Аликвоты (0.8 мкл) отбирали через 10, 20 и 40 мин и наносили на пластинки с PEI-целлюлозой, затем элюировали водным 0.5 М дигидроортофосфатом калия. Количество образовавшегося *D*-рибофуранозо-5-[³²P]фосфата определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике TRI-CARB 2100TR (Packard BioScience Co.).

Активность *Tth*PRPPS1 и *Tth*PRPPS2 определяли в реакционной смеси, состоящей из 1 мМ динатриевой соли АТР, 1 мМ динатриевой соли *D*-рибозо-5-фосфата, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ КН₂РО₄, 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, при 75°C. Добавляли 0.75 мкг *Tth*PRPPS на 0.5 мл смеси.

Активность *Tth*APRT определяли в реакционной смеси, содержащей 1 мМ аденина, 1 мМ пентанатриевой соли 5-фосфорибозил-α-1-пирофосфата (PRPP), 5 мМ MgCl₂, 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, при 75°C. *Tth*APRT добавляли из расчета 0.125 мкг на 0.5 мл реакционной смеси. За единицы активности принимали количество продукта (мкмоль), образующееся за 1 мин.

Определение кинетических параметров рибкиназы

Реакционная смесь (0.5 мл, 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0) содержала (а) динатриевую соль АТР (от 0.01 до 0.6 мМ) и *D*-рибозу (1 мМ); (б) *D*-рибозу (от 0.01 до 8.0 мМ) и АТР (1 мМ) для определения значений K_M и V_{max} для АТР и *D*-рибозы соответственно, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 10 мМ КН₂РО₄ и 0.0175 мкг *Tsp*RK. Для каждого эксперимента готовили 16 реакционных смесей. Смеси термостатировали при 75°C в течение 12 мин, каждый эксперимент повторяли трижды. Затем определяли среднее значение скорости в трех опытах с одинаковой концентрацией фермента. Концентрации субстрата и продукта определяли с помощью ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования 0.1 М КН₂РО₄ (вода, рН 6.0, скорость потока 0.5 мл/мин) с измерением на длине волны 254 нм (УФ-детектор Waters 2489; колонка Supelcosil LC-18-T, 5 мкм, 150 × 4.6 мм).

Определение кинетических параметров PRPP-синтеза

Для определения кинетических параметров ферментов концентрацию АТР изменяли в интервале от 0.005 до 0.2 мМ. Аналогичный интервал использовали для *D*-рибозо-5-фосфата. Остальные условия были такими же, как при определении ферментативной активности. Реакцию проводили в течение

2 мин в трех повторностях. Затем определяли среднее значение скорости в трех опытах с одинаковой концентрацией. Концентрации АТР и АМР определяли с помощью ВЭЖХ в изократическом методе элюирования 0.1 М КН₂РО₄, рН 6.0, скорость потока 0.5 мл/мин, длина волны – 254 нм (детектор Waters 2489; колонка Supelcosil LC-18-T, 5 мкм, 150 × 4.6 мм).

Определение кинетических параметров APR-трансферазы

При определении кинетических параметров APR-трансферазы концентрацию аденина изменяли в интервале от 0.005 до 0.2 мМ, а PRPP – от 0.05 до 1.2 мМ. Остальные условия были такими же, как при определении активности. Реакцию проводили в течение 1 мин в трех повторностях. Среднее значение скорости реакции определяли по результатам трех экспериментов с одинаковой концентрацией. Концентрации аденина и АМР определяли методом ВЭЖХ в изократическом методе элюирования 36% водным метанолом, скорость потока 0.5 мл/мин, длина волны – 254 нм (детектор Waters 2489; колонка MZ PerfectSil 100 ODS-3, 5 мкм, 150 × 4.6 мм).

Кинетические параметры определяли нелинейным регрессионным анализом при помощи программы SciDAVis v.0.2.4. Наблюдаемую каталитическую константу (k_{cat}) рассчитывали на одну субъединицу, массу которой определяли исходя из аминокислотной последовательности (32.0 кДа для *Tsp*RK, 34.5 кДа для *Tth*PRPPS1, 34.6 кДа для *Tth*PRPPS2 и 19.0 кДа для *Tth*APRT).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью изучения возможности трехступенчатого биосинтеза нуклеотидов проведены комплексные работы по получению и исследованию субстратных свойств рекомбинантных ферментов нуклеинового обмена – рибкиназы, двух PRPP-синтеза и APR-трансферазы из *T. thermophilus*.

