

УДК 579.66:577.15 + 577.113.3

А. И. БЕРЕСНЕВ, Л. А. ЕРОШЕВСКАЯ, С. В. КВАЧ, А. И. ЗИНЧЕНКО

СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ ИЗ α -D-ПЕНТОЗО-1-ФОСФАТОВ БАРИЯ И АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: zinch@mbio.bas-net.by

(Поступила в редакцию 30.12.2014)

Введение. При синтезе модифицированных нуклеозидов ферментативные процессы по сравнению с химическими обладают рядом несомненных преимуществ [1, 2]. Наиболее часто используемыми ферментами для синтеза этих соединений являются нуклеозидфосфорилазы. Традиционная схема синтеза модифицированных нуклеозидов заключается в фосфоролитическом расщеплении молекулы нуклеозида в присутствии неорганического фосфата на азотистое основание и α -D-пентозо-1-фосфат и в последующем переносе фосфорилированного сахарного остатка на другое азотистое основание с образованием соответствующего нового нуклеозида. Однако в некоторых случаях низкая растворимость исходных субстратов и высокая подверженность фосфоролитическому расщеплению целевого продукта приводят к снижению выхода синтезируемых соединений.

В некоторых работах описан метод ферментативного получения модифицированных нуклеозидов с использованием в качестве субстрата синтезированного химическим способом α -D-пентозо-1-фосфата [3, 4]. Этот способ характеризуется высоким выходом целевых продуктов в реакционных смесях, однако недостатком такого подхода получения модифицированных нуклеозидов является сложность химического получения модифицированного α -D-пентозо-1-фосфата, обусловленная образованием при этом большого количества β -изомеров и пиранозных модификаций углеводного компонента.

В научно-технической литературе описаны три основных вида нуклеозидфосфорилаз: уридинфосфорилаза (УРФаза), тимидинфосфорилаза (ТФаза), использующие в качестве субстратов пиримидиновые нуклеозиды, и пуриннуклеозидфосфорилаза (ПурНФаза), использующая в этом качестве нуклеозиды пуринового ряда [5]. Сравнительно недавно опубликованы данные о синтезе модифицированных нуклеозидов с применением еще одной нуклеозидфосфорилазы, а именно пиримидиннуклеозидфосфорилазы (ПирНФазы). Этот фермент воспринимает в качестве субстратов пиримидиновые нуклеозиды, однако обладает более широкой субстратной специфичностью по сравнению с УРФазой и ТФазой [6, 7].

Ранее нами сконструированы генно-инженерные штаммы *Escherichia coli* КНК-12/5 и БМ-Д6, продуцирующие ПирНфазу *T. thermophilus*, которая кодируется мутантным геном *mutdeoA* (мут-ПирНФаза), и гомологичную ПурНФазу соответственно. В одной из наших предыдущих работ впервые продемонстрирована возможность ферментативного фосфорилиза пиримидиновых 2'-деокси- и 2',3'-дидезокси-нуклеозидов, содержащих атом фтора в 3'-положении молекулы, с использованием мутПирНФазы. С учетом продемонстрированного уникального свойства указанного фермента нами предпринята попытка получения пиримидиновых 3'-фторнуклеозидов, содержащих заместители алкильной природы при 5-м атоме углерода азотистого основания.

Цель работы – ферментативное получение α -D-рибозо-1-фосфата и α -D-арабинозо-1-фосфата, а также синтез с применением ПурНФазы *E. coli* и мутПирНФазы *T. thermophilus* различных модифицированных нуклеозидов с использованием в качестве субстратов α -D-пентозо-1-фосфатов и модифицированных азотистых оснований.

Материалы и методы исследования. В работе использовали сконструированные нами ранее генно-инженерные штаммы *E. coli* БМ-Д6 [8] и КНК-12/5 [9], продуцирующие ПурНФазу *E. coli* и мутПирНФазу *T. thermophilus* соответственно. Биомассу штаммов получали путем культивирования бактерий в двухлитровых колбах Эрленмейера, содержащих 0,5 л питательной среды (1 %-ный триптон, 0,5 %-ный дрожжевой экстракт, 0,05 М Na_2HPO_4 , 0,05 М KH_2PO_4 , 0,025 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,75 %-ный (w/v) глицерин, 0,075 %-ная глюкоза, 2 мМ MgCl_2 и 50 мкг/мл канамицина) при 37 °С. По достижении культуральной жидкостью оптической плотности 2,0 ($\lambda = 600$ нм) в среду вносили изопропил- β -D-тиогалактопиранозид до концентрации 0,5 мМ и продолжали культивирование в течение 4 ч. По окончании процесса ферментации бактерии осаждали путем центрифугирования (5 мин при 20 000 g), после чего ресуспендировали в 10 мМ калий-фосфатном буфере (КФБ) (рН 7,0).

