



УДК 577.112.4 : 577.152.314 + 577.155.2

МОДИФИКАЦИЯ РНКазы 5'-ФОСФО-N-МЕТИЛИМИДАЗОЛИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ДИ- И ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ

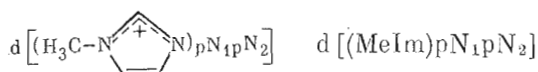
Бунева В. Н., Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф.

*Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Исследовано взаимодействие панкреатической РНКазы с 5'-фосфо-N-метилимидазолидами ди- и олигонуклеотидов: $d[(MeIm)pTrA]$ и $(MeIm)p(dT)_{10}$. В случае $d[(MeIm) \cdot pTrA]$ показали аффинный характер модификации, получена одна мономодифицированная форма с неполным сохранением активности (гидролиз $sCMP \rightarrow 8\%$ и $poly(U) \rightarrow 50\%$). При модификации РНКазы с помощью $(MeIm)p(dT)_{10}$ получены три мономодифицированные формы РНКазы, две из которых также сохраняют частичную ферментативную активность.

В предыдущей работе [1] мы показали, что при аффинной модификации панкреатической РНКазы (КФ 3.1.27.5) 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензиламидом $d(pTrA)$ образуется несколько мономодифицированных форм фермента, частично сохраняющих ферментативную активность. Можно предположить, что как множественность модификации, так и обусловленное ею предполагаемое выведение «адреса» из участка связывания его в активном центре РНКазы после осуществления реакции алкилирования объясняется большим размером присоединенной реакционноспособной группы реагента.

Для того чтобы выяснить возможности уменьшения множественности модификации РНКазы, необходимы реакционноспособные производные олигонуклеотидов, не содержащие соединительного фрагмента (спейсера) между «адресом» и реагирующей группой. К такого рода соединениям можно отнести 5'-фосфо-N-метилимидазолидные производные дезоксирибонуклеотидов, обладающие высокой реакционной способностью по отношению к аминам [2]:



Существенным преимуществом N-метилимидазолидов олигонуклеотидов перед их имидазолидами является способность первых к взаимодействию с нуклеофилами без предварительной стадии протонирования, что открывает перспективу фосфорилирования ими ферментов в широком диапазоне pH.

Целью настоящей работы явилось исследование модификации РНКазы с помощью 5'-фосфо-N-метилимидазолидов ди- и олигонуклеотидов — фосфорилирующих реагентов, не содержащих спейсера.

Вследствие высокой реакционной способности N-метилимидазолидных производных динуклеотидов по отношению к аминам (время образования продукта меньше 2 мин) [2] исследование сродства реагента к РНКазе обычным методом посредством определения K_1 по ферментативной реакции гидролиза $sCMP$ провести невозможно.

На рис. 1 приведены кинетические кривые инактивации РНКазы $d[(MeIm)pTrA]$ для концентрации фермента $4 \cdot 10^{-5}$ М. Аналогичные кривые инактивации РНКазы $d[(MeIm)pTrA]$ были получены и для концент-

Сокращения: $d[(MeIm)pTrA]$ — 5'-фосфо-N-метилимидазолидное производное дезоксирибонуклеотида; $(MeIm)p(dT)_{10}$ — 5'-фосфо-N-метилимидазолидное производное дезоксирибодекануклеотида, MES — 2-морфолиноэтил-сульфокислота.

