



УДК 547.963.057:577.325

НОВЫЕ ФОТОАКТИВНЫЕ N⁴-ЗАМЕЩЕННЫЕ АНАЛОГИ dСТР: ПОЛУЧЕНИЕ, ФОТОХИМИЧЕСКИЕ И СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА ПРИ СИНТЕЗЕ ДНК, КАТАЛИЗИРУЕМОМ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗОЙ ВИЧ-1

© 1997 г. И. В. Сафронов, Н. В. Щербик, С. Н. Ходырева, В. А. Власов*,
М. И. Добриков, Г. В. Шишкин, О. И. Лаврик[#]

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 30.08.96 г. Принята к печати 19.02.97 г.

Сопоставлены фотохимические и субстратные свойства аналогов dСТР: описанных ранее N⁴-[2-(4-азидотетрафторбензоиламино)этил]- и 5-[*транс*-3-(4-азидотетрафторбензоиламино)-1-пропенил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфатов, а также четырех впервые синтезированных – N⁴-[2-(2-нитро-5-азидобензоиламино)этил]-, N⁴-[2-(4-азидотетрафторбензилиденаминооксиметилкарбамоил)этил]-, N⁴-[4-(4-азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонил)бутилкарбамоил]- и N⁴-[4-(4-азидотетрафторбензилиденаминоокси)бутилокси]-2'-дезокситидин-5'-трифосфатов. Новые аналоги более чем в 10 раз фотоактивнее при облучении УФ-светом с длиной волны 303–313 нм. Последнее производное используется обратной транскриптазой ВИЧ-1 только как dТТР, а остальные – как dСТР и dТТР. Все аналоги после включения в 3'-конец праймера не терминируют дальнейший синтез ДНК с природными трифосфатами.

Ключевые слова: аналоги dСТР, перфторарилазиды, обратная транскриптаза ВИЧ-1.

Ранее было показано, что замещенные по основанию аналоги 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов являются субстратами в реакции синтеза ДНК, катализируемой ДНК-полимеразой α человека [1] и обратной транскриптазой вируса иммунодефицита человека HIV1-RT [2]. Производные dСТР, несущие перфторарилазидогруппу, введенную по экзоциклической аминогруппе и по 5-положению основания, – соответственно N⁴-[2-(4-азидотетрафторбензоиламино)этил]- (I) и 5-[*транс*-3-(4-азидотетрафторбензоиламино)-1-пропенил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (II) – были успешно использованы для модификации ДНК-полимераз и ДНК-матриц, находившихся в комплексе с ферментами [2, 3]. Особая привлекательность этих аналогов заключается в возможности проводить “каталитическое компетентное мечение”, т.е. использовать субстратную активность остатка dСТР, сохраняющуюся после его ковалентного фотоприсоединения к биомолекуле, для селективного матрично-зависимого введе-

ния в нее радиоактивной метки, находящейся в праймере или в следующем присоединяемом dНТР.

Для фотоприсоединения аналогов (I) и (II) использовалась их 4-азидотетрафторбензоильная группа. Перфторарилазиды считаются одними из наиболее перспективных реагентов для фотоаффинной модификации ферментов [4]. При их облучении образуется высокорекреационноспособная частица – синглетный нитрен [5], который способен реагировать практически с любой ближайшей функциональной группой биополимера. Модификация протекает настолько быстро, что ни один аффинный комплекс не успевает диссоциировать [6], что позволяет предотвратить неспецифическую модификацию. К сожалению, для достаточно быстрого фотолиза 4-азидотетрафторбензоильной группы, примененной в аналогах (I) и (II), требуется УФ-свет с длиной волны 280–300 нм. Многие ферментные системы чувствительны к такому свету и при облучении быстро теряют активность. Чтобы этого избежать, необходимо заменить фотоактивную 4-азидотетраф-

[#] Автор для переписки (тел.: (383-2) 35-62-96, факс: (383-2) 35-16-65, e-mail: lavrik@modul.bioch.nsk.su).

торбензоильную группу на другую, перфторарил-азидную, чувствительную к УФ-свету с длиной волны более 300 нм. Недавно были разработаны и охарактеризованы две такие фотоактивные группы: 4-азидотетрафторбензилиденаминоокси- и 4-азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонильная [7].

