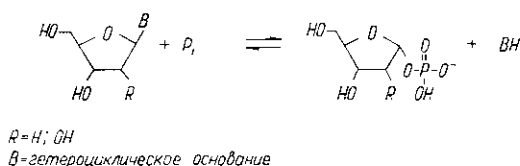


СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ УРИДИН- И ПУРИННУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ В СОСТАВЕ ЦЕЛЫХ КЛЕТОК *Escherichia coli*

А. И. Зинченко, Л. А. Ерошевская, В. Н. Барай, И. А. Михайлопуло

Введение. Нуклеозиды и нуклеотиды, модифицированные в углеводном фрагменте молекулы, играют прогрессивно возрастающую роль в качестве инструментов биохимических и молекулярно-биологических исследований [1, 2], а также как виро- и цитостатики [3, 4]. Успешное развитие исследований в указанных направлениях связано с разработкой эффективных методов получения разнообразных аналогов природных рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов. Среди известных способов в последнее время все более широко используются реакции химического и микробиологического трансгликозилирования.

Еще в 50-е годы было показано, что некоторые бактериальные клетки способны осуществлять тип реакции, представленный на схеме [5]:



Бактериальные нуклеозидфосфоорилазы, катализирующие вышеуказанные реакции, представлены в основном тремя видами ферментов: уридинфосфоорилазой (КФ 2.4.2.3; УНФ), тимидинфосфоорилазой (КФ 2.4.2.4) и пурииннуклеозидфосфоорилазой (КФ 2.4.2.1; ПНФ). Природными субстратами для них служат соответственно уридин (Urd), тимидин и пуриновые нуклеозиды [6]. Указанный тип равновесных реакций был с успехом использован в последнее время для препаративного синтеза ряда модифицированных пуриновых нуклеозидов, исходя из пуриновых азотистых оснований и пиримидиновых нуклеозидов с модифицированным углеводным компонентом [7—10]. Преимущества этого подхода заключаются прежде всего в существенно большей доступности модифицированных пиримидиновых нуклеозидов в сравнении с аналогичными пуриновыми нуклеозидами. Кроме того, реакции микробиологического трансгликозилирования являются стерео- и региоспецифичными и приводят к образованию исключительно N-9-β-нуклеозидов пуринов, тогда как в результате химического синтеза образуются, как правило, смеси α- и β-аномеров и позиционных изомеров [11, 12].

Значительный интерес представляет использование в ряде случаев для синтеза нуклеозидов нуклеозидфосфоорилазы в составе целых клеток бактерий [7, 9, 10], что имеет, на наш взгляд, существенное преимущество с практической точки зрения в сравнении с использованием индивидуальных ферментов [8, 13].

Ранее нами был отобран штамм *E. coli* БМ-11, клетки которого содержат высокоактивные УНФ и ПНФ и способны осуществлять синтез нуклеозидного антибиотика 9-β-D-арабинофуранозиладенина (aga-Ade) из 1-β-D-арабинофуранозилурацила (aga-Ura) и аденина [14], а также кинетинрибозида из Urd и соответствующего гетероциклического основания [15]. Целью настоящего исследования явилось изучение субстратной специфичности УНФ и ПНФ по отношению к модифицированным в углеводной части нуклеозидам, поскольку именно этот вопрос недостаточно освещен в научной литературе.

Материалы и методы. В работе были использованы аденозин, 2'-дезоксаденозин, гуанозин, инозин и 2'-деоксиуридин (2'-dUrd) фирмы «Serva» (ФРГ), аденин («Reanal», ВНР). Аминодезоксинуклеозиды любезно предоставлены А. А. Краевским и

Л. А. Александровой, 2', 3'- и 5'-С-метилнуклеозиды — С. Н. Михайловым. Синтез ага-Ade описан ранее [14]. Все остальные нуклеозиды синтезированы в лаборатории химии нуклеотидов и полинуклеотидов Ин-та биоорг. химии АН БССР.

Биомассу клеток *E. coli* БМ-11 получали, как описано в работе [14].