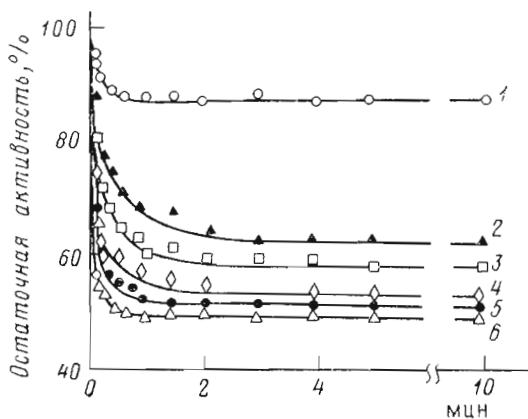


Рис. 1

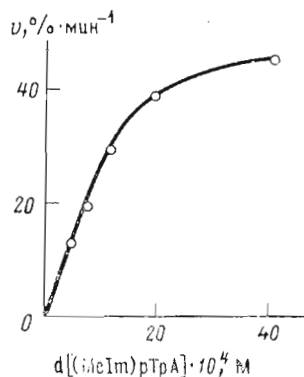


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость остаточной активности РНКазы ($4 \cdot 10^{-5}$ М) (по гидролизу сСМР) от времени выдерживания ее с $d[(MeIm)pTrA]$ в концентрациях (М): $4 \cdot 10^{-4}$ (2), $8 \cdot 10^{-4}$ (3), $1,2 \cdot 10^{-3}$ (4), $2 \cdot 10^{-3}$ (5), $4 \cdot 10^{-3}$ (6); 1 — условия 2 в присутствии $7 \cdot 10^{-4}$ М $d(pTrA)$

Рис. 2. Зависимость начальной скорости инактивации РНКазы от концентрации $d[(MeIm)pTrA]$. Концентрация фермента $4 \cdot 10^{-5}$ М

рации фермента $2 \cdot 10^{-3}$ М. Зависимость начальной скорости инактивации от концентрации реагента имеет гиперболический характер (рис. 2), а конкурентный ингибитор $d(pTrA)$ защищает фермент от инактивации (рис. 1, 1). Эти данные указывают на аффинный характер модификации. Рассчитанная из данных рис. 2 по уравнению Кица—Уилсона [3] величина константы диссоциации комплекса равна $1 \cdot 10^{-3}$ М. Таким образом, введение N-метилимидазолиевого заместителя по 5'-фосфату динуклеотида практически не влияет на сродство последнего к РНКазе ($K_i d(pTrA)$ равна $(7,0 \pm 2,5) \cdot 10^{-4}$ М [4]).

Обращает на себя внимание характер кривых инактивации: остаточная активность сохраняется даже при высоких концентрациях $d[(MeIm)pTrA]$. Подобная неполная инактивация наблюдалась и при модификации РНКазы алкилирующим аналогом динуклеотида [1].

Продукты модификации РНКазы ($2 \cdot 10^{-3}$ М) с помощью $d[(MeIm)pTrA]$ ($4 \cdot 10^{-3}$ М) были фракционированы методом ионообменной хроматографии (рис. 3). Видно, что с меньшим временем удерживания, чем немодифицированная РНКаза (пик III), элюируются два продукта, имеющие более отрицательный заряд, чем РНКаза. Пик II соответствует модифицированной РНКазе со стехиометрией присоединения 1 : 1, так как соотношение A_{280}/A_{260} равно 0,64, а рассчитанная для такого случая величина A_{280}/A_{260} равна 0,66. Спектральные характеристики пика I полностью соответствуют $d(pTrA)$ при pH 7: $\lambda_{min} = 231$ нм, $\lambda_{max} = 262$ нм, $A_{280}/A_{260} = 0,37$, $A_{290}/A_{250} = 0,09$, $A_{250}/A_{260} = 0,74$. Присутствие $d(pTrA)$ может быть обусловлено гидролизом лабильных производных РНКазы, например производных по карбоксильным группам фермента.

Степень модификации РНКазы составляла 50% (соотношение пиков II и III). Определение активности модифицированной РНКазы пика II по сСМР и $\rho(U)$ показало сохранение активности на 8 и 50% соответственно. В данном случае образуется монотомодифицированная форма РНКазы с меньшей активностью, чем в случае форм модифицированных алкилирующим производным динуклеотида. Вероятно, это связано с модификацией аминокислоты, находящейся в непосредственной близости от активного центра РНКазы, из-за отсутствия спейсера в реагенте. Не исключено также, что после реакции фосфорилирования не происходит значительного удаления «адреса» из участка связывания его на ферменте.

Выяснение причин остановки реакции (рис. 1) требует дополнительных исследований.