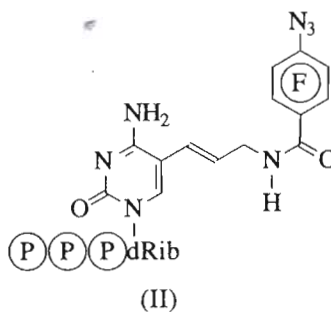
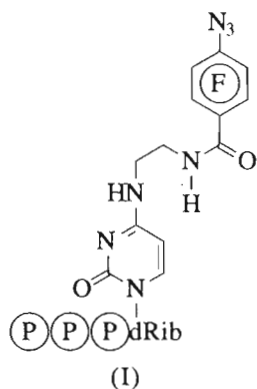
Получение новых аналогов dNTP представляет значительный интерес для исследования механизма действия ферментов и разработки селективных и необратимых ингибиторов ДНК-полимераз. Ранее было показано [3], что аналог (I) способен встраиваться в растущий праймер не только вместо dCTP, но и вместо dTTP. Было предположено, что это могло быть результатом увеличения вклада минорной таутомерной иминоформы пиримидинового основания, которое происходит при введении алкильных заместителей в экзоциклическую аминогруппу цитозина [8]. Считается, что в процессе эволюции основания, способные к легким переходам из одной таутомерной формы в другую, отбрасывались, так как приводили к слишком большой изменчивости [8]. В связи с этим представляет интерес синтез и проверка субстратных свойств новых аналогов dCTP, в которых таутомерное равновесие сдвинуто в иминоформу, таких, как N⁴-алкилокси- или N⁴-алкилкарбамоилзамещенных аналогов dCTP [8–10]. Использование таких производных может еще сильнее, чем в случае аналога (I), повлиять на специфичность отбора dNTP ДНК-полимеразой, особенно в случае вирусных ферментов.

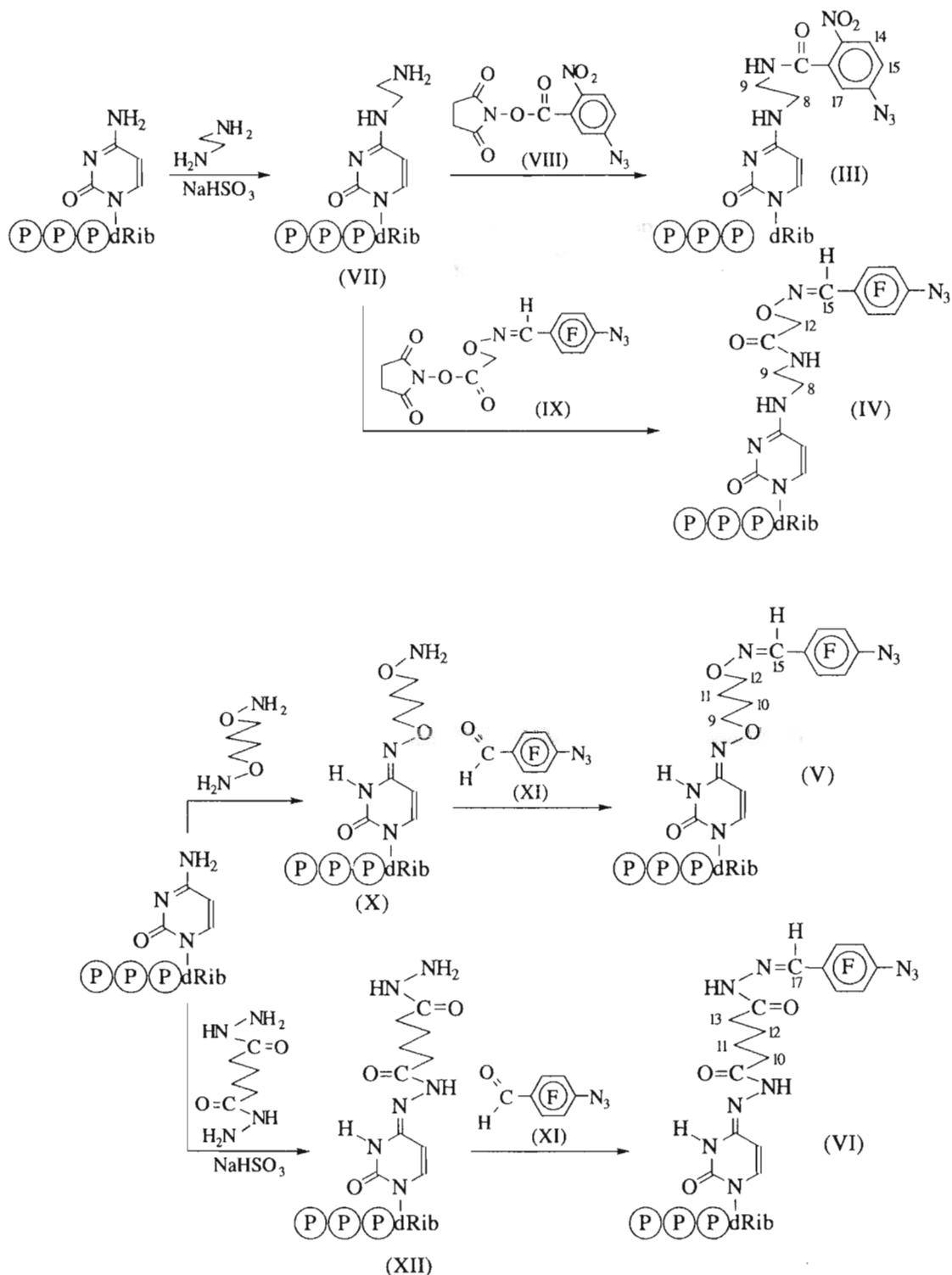
В качестве объекта для изучения субстратных свойств фотоактивных аналогов dCTP в данной работе была выбрана HIV-1-RT. Этот фермент в последние годы интенсивно исследовался в связи с его важнейшей ролью в репликации вируса. HIV-1-RT является главным объектом для разработки ингибиторов вируса иммунодефицита. Значительные успехи были достигнуты в рентгено-