Наработанную биомассу клеток рекомбинантных штаммов подвергали ультразвуковой дезинтеграции в приборе Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт, температура – 4 °С, продолжительность – 600 импульсов по 0,5 с. Клеточный лизат осветляли путем центрифугирования в течение 30 мин при 20 000 g. Ферменты, содержащиеся в надосадочной жидкости, подвергали дальнейшей очистке.

Содержащий мутПирНФазу супернатант, полученный после центрифугирования, прогревали в течение 1 ч при 80 °С, после чего центрифугировали в течение 30 мин при 20 000 g. Полученная надосадочная жидкость, содержащая очищенный целевой фермент, использовалась для дальнейшего биокаталитического синтеза модифицированных нуклеозидов.

В супернатанте, содержащем ПурНФазу *E. coli*, концентрацию сульфата аммония доводили до 20 %, затем раствор инкубировали в течение 1 ч при 25 °С и центрифугировали 30 мин при 20 000 g. В образовавшейся надосадочной жидкости концентрацию сульфата аммония доводили до 80 %, затем раствор инкубировали в течение 1 ч при 25 °С и центрифугировали 30 мин при 20 000 g. Осадок белка растворяли в 10 мМ КФБ (рН 7,0), подвергали диализу против 1000-кратного объема того же буфера, а полученный раствор использовали для ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов.

Реакционные смеси, содержащие 100 мМ гуанозин и 100 мМ арабинофуранозилгуанин, инкубировали в присутствии 100 мМ КФБ и 200 ед/мл ПурНФазы *E. coli* в течение 48 ч при температуре 40 °С. Синтезированные в ходе реакций α -D-рибозо-1-фосфат и α -D-арабинозо-1-фосфат выделяли, используя хорошо известный метод, описанный в работе [10].

В реакционные смеси, содержащие 10 мМ 6-меркаптопурин (6-M-Pur), 10 мМ 2-амино-6-хлорпурин (2NH₂-6Cl-Pur), 10 мМ 2-амино-6-метоксипурин (2NH₂-6-O-Me-Pur), 10 мМ N⁶-фуриладенин (N⁶-furfuriladenine; furAde), 10 мМ 5-фторурацил (5-FU), 10 мМ 5-пропилаурацил (5-propUra), 10 мМ 5-бутилаурацил (5-butUra) и 10 мМ 5-октилаурацил (5-octUra), вносили полученные бариевые соли α -D-рибозо-1-фосфата и α -D-арабинозо-1-фосфата до концентрации 10 мМ и инкубировали в присутствии 50 ед/мл ПурНФазы *E. coli* и 50 ед/мл мутПирНФаза *T. thermophilus* 1–2 ч при 40 и 80 °С соответственно. Ход реакций контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Silica gel 60F₂₅₄ (Merck, Германия), используя систему растворителей хлороформ–этанол в соотношении 4:1 (об/об). Расположение пятен субстратов и продуктов на пластине регистрировали в ультрафиолетовом свете, после чего вещества из пятен элюировали в 10 мМ КФБ. Концентрацию продуктов в элюатах определяли с помощью спектрофотометрии, используя известные коэффициенты молярной экстинкции. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре UV-1202 фирмы Shimadzu (Япония).

Структуры синтезированных нуклеозидов подтверждали путем сравнения данных ТСХ и УФ-спектроскопии с образцами нуклеозидов, полученными ранее химическими методами,

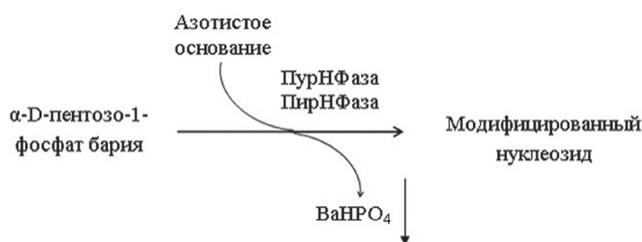


Рис. 1. Схема синтеза модифицированных нуклеозидов

в отдельных случаях – путем сравнения спектральных данных ^1H ядерного магнитного резонанса, УФ- и масс-спектропии.

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой доверительные интервалы среднего арифметического для 95 %-ного уровня вероятности.