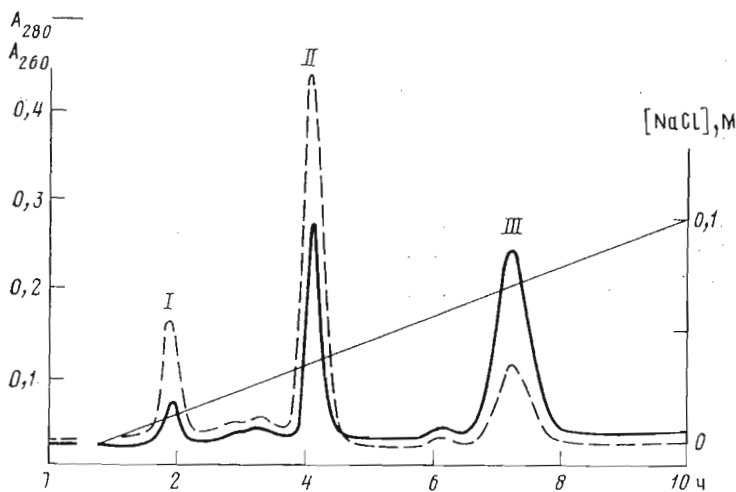


Рис. 3. Хроматографическое разделение модифицированной $4 \cdot 10^{-3}$ M d(MeIm)pTrA РНКазы ($2 \cdot 10^{-3}$ M) на колонке (16×120 мм) с СМ-целлюлозой; элюент: линейный градиент 0—0,1 M NaCl в 0,005 M трис-НСI-буфере, рН 8,0; скорость элюции 0,5 мл/мин

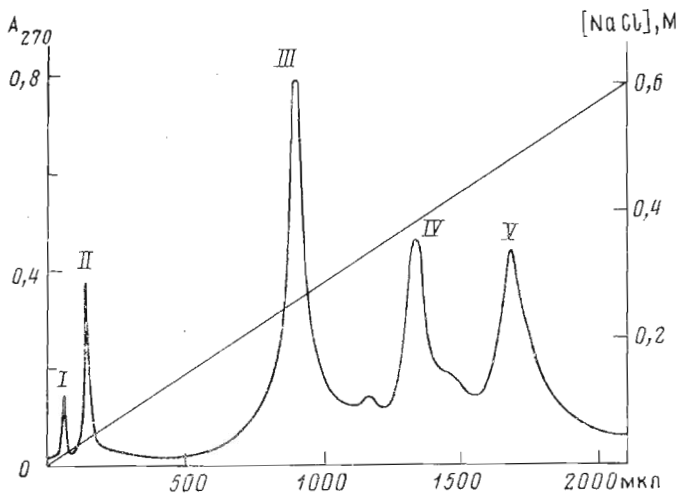


Рис. 4. Хроматографическое разделение модифицированной (MeIm)p(dT)₁₀ РНКазы на колонке (3×90 мм) с полисил-СА в линейном градиенте концентрации NaCl (0—0,6 M) в 0,005 M трис-НСI-буфере, рН 8,0; скорость элюции 50 мкл/мин

Так как динуклеотиды являются наименьшим элементом нуклеиновых кислот, участвующим в связывании с РНКазой, и допуская, что динуклеотид достаточно легко может смещаться из участка связывания на ферменте после образования ковалентной связи с белком, интересно было посмотреть, как будет происходить модификация РНКазы реакционноспособным производным олигонуклеотида.

Для этой цели нами была проведена модификация РНКазы (MeIm)p(dT)₁₀ с выделением продуктов модификации хроматографическим методом на анионообменном сорбенте полисил-СА (рис. 4).

Присоединение реагента, имеющего при рН 8 заряд -9 , вызывает увеличение объема элюции модифицированной РНКазы с анионообменного сорбента. Видно, что после немодифицированной РНКазы (пик I) элюируются четыре пика. Пики II—IV соответствуют модифицированным формам РНКазы, а пик V по спектральным данным и месту выхода контрольного образца соответствует р(dT)₁₀. Анализ УФ-спектров пиков показал, что соотношение A_{280}/A_{260} для пиков II—IV изменяется в пределах 0,79—0,83. Рассчитанная величина A_{280}/A_{260} при стехиометрии при-

соединения 1 : 1 равна 0,79 (A_{280}/A_{260} равно 1,88 и 0,73 для РНКазы и $d(pT)_{10}$ соответственно). Таким образом, по данным спектральных соотношений, пики II—IV являются формами мономодифицированной РНКазы. Далее было проведено измерение активности модифицированных форм РНКазы, соответствующих пикам II—IV. Оказалось, что формы РНКазы в пиках II и III сохраняют активность как по гидролизу *c*СМР (50 и 17%), так и по гидролизу poly(U) (55 и 15%). Модифицированная форма РНКазы, элюирующаяся в пике IV, неактивна по гидролизу poly(U) и сохраняет незначительную активность лишь по отношению к *c*СМР (5%). Немодифицированная РНКаза (пик I) сохраняет практически 100% активности по обоим тестам.