Фосфоролит нуклеозидов изучали следующим образом: реакционную смесь (0,5 мл), содержащую 0,2 мг клеток (здесь и далее в расчете на сухую массу), нуклеозид в концентрации 10 мМ, 50 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,0, инкубировали при 60 °С. После завершения инкубации пробы (50 мкл) помещали на кипящую водяную баню (2 мин), осветляли центрифугированием при 10000 g (5 мин) и хроматографировали на тонкослойных пластинках Silufol UV-254 («Kavalier», ЧССР). Вещества обнаруживали в УФ-свете, идентифицировали сравнением их с положением образцов-свидетелей и элюировали 10 мМ К-фосфатным буфером, рН 7,0. Спектры поглощения элюатов получали на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (ГДР). Концентрации веществ рассчитывали, используя известные коэффициенты молярных экстинкций, учитывая тот факт, что изучаемые модификации в углеводной части молекулы нуклеозидов практически не сказываются на величине молярных коэффициентов экстинкции этих соединений. Указанная процедура анализа реакционной среды являлась общей для всех последующих экспериментов за исключением того, что при тонкослойной хроматографии продуктов фосфоролита природных нуклеозидов применяли систему растворителей бутанол-2—25 %-ный водный аммиак (7 : 2), модифицированных — систему растворителей хлороформ — этанол (6 : 1), а при синтезе аденозина и его аналогов разделение продуктов проводили в воде при температуре 2—4 °С. В тех случаях, когда не удавалось тестировать ход реакции фосфоролита или синтеза нуклеозидов, концентрацию клеток в реакционной среде увеличивали в 10 раз. Этот прием был использован для определения эффективности фосфоролита ага-Urd, 2'-амино-2'-дезоксисуридина (2'-NH₂-2'-dUrd), 2'-С-метилуридина (2'-С-McUrd), ксилоуридина (xylo-Urd), 3'-дезоксисуридина (3'-dUrd), 3'-амино-3'-дезоксисуридина (3'-NH₂-3'-dUrd), 3'-фтор-3'-дезоксисуридина (3'-F-3'-dUrd), 3'-С-метилуридина (3'-С-MeUrd) и эффективности синтеза ага-Ade, 2'-амино-2'-дезоксаденозина, 3'-дезоксаденозина, 3'-амино-3'-дезоксаденозина. Эффективность фосфоролита определяли за время, при котором выход урацила не превышал 10 %, и рассчитывали как количество урацила в мкмольях, образовавшегося в результате реакции за 1 мин на 1 мг клеток.

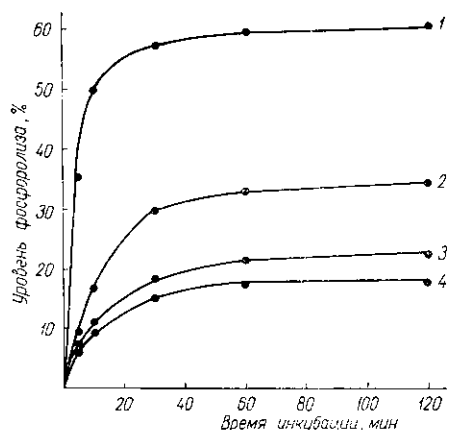
Субстратную специфичность ПНФ изучали согласно следующей схеме: пробы (0,4 мл), содержащие 0,2 мг клеток, соответствующие нуклеозиды урацила в концентрации 37,5 мМ, 37,5 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,0, инкубировали при 60 °С и по истечении времени, за которое достигался 30 %-ный выход продуктов реакции фосфоролита за нуклеозид (5—120 мин), помещали на кипящую водяную баню (2 мин), после чего клетки осаждали центрифугированием. Полученные супернатанты переносили в пробирки, содержащие 100 мкл 50 мМ водного раствора аденина и 0,2 мг клеток. Пробирки выдерживали при 60 °С и через определенные промежутки времени отбирали для анализа аликвоты по 50 мкл. Эффективность синтеза рассчитывали как количество образующегося нуклеозид аденина в мкмольях за 1 мин на 1 мг клеток.

Результаты и обсуждение. Ранее было показано [8, 16, 17], что равновесие реакции фосфоролита Urd под действием УНФ сдвинуто в сторону распада нуклеозидов в большей степени, чем в случае аналогичной реакции пуриновых нуклеозидов под действием ПНФ. Как видно из рисунка, подобная закономерность сохраняется и для нуклеозидфосфорилаз изученного штамма *E. coli* БМ-11. Указанная особенность функционирования нуклеозидфосфорилаз обуславливает совместное применение двух рассматриваемых ферментов для синтеза модифицированных пуриновых нуклеозидов [7—10, 14, 15]: УНФ служит для гидролиза пиримидинового нуклеозидов, тогда как ПНФ осуществляет синтез пуринового нуклеозидов, исходя из экзогенного пуринового гетероциклического основания и образующегося в результате первой реакции пентофуранозо-1-фосфата (ПФФ, см. схему).