Результаты и их обсуждение. Общая схема ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов с использованием в качестве субстратов бариевых солей α -D-рибозо-1-фосфата и α -D-арабинозо-1-фосфата и модифицированных азотистых оснований представлена на рис. 1. Под действием ПурНФазы или мутПирНФазы происходило замещение фосфатного остатка в молекуле α -D-пентозо-1-фосфата на азотистое основание с образованием соответствующего модифицированного нуклеозида.

В отличие от способа получения модифицированных нуклеозидов, предложенного в работе [11], в данной работе в реакционную смесь в качестве донора сахарного остатка вносили соответствующий α -D-пентозо-1-фосфат в виде слаборастворимой бариевой соли. Образующийся в ходе реакции неорганический фосфат связывается с присутствующими в растворе ионами бария, что приводит к количественному выпадению фосфата в осадок в виде нерастворимой в воде бариевой соли. Удаление из раствора неорганического фосфата делает невозможным обратный фосфоролит синтезируемого нуклеозида, что приводит к необратимости ферментативной реакции и практически 100 %-ной конверсии исходного модифицированного азотистого основания в целевой нуклеозид.

В результате проведения описанных выше реакций получены следующие пуриновые и пиримидиновые модифицированные нуклеозиды: 6-меркаптопуриинрибозид (6-M-PurR), 2-амино-6-хлорпуриинрибозид (2NH_2 -6Cl-PurR), 2-амино-6-О-метоксипуриинрибозид (2NH_2 -6-O-Me-PurR),

Ферментативный синтез пуриновых и пиримидиновых модифицированных нуклеозидов из α -D-пентозо-1-фосфатов бария

Донор	Фермент	Акцептор	Продукт	Выход продукта, мол. %
А	МутПирНФаза <i>T. thermophilus</i>	5-FU	5-FUrd	99,5 ± 0,5
		5-propU	5-prop-Urd	0
		5-butU	5-but-Urd	0
		5-octU	5-oct-Urd	0
	ПурНФаза <i>E. coli</i>	6-M-Pur	6-M-PurR	99,6 ± 0,4
		2NH_2 -6Cl-Pur	2NH_2 -6Cl-PurR	99,4 ± 0,6
		2NH_2 -6-O-Me-Pur	2NH_2 -6-O-Me-PurR	99,5 ± 0,5
furAde		furAdo	99,7 ± 0,3	
Б	МутПирНФаза <i>T. thermophilus</i>	5-FU	5-F-araU	99,4 ± 0,6
		5-propU	5-prop-araU	0
		5-butU	5-but-araU	0
		5-octU	5-oct-araU	0
	ПурНФаза <i>E. coli</i>	6-M-Pur	6-M-araPur	99,6 ± 0,4
		2NH_2 -6Cl-Pur	2NH_2 -6Cl-araPur	99,5 ± 0,5
		2NH_2 -6-O-Me-Pur	2NH_2 -6-O-Me-araPur	99,8 ± 0,2
furAde		fur-araA	99,5 ± 0,5	

Примечание. А – α -D-рибозо-1-фосфат бария; Б – α -D-арабинозо-1-фосфат бария.

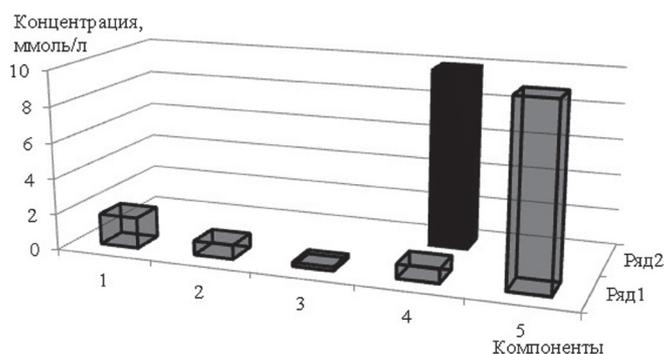


Рис. 2. Компонентный состав реакционных растворов при традиционной и предложенной схемах синтеза модифицированных нуклеозидов. Традиционный состав реакционной смеси (ряд 1): донор сахарного остатка (1), азотистое основание, образованное после фосфорилиза донора сахарного остатка (2), основание-акцептор сахарного остатка (3), целевой продукт (4), неорганический фосфат (5); предложенная технология (ряд 2): целевой продукт (4)

N^6 -фурфуриладенозин (furAdo), 5-фторуридин (5-FUrd) и соответствующие им арабинофуранозильные производные (6-меркаптоарабинофуранозилпурин (6-M-araPur), 2-амино-6-хлорарабинофуранозилпурин (2NH₂-6Cl-araPur), 2-амино-6-О-метоксиарабинофуранозилпурин (2NH₂-6-O-Me-araPur), N^6 -фурфуриларабифуранозилпурин (fur-araA), 5-фторарабинофуранозилурацил (5-F-araU).