Ген QT17_05185, кодирующий RK из *Thermus* sp. 2.9, получен химико-ферментативным способом. Гены TT_RS05985, TT_RS06430, TT_RS06315, кодирующие *Tth*PRPPS1, *Tth*PRPPS2 и *Tth*APRT из *T. thermophilus* HB27, соответственно амплифицированы с геномной ДНК с помощью ПЦР. Все гены были клонированы в плазмидный вектор pET-23d+. Созданные в результате экспрессионные векторы pER-PRPPS1-Tth, pER-PRPPS2-Tth и pER-RK-Tsp содержали гибридные гены, объединяющие в одной рамке считывания последовательности, кодирующие ферменты и аффинную метку из шести остатков гистидина. Экспрессионный вектор pER-APRT1-Tth содержал немодифицированную последовательность, кодирующую *Tth*APRT.

Таблица 1. Стадии выделения и очистки рибокиназы, PRPP-синтетаз и APR-трансферазы

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Суммарный белок, мг
Рибокиназа из <i>Thermus</i> sp. 2.9			
1. Разрушение ультразвуковым дезинтегратором	150*	8.3	1245
2. Термообработка	136	1.7	231.2
3. Металл-хелатная хроматография	30	1.9	57
4. Концентрирование	9	6	54
5. Гель-фильтрационная хроматография	28.5	1.28	36.4
6. Концентрирование	2.6	11.7	30.4
PRPP-синтетаза 1 из <i>T. thermophilus</i> HB27			
1. Разрушение ультразвуковым дезинтегратором	150**	10	1500
2. Аффинная хроматография	100	0.8	80
3. Концентрирование	13	5.7	74.1
4. Гель-фильтрация	50	1	50
5. Концентрирование	4	12.3	49.2
PRPP-синтетаза 2 из <i>T. thermophilus</i> HB27			
1. Разрушение ультразвуковым дезинтегратором	130**	11.2	1456
2. Аффинная хроматография	125	0.6	75
3. Концентрирование	10.3	6.2	63.9
4. Гель-фильтрация	37.5	1.2	45
5. Концентрирование	3.4	12	40.8
APR-трансфераза из <i>T. thermophilus</i> HB27			
1. Разрушение ультразвуковым дезинтегратором	157***	6	942
2. Термообработка	149	1.3	193.7
3. Гель-фильтрация	258	0.7	181
4. Анионообменная хроматография	72	1.2	86.4
5. Гидрофобная хроматография	73	0.8	58.4
6. Концентрирование	11	5	55
7. Гель-фильтрационная хроматография	52	0.87	45.2
8. Концентрирование	3.4	12.5	42.5

* Из 5.8 л культуры.

** Из 5 л культуры.

*** Из 6 л культуры.

Этими плазмидами трансформировали штаммы *E. coli* BL21(DE3), Rosetta(DE3) и C3029/pGTf2. Подбирали условия культивирования штаммов-продуцентов, при которых целевые ферменты синтезировались в растворимой форме. Продукты растворимых рекомбинантных *TspRK* и *TthPRPPS2* получены на основе *E. coli* C3029/pGTf2. Этот штамм создан путем трансформации клеток *E. coli* C3029 плазмидным вектором pGTf2 (Takara Bio Inc.), несущим последовательности, кодирующие белки-шапероны GroES-GroEL-Tig под контролем промотора Pzt-1. Выбор штамма *E. coli* Rosetta(DE3) для биосинтеза *TthPRPPS1* обусловлен тем, что ген TT_RS05985, кодирующий *TthPRPPS1*, содержит редко используемые в *E. coli* кодоны (один AGA, девять AGG, 10 CGG, один AUA, один CUA и 15 CCC). В штамме Rosetta(DE) синтезируются tРНК для этих редких кодонов. Рекомбинантную *TthAPRT* в растворимой форме получали в штамме *E. coli* BL21(DE3).