В связи с этим, субстратная специфичность УНФ была изучена на примере фосфоролита ряда нуклеозидов урацила, а специфичность ПНФ — на примере синтеза пуриновых нуклеозидов.

Анализ данных по фосфоролиту урацильных нуклеозидов (таблица) позволяет сделать следующие выводы. Во-первых, замена гидроксильной группы при С—2'- или С—3'-атомах углерода фуранозного

кольца на другие атомы или атомные группы с сохранением конфигурации приводит к существенному снижению субстратной активности. Следует подчеркнуть тот факт, что присутствие гидроксильной группы при С—2' не является важным условием для реакции фосфоролита, так как при переходе от Urd к 2'-dUrd субстратная активность снижается только в 2,8 раза. Напротив, наличие гидроксильной группы при



С—3' является существенным требованием фермента к субстрату, что следует из снижения активности в 15,6 раз при переходе от Urd к 3'-dUrd. Еще в большей мере уменьшается субстратная активность при

Кинетика действия нуклеозидфосфорилаз *E. coli* BM-11 на Urd (1), инозин (2), аденозин (3) и гуанозин (4). За 100% принят полный фосфоролит нуклеозидов

Kinetics of the *E. coli* BM-11 nucleoside phosphorylase action on Urd (1), inosine (2), adenosine (3) and guanosine (4). The complete phosphorolysis of nucleosides is taken as 100%

переходе от 2'- и 3'-dUrd к соответствующим аминоксиданалогам, что позволяет предположить участие 2'-ОН-группы и в значительно большей степени 3'-ОН-группы Urd в связывании с ферментом в качестве донора водородной связи. В этой связи следует отметить, что энергия образования водородной связи с участием в качестве донора ОН-группы (10—13 кДж/моль) превосходит таковую алифатических аминов (1—3 кДж/моль) [18]. Дополнительным подтверждением данного предположения является низкая субстратная активность 3'-F-3'-dUrd. Во-вторых, введение в молекулу Urd объемных метильных групп при С—2'- и С—3'-атомах фуранозного кольца вместо соответствующих протонов полностью лишает такие аналоги субстратной активности. Отсутствие фосфоролитического расщепления рассматриваемых аналогов, по всей вероятности, обусловлено наличием объемных метильных групп при С—2'- и С—3'-атомах, препятствующих связыванию аналогов с активным центром фермента. Последнее предположение подтверждается тем, что, как было показано нами в отдельном экспери-

Субстратная специфичность УНФ и ПНФ в составе целых клеток *E. coli* BM-11
The substrate specificity of uridine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase of the *E. coli* BM-11 whole cells

Фосфоролит нуклеозидов урацила		Синтез адениновых нуклеозидов	
Субстрат	Относительная активность УНФ, %	Субстрат (ПНФ)	Относительная активность ПНФ, %
Urd	100	Rib-1-P	100
2'-dUrd	35,5	2-dRib-1-P	78,8
3'-dUrd	6,4	3-dRib-1-P	4,8
2'-NH ₂ -2'-dUrd	11,6	2-NH ₂ -2-dRib-1-P	2,7
3'-NH ₂ -3'-dUrd	0,6	3-NH ₂ -3-dRib-1-P	0,2
3'-F-3'-dUrd	0,1	—	—
Ara-Ura	3,2	Ara-1-P	1,6
Xylo-Ura	0,1	—	—
2'-C-MeUrd	0	—	—
3'-C-MeUrd	0	—	—
5'-C-MeUrd	—	5-C-MeRib-1-P	—
α-L-talo	100	α-L-talo	92
β-D-allo	50	β-D-allo	41

Примечание. Представлены средние величины результатов четырех экспериментов.