структурном анализе этого фермента [11] и его комплекса с ДНК-дуплексом [12]. В то же время структура dNTP-связывающего участка и механизм взаимодействия HIV-1-RT с dNTP еще далеки от понимания. Поэтому применение для этих целей фотореакционноспособных аналогов dNTP представляет значительный интерес. Для детального изучения топографии трифосфатсвязывающих центров полимераз очень удобным инструментом могут быть аналоги нуклеозидтрифосфатов, содержащие фотореакционноспособные группы в разных положениях. Введение фотоактивных групп в N⁴-положение цитидина, в положение 5 уридина и цитидина и в положение 8 адеозина описано ранее [3, 13].

Данная работа посвящена синтезу новых фотореакционноспособных аналогов dCTP, содержащих различные N⁴-заместители, изучению их фотохимических и субстратных свойств в реакции синтеза ДНК, катализируемой HIV-1-RT, и выявлению влияния строения этих аналогов на специфичность их отбора ферментом.

Синтезированы четыре новых N⁴-замещенных фотореакционноспособных аналога dCTP: N⁴-[2-(2-нитро-5-азидобензоиламино)этил]-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфат (III), N⁴-[2-(4-азидотетрафторбензилиденаминооксиметилкарбамоил)этил]-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфат (IV), N⁴-[4-(4-азидотетрафторбензилиденаминоокси)бутилокси]-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфат (V) и N⁴-[4-(4-азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонил)бутилкарбамоил]-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата (VI) (схема). Аналоги различаются типом арил-азидной группы (2-нитро-5-азидобензоильная группа (аналог III) при фотолизе генерирует главным образом триплетный нитрен, остальные аналоги – синглетный), типом заместителей при 4-аминогруппе, а также общим размером нуклеотида.





Приведенная на схеме нумерация атомов углерода используется в "Экспер. части" для обозначения СН-протонов в ^1H -ЯМР-спектрах.