Выделение и очистка рибокиназы и двух PRPP-синтетаз включали стадии металл-хелатной и гель-фильтрационной хроматографии (табл. 1). Термическая обработка клеточного лизата при выделении *TspRK* позволила значительно обогатить фракцию целевым белком за счет агрегации клеточных белков и ДНК. При выделении обеих *TthPRPPS* аналогичная обработка не давала положительных результатов, а приводила к потере целевого белка. В связи с высокой вероятностью протеолиза металл-хелатную хроматографию проводили при охлаждении, а к объединенным фракциям добавляли EDTA. После проведения последней стадии очистки с помощью гель-фильтрационной хроматографии все белковые препараты концентрировали.

Выделение и очистка *TthAPRT* включала стадии термической обработки, обессоливания, анионообменной, гидрофобной, гель-фильтрационной хроматографии и концентрирования (табл. 1).

Таблица 2. Кинетические параметры природных субстратов исследуемых ферментов

Субстрат	K_M , мкМ	K_I , мкМ	V_{max} , мкмоль/мин·мг	k_{cat} , 1/с	k_{cat}/K_M , 1/М·с
Рибокиназа из <i>Thermus</i> sp. 2.9					
АТФ	75 ± 11	–	13 ± 1	6.8 ± 0.7	9.1 × 10 ⁴
D-Рибоза	20 ± 6	1700 ± 400	13 ± 2	7.1 ± 1.2	3.5 × 10 ⁵
PRPP-синтетаза 1 из <i>T. thermophilus</i> HB27					
АТФ	10 ± 2	–	0.71 ± 0.05	0.41 ± 0.03	4.3 × 10 ⁴
D-Рибозо-5-фосфат	32 ± 6	–	0.85 ± 0.11	0.49 ± 0.06	1.5 × 10 ⁴
PRPP-синтетаза 2 из <i>T. thermophilus</i> HB27					
АТФ	12 ± 2	–	20 ± 2	11 ± 1	9.9 × 10 ⁵
D-Рибозо-5-фосфат	40 ± 4	–	24 ± 2	14 ± 1	3.4 × 10 ⁵
APR-трансфераза из <i>T. thermophilus</i> HB27					
Аденин	13 ± 2	–	6.0 ± 0.4	1.9 ± 0.1	1.4 × 10 ⁵
PRPP	179 ± 35	–	9.2 ± 1.1	2.9 ± 0.4	1.6 × 10 ⁴

Как и в случае *TspRK*, на первой стадии проводили термическую обработку осветленного клеточного лизата, но при этом в раствор добавляли соль (до 300 мМ хлорида натрия), что значительно ускоряло агрегацию примесных клеточных белков и ДНК.

При использовании разработанных методик выход всех рекомбинантных термофильных ферментов составил не менее 8–10 мг/л культуральной среды с электрофоретической чистотой не менее 95%.

Далее определяли кинетические параметры и оптимальные условия работы выделенных рекомбинантных ферментов.

Специфическую активность *TspRK* определяли радиохимическим методом по образованию D-рибофуранозо-5-[³²P]фосфата в присутствии [γ -³²P]АТФ. За единицы активности принимали количество продукта (мкмоль), образующееся за 1 мин. Активность *TspRK* составила 5.5 ед/мг.

Специфическую активность *TthPRPPS1* и *TthPRPPS2* определяли опосредованно по образованию АМР в реакционной смеси (по данным ВЭЖХ) в присутствии двух субстратов: АТФ и D-рибозо-5-фосфата. У первого фермента она составила 0.85 ед/мг, а у второго – 11 ед/мг. Учитывая большие различия в активности ферментов, более рациональным представляется использование для синтеза нуклеотидов второй синтетазы, учитывая более низкий расход белка. Свойства *TthAPRT* изучали на модельной реакции взаимодействия аденина с 5-фосфорибозил- α -1-пирофосфатом. Образование АМР наблюдали при помощи ВЭЖХ. Специфическая активность фермента составила 8.8 ед/мг.

При использовании в качестве субстрата рибозы в высокой концентрации обнаружено ингибирование

ферментативной активности *TspRK*. Данный эффект описан для рибокиназы человека [30]. Таким образом, результаты экспериментов с АТФ анализировали с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен $V = V_{max} \times S / (K_M + S)$. В опытах с D-рибозой использовали уравнение, учитывающее эффект ингибирования субстратом в результате связывания второй молекулы $V = V_{max} \times S / (K_M + S + S^2/K_I)$.

Кинетические параметры природных субстратов ферментов приведены в табл. 2.

Результаты определения оптимальных условий работы рекомбинантных ферментов приведены на рис. 2–4.