Таким образом, с увеличением длины олигонуклеотида возросло и число мономодифицированных форм РНКазы. Это, возможно, обусловлено как неоднородностью связывания гомоолиготимидилата в активном центре РНКазы, так и сильным электростатическим взаимодействием полианиона $p(dT)_{10}$ и положительных кластеров РНКазы. Из трех форм лишь одна (пик IV) практически не обладает ферментативной активностью. По-видимому, в этом случае образуется комплекс фермент — реагент с оптимальной конфигурацией, и после образования ковалентной связи олигонуклеотид не выводится из активного центра фермента.

Таким образом, с использованием *N*-метилимидазольных производных динуклеотида и декануклеотида получены мономодифицированные формы РНКазы. Модифицированная $d[(MeIm)pTrA]$ РНКазы и две из модифицированных $(MeIm)p(dT)_{10}$ форм частично сохраняют ферментативную активность.

Экспериментальная часть

Использовали сефадекс G-25 (20—80 мкм, Pharmacia, Швеция); СМ-целлюлозу (СМ-52, Whatman, Англия); 2', 3'-*c*СМР, MES (Fluka, Франция); трис, 2,2'-дипиридилдисульфид (Sigma, США); трифенилфосфин (Chemapol, СССР); *N*-метилимидазол (Serva, ФРГ); диметилформамид, ацетон, эфир, метанол с содержанием влаги не более 0,2%; NaCl, ос. ч. Анионообменная смола полисил-СА была любезно предоставлена С. П. Ястребовым (ВНИИ молекулярной биологии, пос. Кольцово Новосибирской обл.). Цетавлоновые соли олигонуклеотидов получали по методу [5].

Микроколоночную хроматографию осуществляли на хроматографе «Милхром» (СССР), УФ-спектры регистрировали на спектрометре Spexord UV VIS (ГДР).

Препарат панкреатической РНКазы А (КФ 3.1.27.5) был получен и охарактеризован как описано в работе [1].

5'-Фосфо-*N*-метилимидазольд $d(pTrA)$ получен по методу [2] с выходом по реакции переаминирования с 1,4-бутилендиамином (см. ниже) не менее 90%.

5'-Фосфо-*N*-метилимидазольд $d(pT)_{10}$ получали добавлением к раствору 10^{-3} М цетавлоновой соли $d(pT)_{10}$ и 30 мкмоль *N*-метилимидазола в 50 мкл диметилформамида последовательно 15 мкмоль 2,2'-дипиридилдисульфида в 25 мкл и 15 мкмоль трифенилфосфина в 25 мкл диметилформамида. Смесь выдерживали 8—10 мин при 20° С, затем по каплям добавляли к 0,7 мл 2% раствора перхлората лития в ацетоне. Осадок отделяли, промывали ацетоном (2 × 0,5 мл), эфиром (1 × 0,5 мл) и высушивали на воздухе. Структура образующегося соединения была подтверждена реакцией переаминирования с 1,4-бутилендиамином или 1,3-пропилендиамином [2]. Для этого к сухому остатку *N*-метилимидазолида олигонуклеотида добавляли 20—50 мкл 1 М раствора амина, смесь выдерживали 10—15 мин при 20° С. Образовавшиеся амиды отделяли от избытка амина гель-фильтрацией на колонке (5 × 150 мм) с сефадексом G-10. В качестве элюента использовали бидистиллированную воду. Фракции, содержащие нуклеотидный материал, объединяли, упаривали. Анализ амида методом микроколоночной хроматографии на анионообменном сорбенте полисил-СА показал, что фосфамид элюируется как соединение, имеющее заряд, на единицу меньший, чем исходный олигонуклеотид. Выход амида составлял 90%. Методом микроколоночной хроматографии было показано, что при гидролизе амида (0,05 М HCl, 30 мин, 40° С) образуется исходный олигонуклеотид. Амид охарактеризован также УФ-спектром при pH 7, который соответствует спектру олигонуклеотида.