Синтез аналогов (III) и (IV) проводили в две стадии: сначала получали N^4 -(2-аминоэтил)-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (VII) бисульфиткатализируемым переаминированием dCTP этилендиамином, а затем ацилировали его по первичной алифатической аминогруппе сукцинимидными

эфирами 5-азидо-2-нитробензойной кислоты (VIII) и 4-азидотетрафторбензилиденаминооксисукциновой кислоты (IX) соответственно.

Аналог (V) синтезировали также в две стадии. Сначала получали N^4 -[4-аминооксибутилокси]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (X) переаминиро-

ванием dCTP O-(4-аминооксибутил)гидроксил-амином. Синтез проводили с использованием данных, представленных в работах [10, 13]. На второй стадии добавляли к раствору аналога (X) 4-азидотетрафторбензальдегид (XI) при pH 4.0.

Вещество (VI) синтезировали аналогично. Сначала получали N⁴-[4-(гидразинокарбонил)бутилкарбамоил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (XII) бисульфиткатализируемым переаминированием dCTP дигидразидом адипиновой кислоты в условиях, близких к описанным в работе [14] для переаминирования семикарбазидом, а затем обрабатывали свободную гидразидогруппу нуклеотида (XII) 4-азидотетрафторбензальдегидом (XI) при pH 4.0.

Были изучены спектральные и фотохимические свойства аналогов (III)–(VI) и сопоставлены со свойствами ранее описанных веществ (I) и (II) (таблица).

Видно, что для аналогов dCTP (III)–(VI) сопряжение азидогруппы с хромофорными заместителями, находящимися к ней в пара-положении, приводит к значительному bathochromному сдвигу максимума поглощения по сравнению с исходным dCTP и ранее описанными аналогами (I) и (II). Это позволяет надеяться на возможность их селективной активации длинноволновым УФ-светом, не вызывающим повреждения биополимеров. Для количественной оценки этого у всех аналогов dCTP было определено время полуфотоллиза ($\tau_{1/2}$) при облучении УФ-светом в диапазоне 303–313 нм. В этих условиях аналоги (III)–(V) в 10 раз, а аналог (VI) в 20 раз более фотоактивны, чем ранее описанные аналоги (I) и (II). Следовательно, по фотохимическим свойствам из перфторированных аналогов dCTP соединения (VI) наиболее перспективно для селективной фотоаффинной модификации биополимеров.

Соединение (VI) содержит наиболее фотореакционноспособную среди синтезированных аналогов 4-азидотетрафторбензальдегидазидогруппу. На рис. 1 представлены данные по изменению спектра поглощения аналога (VI) при облучении. Исходный аналог имеет широкую полосу поглощения с максимумом при 303 нм, простирающуюся в длинноволновую область до 330 нм и имеющую плечо в районе 290 нм, там, где поглощает гидразон (XII). При облучении до времени полуфотоллиза сохраняются изобестические точки на 225, 270 и 335 нм, что свидетельствует о протекании только одного фотохимического процесса по схеме A → B. При этом наблюдается резкое уменьшение максимума при 303 нм и спектр конечного продукта фотоллиза имеет максимум поглощения при 290 нм и напоминает спектр соединения (XII). Следует отметить, что в указанных условиях аналог (XII) нефотоактивен.

Спектральные и фотохимические свойства аналогов (I)–(VI)

Аналог	dCTP	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)
λ_{max} , нм	270	260	256	320	279	284	303
$\epsilon \times 10^{-4}$, M ⁻¹ см ⁻¹	0.9	2.3	2.8	0.8	3.6	2.7	2.6
$\tau_{1/2}^*$, с	–	1200	1200	100	120	120	50

* Время полуфотоллиза при облучении УФ-светом с длиной волны 303–313 нм см. в "Экспер. части".

Для аналогов (I)–(VI) были проверены субстратные и терминирующие свойства в реакции ДНК- и РНК-зависимого синтеза ДНК, катализируемого HIV1-RT с использованием синтетических олигонуклеотидов в качестве матрично-затравочных систем.

В первом случае использовали матрично-затравочную систему А (см. "Экспер. часть"), в которой в соответствии с последовательностью матрицы первым должен встраиваться dCMP, а затем два dAMP.