Изученные ферменты активны в широком температурном диапазоне. Максимальная активность *TspRK* и *TthPRPPS1* наблюдалась при 85°C, тогда как активность *TthAPRT* при этой температуре снижалась на 35%. Поэтому было решено дальнейшие каскадные синтезы проводить при 75°C.

В отсутствие ионов магния в буферном растворе активность ферментов была очень низкой. При добавлении 0.25 мМ хлорида магния активность значительно увеличивается.

В области более высоких концентраций зависимость активности ферментов от концентрации ионов магния выглядит следующим образом: у *TspRK* и *TthPRPPS1* активность снижается, у *TthAPRT* повышается, в случае *TthPRPPS2* – резко повышается. Таким образом, каскадные реакции с участием *TthPRPPS1* целесообразно проводить при концентрации хлорида магния 0.25–0.5 мМ, а с участием *TthPRPPS2* – при 5 мМ.

Ферменты по-разному реагируют на добавление ортофосфата калия. Активность *TspRK* снижает-

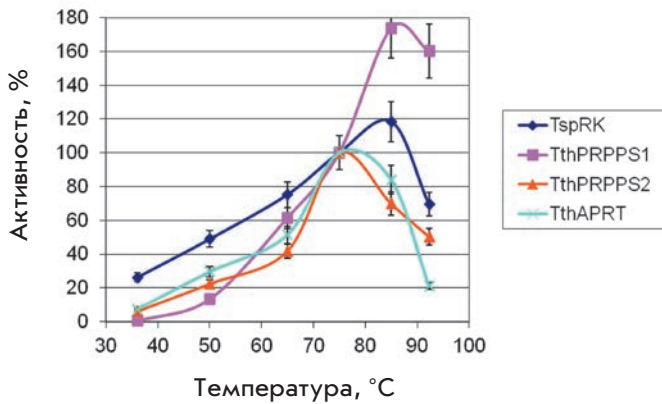


Рис. 2. Зависимость активности ферментов от температуры. Активность при 75°C принята за 100%. Реакции проводили при температуре от 36 до 92°C в смеси объемом 0.05 мл (20 мМ Трис-НСl, pH 8.0), содержащей: 1) 0.4 мМ АТФ, 1 мМ рибозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ КСl, 0.15 мкг *TspRK*; 2) 1 мМ АТФ, 1 мМ *D*-рибозо-5-фосфата, 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ KH_2PO_4 , 0.75 мкг *TthPRPPS1* или *TthPRPPS2*; 3) 1 мМ аденина, 1 мМ PRPP, 5 мМ MgCl_2 , 0.125 мкг *TthAPRT*

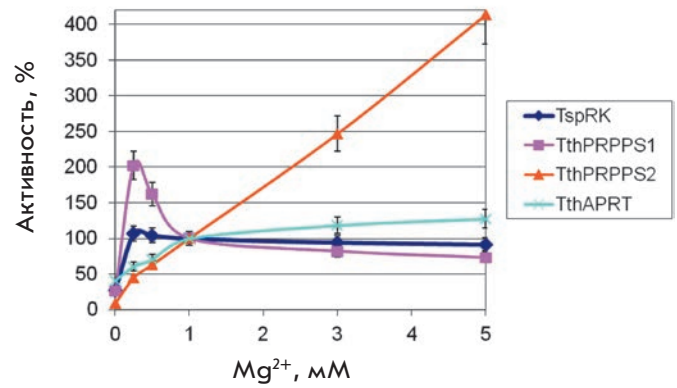


Рис. 3. Зависимость активности ферментов от концентрации ионов магния. Активность при 1 мМ Mg^{2+} принята за 100%. Реакции проводили при температуре 75°C в смеси объемом 0.5 мл (20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, от 0 до 5 мМ MgCl_2), содержащей: 1) 0.4 мМ АТФ, 1 мМ рибозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 50 мМ КСl, 0.15 мкг *TspRK*; 2) 1 мМ АТФ, 1 мМ *D*-рибозо-5-фосфата, 10 мМ KH_2PO_4 , 0.75 мкг *TthPRPPS1* или *TthPRPPS2*; 3) 1 мМ аденина, 1 мМ PRPP, 0.125 мкг *TthAPRT*

ся, *TthAPRT* – практически не меняется, у обеих *TthPRPPS* существенно повышается, причем в случае *TthPRPPS2* она начинает падать при концентрации свыше 25 мМ. Оптимальная концентрация для проведения каскадных реакций составляет 10–25 мМ.