менте, указанные С-метилпроизводные Urd не являются ингибиторами фосфоролиза Urd под действием УНФ. В-третьих, обращение конфигурации ОН-группы у С—2'- и С—3'-атомов углерода Urd приводит к аналогам — ara-Ura и xylo-Ura — с низкой субстратной активностью. В полном соответствии с обсуждавшимися выше данными для дезокси- и аминодезоксианалогов Urd эффективность фосфоролиза xylo-Ura существенно меньше, чем ara-Ura. В-четвертых, аналоги Urd, содержащие метильную группу при С—5'-атоме экзоциклической СН₂ОН-группы, — 6'-дезоксид- α -L-талофуранозилурацил (5'-С- α -L-talo-MeUrd) и 6'-дезоксид- β -D-аллофуранозилурацил (5'-С- β -D-allo-MeUrd) — неожиданно обнаруживают субстратную активность на уровне природного субстрата — Urd или несколько меньшую в случае последнего аналога. В данном случае размер заместителя — метильной группы при С—5'-атоме — практически не оказывает влияния на реакцию фосфоролиза.

Субстратная специфичность ПНФ изучалась с использованием тех аналогов Urd, для которых была показана возможность фосфоролиза под действием УНФ. Следует подчеркнуть, что оба изучаемых фермента предъявляют близкие структурные и стереохимические требования к молекулам субстратов. Так, характер модификации при С—2'- и С—3'-атомах ПНФ играет решающую роль в процессе синтеза адениновых нуклеозидов. Далее подобно реакции фосфоролиза нуклеозидов урацила 5'-С-метилпроизводные ПНФ — 6-дезоксид- β -L-талофуранозид-1-фосфат (5-С- β -L-talo-MeRib-1-P) и 6-дезоксид- α -D-аллофуранозид-1-фосфат (5-С- α -D-allo-MeRib-1-P) — являются эффективными субстратами ПНФ.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что модификации при С—2'- и С—3'-атомах углерода уменьшают субстратную активность аналогов по отношению к обоим изученным ферментам. При этом ряд относительных величин субстратных активностей имеет следующий вид $\text{ОН} > \text{Н} > \text{NH}_2 > \text{ОН-ara/xylo} \gg 2' (3')\text{-С-метил}$. Замена одного из протонов при атоме углерода 5'-СН₂ОН-группы на метильную группу не влияет существенно на изученные ферментативные реакции.

В заключение следует отметить, что, несмотря на заметное снижение эффективности реакции фосфоролиза нуклеозидов урацила и синтеза адениновых нуклеозидов под действием соответственно УНФ и ПНФ при переходе от природных субстратов к аналогам, модифицированным при С—2'- и С—3'-атомах, высокая активность и термостабильность указанных ферментов в составе целых клеток изучаемого нами штамма бактерий позволяет подбирать такие экспериментальные условия, в которых может быть осуществлен синтез адениновых нуклеозидов, исходя из существенно более доступных пиримидиновых нуклеозидов даже в том случае, когда они значительно уступают в субстратной активности природным нуклеозидам. Как было отмечено выше, возможность реализации такого подхода была продемонстрирована нами ранее на примере препаративного синтеза ara-Ade [14].

SUBSTRATE SPECIFICITY OF URIDINE AND PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASES OF THE *ESCHERICHIA COLI* WHOLE CELLS

A. I. Zintchenko, L. A. Eroshevskaya, V. N. Barai, I. A. Mikhailopulo

Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk
Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Byelorussian SSR, Minsk

Summary

Substrate specificity of uridine and purine nucleoside phosphorylases of the whole cells of *Escherichia coli* BM-11 has been studied monitoring phosphorolysis of uridine and a series of its analogues modified in the carbohydrate moiety to uracil and pentofuranose-

1-phosphate, and synthesis of corresponding adenine nucleosides. Both enzymes reveal similar requirements to the structure and stereochemistry of uracil nucleosides and of the pentofuranose-1-phosphates, respectively, namely: a) modifications at C-3' decrease the substrate activity to a greater extent as compared with the same modifications at C-2'; the order of substrate activity in the case of modifications at C-2' and C-3' is OH > H > NH₂ > OH-ara (xylo) > 2'(3')-C-methyl; b) substitution of a methyl group for one of the protons at carbon atom of 5'-CH₂OH group does not lead to an essential alterations of the substrate activity in such analogues in comparison with the natural substrates — uridine and ribofuranose-1-phosphate, respectively.