Как видно из рис. 2, все аналоги dCTP, за исключением аналога (V), включаются HIV1-RT в меченый праймер, замещая dCTP при инкубации фермента в присутствии одного из аналогов dCTP (дорожки 1, 4, 7, 10, 13, 16), и не блокируют последующий матрично-зависимый синтез ДНК природными dNTP (дор. 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18), т.е. аналоги не являются строгими терминаторами. Электрофоретическая подвижность олигонуклеотидов, элонгированных производными dCTP, меньше, чем для праймера, удлиненного dCMP (дор. 19). Этот эффект особенно заметен для олигонуклеотидов, несущих модифицированный остаток dCMP на 3'-конце, причем размер шага практически одинаков для аналогов (I)–(IV)

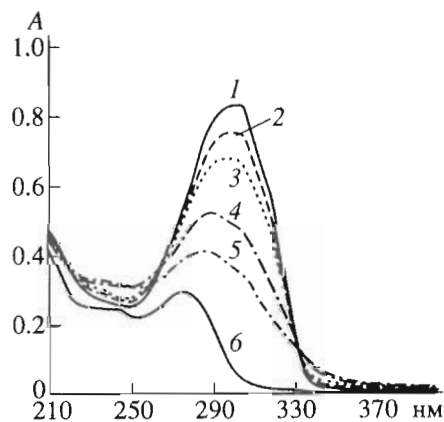


Рис. 1. Изменение УФ-спектра при фотоллизе вещества (VI). Время облучения (с): 0 (1), 10 (2), 30 (3), 60 (4), 180 (5); 6 – спектр вещества (XII). Условия приведены в "Экспер. части".

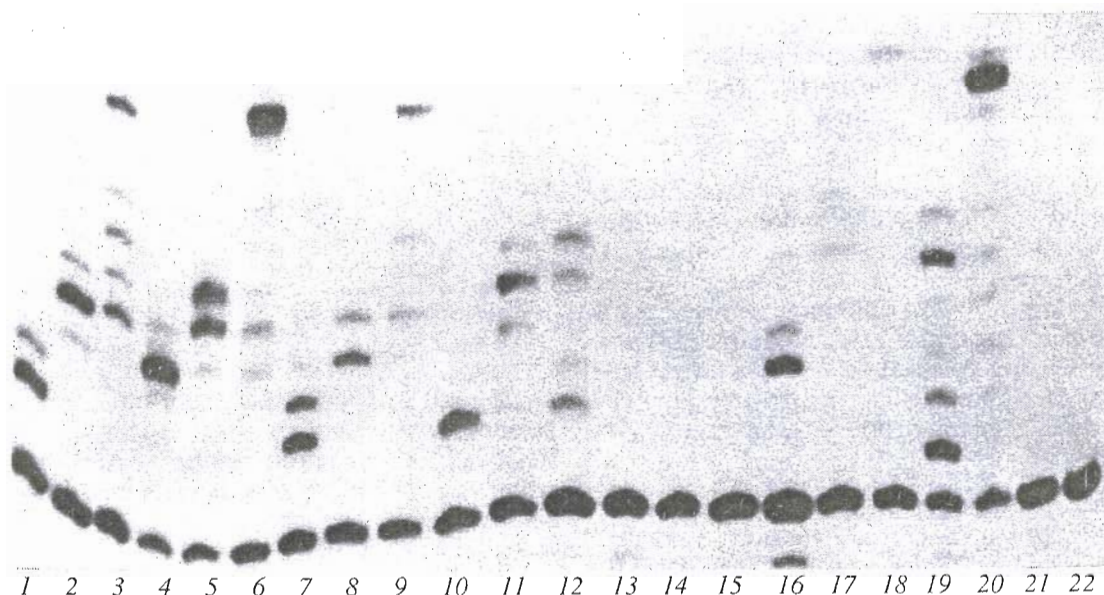


Рис. 2. Проверка субстратных свойств фотоактивируемых аналогов dCTP в реакции синтеза ДНК, катализируемой HIV1-RT, с использованием в качестве матрично-затравочной системы А (см. "Экспер. часть"). Реакционные смеси содержали стандартные компоненты (см. "Экспер. часть"), аналоги dCTP использовали в концентрации 10 мкМ, 3dNTP (без dCTP) или dATP (там, где они присутствовали) – в концентрациях по 50 мкМ: 1 – аналог (I), 4 – (II), 7 – (III), 10 – (IV), 13 – (V), 16 – (VI); 2, 5, 8, 11, 14, 17 – dATP + аналоги (I)–(VI) соответственно; 3, 6, 9, 12, 15, 18 – 3dNTP + аналоги (I)–(VI) соответственно; 19 – dCTP, 20 – 4dNTP, 21 – без dNTP, 22 – меченый праймер.