Наиболее критичным оставался вопрос о субстратной специфичности каждого фермента по отношению к различным углеводам.

D-рибоза и 2-дезоксид-*D*-рибоза являются субстратами *TspRK* (рис. 5), при этом активность по дезоксисахару составляет 57% от активности в отношении *D*-рибозы. Активность в отношении *D*-арабинозы и *D*-ксилозы превышает фоновую в 2 раза, что может указывать на их использование в качестве субстратов, но значительно менее специфичных. Активность в отношении *D*-глюкозы и *D*-лихсозы не обнаружена.

Проверена активность обеих *TthPRPPS* в отношении 2'-дезоксид-АТФ, -ГТФ и 2'-дезоксид-ГТФ. Активность при использовании 2'-дезоксид-АТФ составила 80% от активности с АТФ. Активность в отношении ГТФ и 2'-дезоксид-ГТФ не обнаружена (данные не приведены). Можно предположить, что эти *TthPRPPS* относятся к ферментам первого типа [31]. Все реакции проводили в тех же условиях, в которых определяли активность, менялся лишь добавляемый субстрат. Оба фермента способны катализировать реакцию с *D*-арабинозо-5-фосфатом (рис. 6). При этом активность в отношении 2-дезоксид-*D*-рибозо-5-

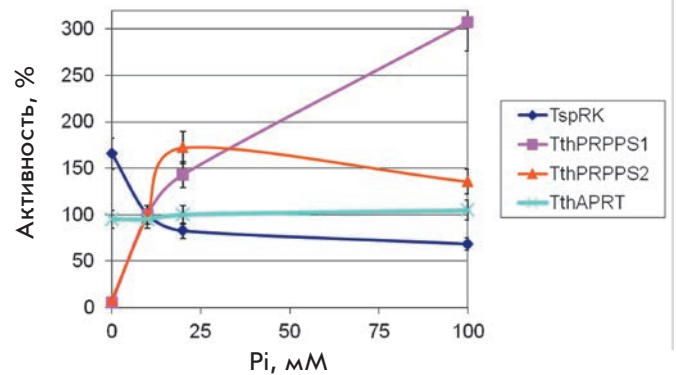


Рис. 4. Зависимость активности ферментов от концентрации неорганического фосфата. Активность при 10 мМ P_i принята за 100%. Реакции проводили при температуре 75°C в смеси объемом 0.5 мл (20 мМ Трис-НСl, 5 мМ MgCl_2 , pH 8.0, от 0 до 100 мМ KH_2PO_4), содержащей: 1) 0.4 мМ АТФ, 1 мМ рибозы, 50 мМ КСl, 0.15 мкг *TspRK*; 2) 1 мМ АТФ, 1 мМ *D*-рибозо-5-фосфата, 0.75 мкг *TthPRPPS1* или *TthPRPPS2*; 3) 1 мМ аденина, 1 мМ PRPP, 0.125 мкг *TthAPRT*

фосфата не обнаружена, что говорит о важности гидроксильной группы по второму положению углевода для осуществления ферментативной реакции.

С целью определения возможности использования различных гетероциклических оснований для синтеза нуклеотидов проведено несколько реакций.

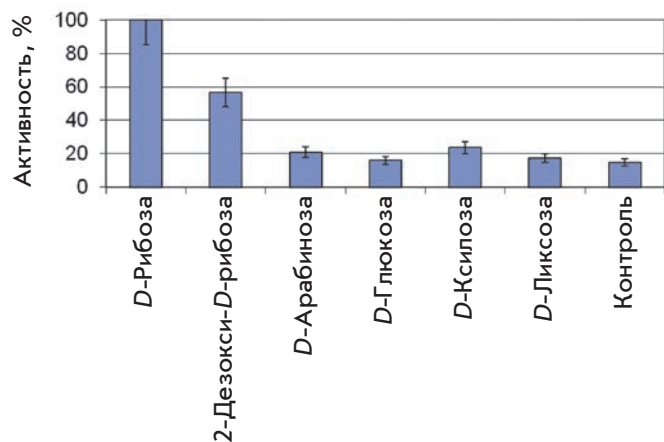


Рис. 5. Ферментативная активность рибокиназы в присутствии различных углеводов. Реакции проводили при температуре 75°C в смеси объемом 0.05 мл (20 мМ Трис-НСl, pH 8.0), содержащей 0.4 мМ АТФ, 1 мМ углевода (контрольная реакция без углевода), 1 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl , 0.15 мкг RK