Инактивацию фермента и кинетические исследования ферментативной реакции проводили при 25° С в 1,5 мл реакционной смеси, содержащей $4 \cdot 10^{-5}$ М РНКазу (или $2 \cdot 10^{-3}$ М РНКазу при объеме смеси 500 мкл; далее данные для этого эксперимента приведены в скобках), $d[(MeIm)pTpA]$ или $d[(MeIm)pTpA] + d(pTpA)$ (концентрации см. в подписи к рис. 1) и 0,2 М NaCl. Через определенные промежутки времени отбираемые аликвоты объемом 100 мкл (10 мкл) добавляли к 100 мкл (90 мкл) $2 \cdot 10^{-3}$ М этилендиамина в 0,2 М NaCl, затем активность РНКазы определяли добавлением 100 мкл (10 мкл) раствора к 900 мкл (990 мкл) 10^{-3} М cCMP в 0,2 М NaCl. Активность РНКазы определяли спектрофотометрически, как описано в работе [1].

Модификацию фермента $d[(MeIm)pTpA]$ проводили в реакционной смеси (300 мкл), содержащей $2 \cdot 10^{-3}$ М РНКазу, $4 \cdot 10^{-3}$ М $d[(MeIm)pTpA]$ в 0,2 М NaCl (рН 6,0), 10 мин при 20° С.

Гель-фильтрацию и ионообменную хроматографию продуктов модификации проводили, как описано в работе [1] (см. также условия в подписи к рис. 3).

Модификацию РНКазы $(MeIm)p(dT)_{10}$ проводили в реакционной смеси (75 мкл), содержащей $2 \cdot 10^{-3}$ М РНКазу, $1,0 \cdot 10^{-3}$ М $(MeIm)p(dT)_{10}$, 0,01 М NaHCO₃ (рН 8,3), 15 мин при 20° С.

Ионообменную хроматографию реакционной смеси проводили на анионообменном сорбенте полисил-СА (условия в подписи к рис. 4). Элюцию продуктов контролировали по поглощению при λ 270 нм, элюируемые пики охарактеризовали УФ-спектрами. Фракции, соответствующие модифицированной РНКазе, выделяли и хранили при 5–7° С.

Измерение активности РНКазы по гидролизу $poly(U)$ проводили как описано в работе [1].

Концентрация модифицированных форм РНКазы рассчитывали из значения молярных коэффициентов поглощения, равных 18 400 и 70 400 М⁻¹·см⁻¹ при 280 нм для РНКазы, модифицированной $d[(MeIm)pTpA]$ и $(MeIm)p(dT)_{10}$ соответственно. Эти коэффициенты были найдены как сумма молярных коэффициентов поглощения РНКазы (9400 М⁻¹·см⁻¹) и $d(pTpA)$ (9000 М⁻¹·см⁻¹) или $p(dT)_{10}$ ($61\ 000$ М⁻¹·см⁻¹).

Авторы выражают благодарность Д. Г. Кнорре за участие в обсуждении результатов работы и В. А. Гринкевичу за ценные замечания при редактировании статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барам Г. И., Бунева В. Н., Добрикова Е. Ю., Петров В. Н. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 5, с. 613–620.
2. Годовикова Т. С., Зарытова В. Ф., Халимская Л. М. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 4, с. 475–481.
3. Kitz R., Wilson J. B. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 10, p. 3245–3249.
4. Бунева В. Н., Мустафина О. В. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1984, № 11, вып. 4, с. 99–101.
5. Зарытова В. Ф., Райт В. К., Черникова Т. С. Биорган. химия, 1977, т. 3, № 12, с. 1626–1631.

Поступила в редакцию
7.VIII.1985
После доработки
18.XII.1985

MODIFICATION OF RNase BY DI- AND OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDE 5'-PHOSPHO-N-METHYLIMIDAZOLIDE DERIVATIVES

BUNEVA V. N., GODOVIKOVA T. S., ZARYTOVA V. F.
Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

The interaction of pancreatic RNase with di- and oligodeoxyribonucleotide 5'-phospho-N-methylimidazolides, namely $d[(MeIm)pTpA]$ and $(MeIm)p(dT)_{10}$, was analyzed. Affinity modification was observed with the dinucleotide, one monomodified form being produced that retained partial activity, 8 and 50% in the cCMP and $poly(U)$ hydrolysis, respectively. When $(MeIm)p(dT)_{10}$ was used for RNase modification, 3 monomodified forms were obtained, two of them partly retaining the enzymatic activity.