и несколько больше в случае соединения (VI). Модифицированные остатки dCMP, находящиеся не на конце олигонуклеотидов, влияют на подвижность не так сильно.

Для аналогов (I)–(III) и (VI) наблюдается довольно высокий уровень некомплементарного матрице включения (вместо dAMP). Следует отметить, что для системы А наблюдается значительный уровень ошибочного включения даже для природного dCTP: в присутствии в смеси для полимеризации только dCTP происходит заметное элонгирование праймера на шесть шагов (рис. 2, 19). Эти результаты можно объяснить тем, что HIV1-RT проявляет значительно более низкую точность синтеза ДНК в сравнении с другими ДНК-полимеразами [15–18]. Низкая точность синтеза обусловлена уникальной способностью этого фермента элонгировать праймеры, содержащие на 3'-конце некомплементарный нуклеотид [17, 19]. Более того, для HIV1-RT при использовании олигонуклеотидов в качестве матрично-праймерных систем в ряде случаев отмечена способность фермента производить некомплементарное встраивание нескольких dNMP подряд [17]. Следует подчеркнуть, что для производного (II) с заместителем в положении 5 ошибочное включение аналога происходит на втором и даже третьем шаге исключительно эффективно, так что при анализе продуктов реакции практически не остается праймера, элонгированного на один шаг (рис. 2, 4). Анализ продуктов реакции

синтеза ДНК, проводимой в присутствии dATP и одного из аналогов dCTP, показывает, что происходит дальнейшая элонгация праймеров, содержащих на 3'-конце аналог dCMP (рис. 2, 2, 5, 8, 11, 17), вплоть до позиции, соответствующей последовательному включению СААТТ.

При проведении реакции синтеза ДНК в смесях, содержащих три природных dNTP и один из аналогов dCTP, образование полноразмерных продуктов происходит с низкой эффективностью в присутствии аналогов (I), (III) и (VI) (рис. 2, 3, 9, 18). В присутствии аналога (IV) и трех природных dNTP образование полноразмерных продуктов также происходит, но с еще более низкой эффективностью (данные не представлены). Для аналога (II) и dCTP синтез полноразмерных продуктов проходит достаточно быстро и эффективно (рис. 2, 6, 20). Таким образом, можно видеть, что в случае системы А ошибочность встраивания для аналогов (I)–(VI) возрастает в ряду (III) \leq (I) \leq (IV) $<$ (VI) $<$ (II) \leq dCTP, т.е. введение заместителей в N⁴-положение снижает ошибочность встраивания по сравнению с 5-замещенным и природным dCTP, что может оказаться важным преимуществом таких аналогов при локализации места фотоаффинной модификации HIV1-RT.

Во втором случае для тестирования субстратных и терминирующих свойств аналогов (I)–(VI) использовали матрично-праймерную комбинацию Б, в которой, согласно последовательности,