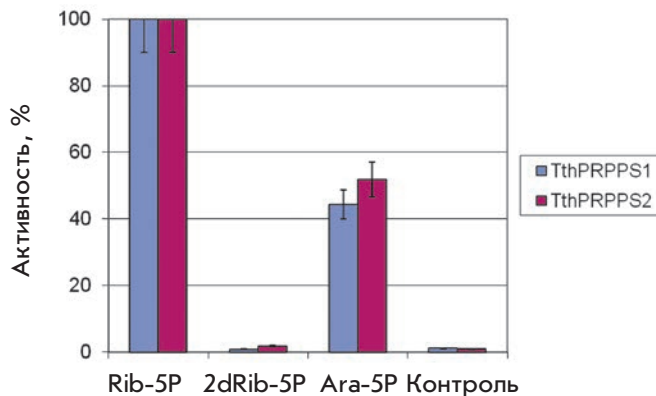


Рис. 6. Субстратная специфичность PRPP-синтетаз в отношении различных 5-фосфатов углеводов. Реакции проводили при температуре 75°C в смеси объемом 0.5 мл (20 мМ Трис-НСl, pH 8.0), содержащей 1 мМ АТФ, 1 мМ 5-фосфата углевода (контрольная реакция без углевода), 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ KH_2PO_4 , 0.75 мкг PRPPS. Rib – D-рибоза, 2dRib – 2-дезоксид-рибоза, Ara – D-арабиноза

Таблица 3. Субстраты APR-трансферазы

Основание	Конверсия за 24 ч, %	MS продукта, [M+H] ⁺
2,6-Диаминопурин	16.8	363.0786 (расч. 363.0813)
2-Хлораденин	97.6	382.0257 (расч. 382.0314)
2-Фтораденин	36.5	366.0564 (расч. 366.0611)
Аденин	50.0	348.0677 (расч. 348.0704)
2-Метоксиаденин	60.9	378.0812 (расч. 378.0809)
N1-Метиладенин	78.2	362.0843 (расч. 362.0800)
N6-Бензиладенин	1.9	438.1117 (расч. 438.1173)
2-Аминобензимидазол	0.1	346.0796 (расч. 346.0799)
1,2,4-Триазол-3-карбокси-N-метиламид	0	–
Гуанин	0	–
Гипоксантин	0	–
7-Дезаза-2,6-диаминопурин	0	–

Примечание. Условия реакций: реакционные смеси (0.5 мл; 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 75°C) содержали 0.4 мМ гетероциклического основания, 0.4 мМ PRPP, от 0 до 5 мМ MgCl_2 , 1.25 мкг *TthAPRT*.

Данные по синтезу нуклеотидов с помощью *TthAPRT* приведены в табл. 3.

Из приведенных в табл. 3 данных очевидно, что *TthAPRT* специфична в отношении 6-аминопуринов. Хорошими субстратами оказались 2-хлораденин, N1-метиладенин, 2-метоксиаденин. Не обнаружено ферментативной активности в реакциях с гипоксантином, гуанином, N6-бензиладенином, аминокбензимидазолом и 1,2,4-триазол-3-карбокси-N-метиламидом. В реакциях с 2-хлораденином равновесие оказалось сильно смещено в сторону образования нуклеотида (98% через 1 сут). Реакцию

проводили при 75°C, что в случае 2-хлораденина предпочтительней, ввиду его плохой растворимости. 2,6-Диаминопурин также оказался субстратом, в то время как в реакции с его 7-дезазааналогом образования продукта не наблюдалось, что говорит о необходимости атома азота в седьмом положении пурина.