Из результатов, представленных в таблице, следует, что перечисленные выше целевые соединения синтезированы с достаточно высоким выходом. Однако в реакционных смесях, содержащих 5-propUra, 5-butUra и 5-octUra, не произошло образования таких целевых продуктов, как 5-пропилуридин (5-propUrd), 5-бутилуридин (5-butUrd), 5-октилуридин (5-octUrd), 5-пропиларабинофуранозилурацил (5-prop-araU), 5-бутиларабифуранозилурацил (5-but-araU), 5-октиларабифуранозилурацил (5-oct-araU). Это можно объяснить неспособностью активного центра мутПирНФазы связываться с модифицированным азотистым основанием ввиду объемного углеводородного гидрофобного заместителя в N^5 -положении гетероцикла.

ПурНФаза *E. coli* обладает относительно широкой субстратной специфичностью и, исходя из данных таблицы, наличие заместителей различной природы в N^6 -положении гетероцикла не приводит к заметному снижению каталитической активности фермента.

Кроме того, следует отметить, что процедура выделения из реакционной смеси синтезированных по предложенной технологии нуклеозидов существенно упрощается, поскольку в растворе находятся только целевые продукты. В то же время в реакционных смесях, состав которых описан в работах [12, 13], кроме целевых нуклеозидов присутствуют примеси других компонентов нуклеиновых кислот, а также неорганический фосфат (рис. 2).

Заключение. Таким образом, в результате выполненной работы впервые предложена технология получения 5-FUrd, 6-M-PurR, 2NH₂-6Cl-PurR, 2NH₂-6-O-Me-PurR, furAdo и их арабинофуранозильных производных из α -D-рибозо-1-фосфата бария, α -D-арабинозо-1-фосфата бария и соответствующих модифицированных оснований с использованием рекомбинантных ПурНФазы *E. coli* и мутПирНФазы *T. thermophilus*. Указанная методика отличается от описанных в литературе аналогов количественными высокими выходами целевых продуктов и упрощением их выделения из реакционных смесей.

Литература

1. Барай В. Н. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2002. N 2. С. 112–118.
2. Mikhailopulo I. A., Miroshnikov A. I. // Mendeleev Commun. 2011. Vol. 21. P. 57–68.
3. Horinouchi N., Kawano T., Sakai T. et al. // New Biotechnol. 2009. Vol. 26. P. 75–82.
4. Taverna-Porro M., Bouvier L. A., Pereira C. A. et al. // Tetrahedron Lett. 2008. Vol. 49. P. 2642–2645.
5. Li N., Smith T. J., Zong M. H. // Biotech. Adv. 2010. Vol. 28. P. 348–366.
6. Shimizu K., Kunishima N. // Acta. Crystallogr. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun. 2007. Vol. 63, N 4. P. 308–310.
7. Szeker K., Zhou X., Schwab T. et al. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2012. Vol. 84. P. 27–34.
8. Квач С. В., Шахбазов А. В., Зинченко А. И. и др. // Микробная биотехнология: фонд. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. 2007. Т. 1. С. 117–124.
9. Береснев А. И., Квач С. В., Сивец Г. Г. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 3. С. 73–77.
10. Asano Y., Mihara Y., Yamada H. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 1999. Vol. 6. P. 271–277.

11. *Herk T., Hartog A. F., Burg A. M. et al. // Adv. Synth. Catal. 2005. Vol. 347. P. 1155–1162.*
12. *Krenitsky T. A., Koszalka G. W., Tuttle J. V. // Biochem. 1981. Vol. 20. P. 3615–3621.*
13. *Fernandez-Lucas J., Fresco-Taboada A., de la Mata I. et al. // Biores. Technol. 2012. Vol. 115. P. 63–69.*

A. I. BERESNEV, L. A. EROSHEVSKAYA, S. V. KVACH, A. I. ZINCHENKO

**SYNTHESIS OF MODIFIED NUCLEOSIDES FROM α -D-PENTOSE-1-PHOSPHATES AND NUCLEOBASES
USING BACTERIAL NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASES**

Summary

Using recombinant bacterial nucleoside phosphorylases the technology of enzymatic synthesis of 2-amino-6-chloropurine riboside, 2-amino-6-O-methylpurine riboside, N⁶-furfuryladosine, 5-fluorouridine and their arabinofuranoside derivatives from α -D-pentose-1-phosphates and nucleobases was demonstrated.