1. *Suhadolnik R. J.* Nucleosides as biological probes.—New York: Wiley-Interscience, 1980.—346 p.
2. *Краевский А. А., Куханова М. К.* Репликация ДНК у эукариот // Итоги науки и техники. Молекуляр. биология.— М.: ВИНТИ, 1986.— С. 5—164 (Биоорг. химия; Т. 22).
3. *Преображенская М. Н., Мельник С. Я.* Аналоги компонентов нуклеиновых кислот — ингибиторы нуклеинового обмена // Итоги науки и техники. Биоорг. химия.— М.: ВИНТИ, 1984.— Т. 1.—244 с.
4. *De Clercq E.* Chemotherapeutic approaches to the treatment of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) // *J. Med. Chem.*— 1986.—**29**, N 9.— P. 1561—1569.
5. *Корнберг А.* Синтез ДНК.— М.: Мир, 1977.—360 с.
6. *Hammer-Jespersen K.* Nucleoside catabolism // *Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms* / Ed. K. Hammer-Jespersen.— New York; London: Acad. press, 1983.— P. 203—258.
7. A new method for the synthesis of some 9-β-D-arabinofuranosylpurines by a combination of chemical and enzymatic reactions / H. Morisawa, T. Utagawa, T. Mijoshi et al. // *Tetrahedron Lett.*— 1980.—**21**, N 3.— P. 479—482.
8. *Krenitsky T. A., Koszalka G. W., Tuttle J. V.* Purine nucleoside synthesis, an efficient method employing nucleosid phosphorylases // *Biochemistry.*— 1981.—**20**, N 12.— P. 3615—3621.
9. *Microbiological synthesis of adenine arabinoside* / T. Utagawa, H. Morisawa, F. Yoshinaga et al. // *Agr. and Biol. Chem.*— 1985.—**49**, N 4.— P. 1053—1058.
10. *Microbial synthesis of purine 2'-amino-2'-deoxyribosides* / T. Utagawa, H. Morisawa, S. Yamanaka et al. // *Ibid.*— N 9.— P. 2711—2717.
11. *Imazawa M., Eckstein F.* Synthesis of 3'-azido-2', 3'-deoxyribofuranosyl purines // *J. Org. Chem.*— 1978.—**43**, N 15.— P. 3044—3047.
12. *Vorbruggen H.* Methods of nucleoside synthesis // *Nucleoside analogues. Chemistry, biology and medical applications.*— New York; London: Plenum press, 1979.— V. 26.— P. 35—69.
13. *Analogs of 2'-deoxyadenosine: facile enzymatic preparation and growth inhibitory effects of human cell lines* / M. Ch. Huang, K. Hatfield, A. W. Roetker et al. // *Biochem. Pharmacol.*— 1981.—**30**, N 19.— P. 2663—2671.
14. *Препаративный синтез противовирусного нуклеозида 9-β-D-арабинофуранозиладенина с помощью бактериальных клеток* / Л. А. Ерошевская, В. Н. Барай, А. И. Зинченко и др. // *Антибиотики и мед. биотехнология.*— 1986.—**31**, № 3.— С. 174—178.
15. *Synthesis of kinetin riboside and its 5'-monophosphate by immobilized bacterial cells* / I. A. Mikhailopulo, E. I. Kvasyuk, V. I. Lyakhovets et al. // *Nucl. Acids Symp. Ser.*— 1984.— N 14.— P. 291.
16. *Jensen K. F., Nygaard P.* Purine nucleoside phosphorylase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // *Eur. J. Biochem.*— 1975.—**51**, N 1.— P. 253—265.
17. *Properties of nucleoside phosphorylase from Enterobacter aerogenes* / T. Utagawa, H. Morisawa, S. Yamanaka et al. // *Agr. and Biol. Chem.*— 1985.—**49**, N 11.— P. 3239—3246.
18. *Mikhailopulo I. A., Wieder M., Cramer F.* Substrate specificity of adenosine deaminase: the role of the substituents at the 2'- and 3'-carbons of adenine nucleosides, of their configuration and of the conformation of the furanose ring // *Biochem. Pharmacol.*— 1981.—**30**, N 9.— P. 1001—1004.

Ин-т микробиологии АН БССР, Минск
Ин-т биоорг. химии АН БССР, Минск

Получено 03.06.87