После определения субстратной специфичности *TthAPRT* осуществлен каскадный синтез 2Cl-AMP и 2F-AMP из соответствующих гетероциклических оснований и D-рибозы. Результаты представлены на рис. 7. Процесс каскадного синтеза нуклеотидов

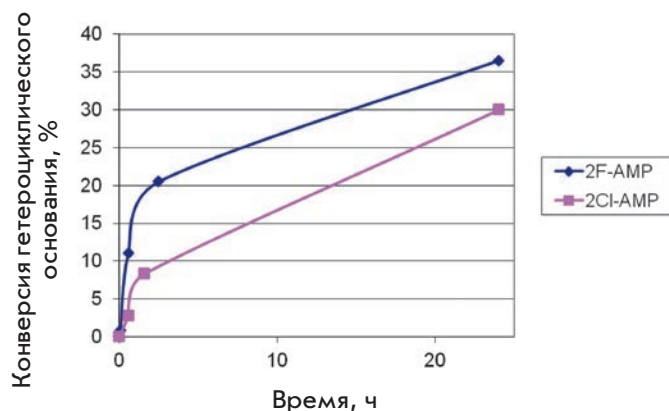


Рис. 7. Каскадный синтез 2Cl-AMP и 2F-AMP из соответствующих гетероциклических оснований и *D*-рибозы. Реакционные смеси объемом 250 мкл содержали: 0.5 мМ *D*-рибозы, 1 мМ АТФ, 0.4 мМ гетероциклического основания (2-хлор- или 2-фтор-аденина), 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ КСl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ КН₂РO₄, 75°С, 0.3 мкг *Tsp*РK, 1.1 мкг *Tth*РRРS1, 0.25 мкг *Tth*АРТ

контролировали с помощью хроматомасс-спектрометрического анализа реакционной смеси, пробы отбирали через 1, 2, 24 ч от начала процесса. На *рис. 8* приведены масс-спектры целевых продуктов.

Таким образом, на примере получения 2-хлор-(фтор)-аденозинмонофосфата (2Cl-AMP и 2F-AMP) показана возможность использования системы термофильных ферментов для получения биологически активных нуклеотидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования полиферментативного каскада термофильных ферментов нуклеинового обмена – рибокиназы, фосфорибозилпирофосфатсинтетазы и аденин-фосфорибозилтрансферазы для получения модифицированных нуклеотидов. Применение данного подхода создает предпосылки для замены химических методов получения нуклеотидов биокалалитическими. ●

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду (РНФ проект № 14-50-00131) за финансовую поддержку работы.

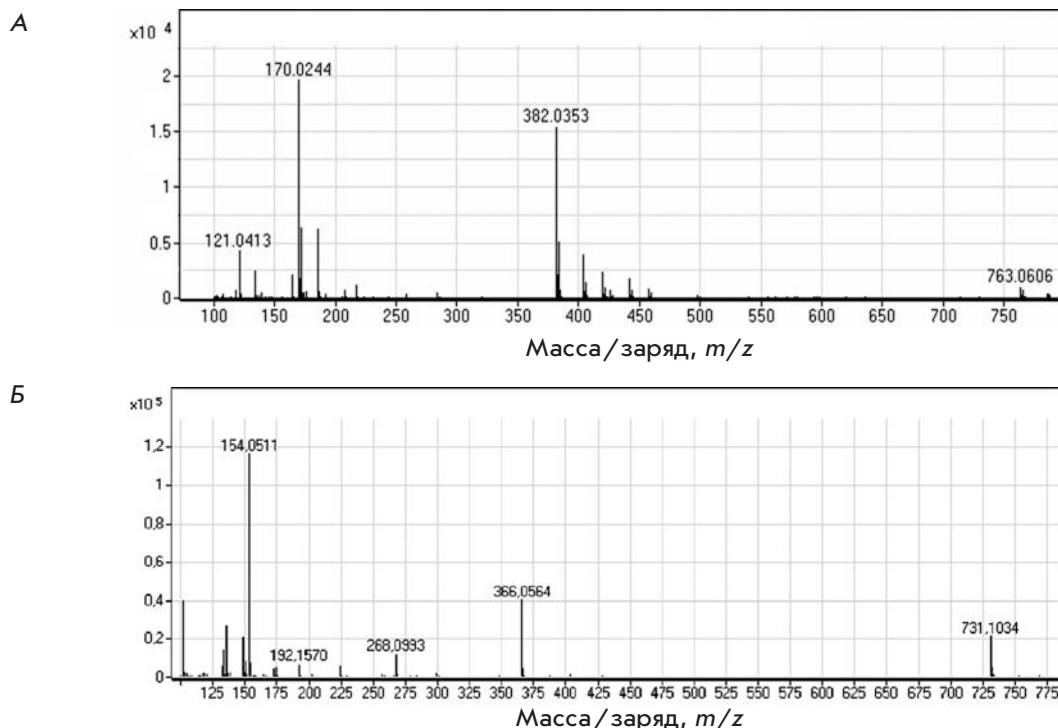


Рис. 8. Масс-спектр продукта каскадного синтеза нуклеотида – 2Cl-AMP, C₁₀H₁₃N₅O₇P₁Cl₁, [M + H]⁺ = 382.0328, [M-P-Rib]⁺ = 170.0230 (A) и 2F-AMP, C₁₀H₁₃N₅O₇P₁F₁, [M + H]⁺ = 366.0564, [M-P-Rib]⁺ = 154.0511 (B)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson D.L., Cox M.M. Nucleotides and Nucleic Acids. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed. N.Y.: Worth Publ., 2000. 1255 c.
2. Bruce A. Molecular Biology of the Cell. N. Y.: Garland Publ., 2000. 974 c.
3. Schärer O.D. // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2003. V. 42. № 26. P. 2946–2974.
4. Jordheim L.P., Durantel D., Zoulim F., Dumontel C. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. V. 12. № 6. P. 447–464.
5. De Clercq E. // *Rev. Med. Virol.* 2009. V. 19. № 5. P. 287–299.
6. Diop-Frimpong B., Prakash T.P., Rajeev K.G., Manoharan M., Egli M. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 16. P. 5297–5307.
7. Famulok M., Hartig J.S., Mayer G. // *J. Chem. Rev.* 2007. V. 107. № 9. P. 3715–3743.
8. Peng C.G., Damha M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 15. P. 4977–4988.
9. Golden J., Motea E., Zhang X., Choi J.S., Feng Y., Xu Y., Lee I., Berdis A.J. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 11. P. 2452–2465.
10. Lakshman M.K. Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. 684 c.
11. De Clercq E. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011. V. 51. P. 1–24.
12. Cen Y., Sauve A.A. // *Nucleos. Nucleotides. Nucleic Acids* 2010. V. 29. № 2. P. 113–122.
13. Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I. // *Mendeleev Commun.* 2011. V. 21. P. 57–68.
14. Vineyard D., Zhang X., Donnelly A., Lee I., Berdis A.J. // *Org. Biomol. Chem.* 2007. V. 5. № 22. P. 3623–3630.
15. Stein C.A., Cheng Y.C. // *Science.* 1993. V. 261. № 5124. P. 1004–1012.
16. Motea E.A., Lee I., Berdis A.J. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 5. P. 2357–2367.
17. Mikhailopulo I.A. // *Curr. Org. Chem.* 2007. V. 11. № 4. P. 317–335.
18. Wintersberger E. // *Biochem. Soc. Trans.* 1997. V. 25. № 1. P. 303–308.
19. Tesmer J.J., Klem T.J., Deras M.L., Davisson V.J., Smith J.L. // *Nat. Struct. Biol.* 1996. V. 3. № 1. P. 74–86.
20. Kim M.-J., Whitesides G.M. // *Appl. Biochem. Biotech.* 1987. V. 1. № 6. P. 95–108.
21. Scism R.A., Stec D.F., Bachmann B.O. // *Org. Lett.* 2007. V. 9. № 21. P. 4179–4182.
22. Scism R.A., Bachmann B.O. // *ChemBioChem.* 2010. V. 11. № 1. P. 67–70.
23. Nagy M., Ribet A.M. // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 77. № 1. P. 77–85.
24. Lee D., Moffatt B.A. // *Physiologia Plantarum.* 1993. V. 87. № 4. P. 483–492.
25. Zhou X., Mikhailopulo I.A., Cruz-Bournazou N., Neubauer P. // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.* 2015. V. 115. P. 119–127.
26. Zhou X., Szeker K., Jiao L.-Y., Oestreich M., Mikhailopulo I.A., Neubauer P. // *Adv. Synthesis & Catalysis.* 2015. V. 357. № 6. P. 1237–1244.
27. Taran S.A., Verevkina K.N., Feofanov S.A., Miroshnikov A.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. № 6. P. 739–745.
28. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
29. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
30. Park J., van Koeverden P., Singh B., Gupta R.S. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. № 17. P. 3211–3216.
31. Kadziola A., Jepsen C.H., Johansson E., McGuire J., Larsen S., Hove-Jensen B. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 354. № 4. P. 815–828.