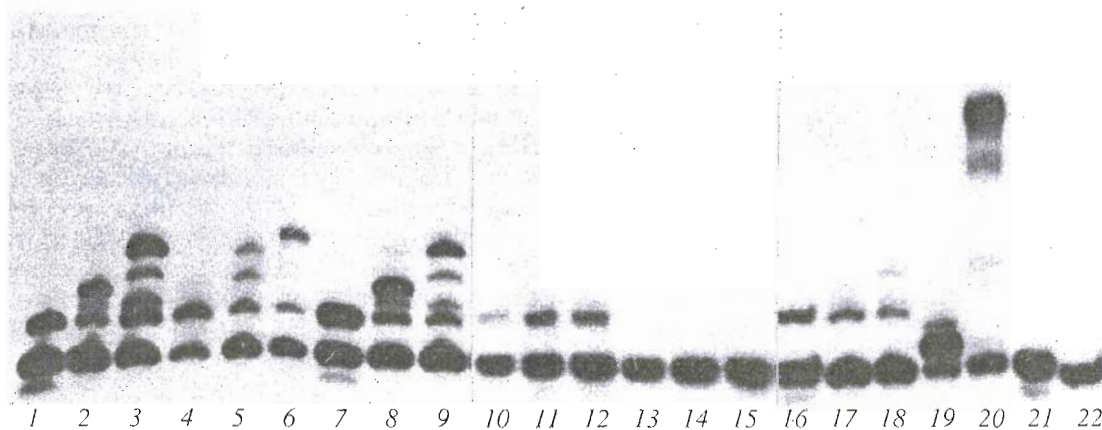


Рис. 3. Проверка субстратных свойств фотоактивируемых аналогов dCTP в реакции синтеза ДНК, катализируемой HIV1-RT, с использованием матрично-затравочной системы Б (см. "Экспер. часть"). Реакционные смеси содержали стандартные компоненты (см. "Экспер. часть"), аналоги dCTP использовали в концентрации 10 мкМ, 3dNTP (без dCTP) или dATP (там, где они присутствовали) – в концентрациях по 50 мкМ: 1 – аналог (I), 4 – (II), 7 – (III), 10 – (IV), 13 – (V), 16 – (VI); 2, 5, 8, 11, 14, 17 – dTTP + аналоги (I)–(VI) соответственно; 3, 6, 9, 12, 15, 18 – 3dNTP + аналоги (I)–(VI) соответственно; 19 – dCTP, 20 – 4dNTP, 21 – без dNTP, 22 – меченый праймер.

первым по встраиванию должен быть dCMP, а затем два dTMP (рис. 3).

Ранее в работе [2] с использованием этой же матрично-затравочной системы при больших концентрациях (50 мкМ) аналога (II) наблюдалась элонгация праймера на два шага, т.е. на первом шаге проходило встраивание аналога (II) комплементарно матрице, а затем, на втором шаге, этот аналог использовался ферментом в качестве dTTP. Возможность имитации dTTP была продемонстрирована и для аналога (I) при ДНК-зависимом синтезе ДНК, катализируемом HIV1-RT с использованием ДНК фага M13 и 17-звенного синтетического олигонуклеотида в качестве матрично-затравочной системы [3]. В этом случае аналог (I) так же встраивался, как dTMP, когда в смеси для синтеза ДНК отсутствовал dTTP.

Точность матрично-зависимого синтеза в данном случае гораздо выше, и только в присутствии dCTP наблюдается небольшое накопление продукта удлинения праймера на два нуклеотида (рис. 3, 19). Все исследованные аналоги dCTP, за исключением аналога (V), обладают достаточно хорошими субстратными свойствами (дор. 1, 4, 7, 10, 16). Для аналога (V) продуктов встраивания в праймер в данных условиях проведения реакции не наблюдается (дор. 13). Последующее удлинение праймеров, элонгированных на первом шаге аналогами, до полномерных продуктов происходит гораздо медленнее, чем в случае матрично-праймерной системы А. В условиях, когда примерно половина праймеров достраивается HIV1-RT до полномерных продуктов в присутствии четырех природных трифосфатов (рис. 3, 20), наблюдается лишь частичное удлинение праймеров, элонгированных на первом шаге аналогами

(I)–(III) и (VI), и только намечается в случае соединения (IV) (рис. 3, 3, 6, 9, 12, 18). Таким образом, эти производные dCTP не терминируют дальнейший синтез ДНК, будучи включенными в 3'-конец растущего праймера, но скорость синтеза ДНК после включения производных dCTP неодинакова для разных аналогов и в случае производных с более объемными заместителями в положении 4 dCTP элонгирование праймеров, содержащих эти остатки, происходит медленнее (дор. 11, 12, 17, 18 и 2, 3, 8, 9). В то же время для аналогов (I) и (III), имеющих примерно одинаковый размер, но различающихся присоединенной фотоактивируемой группой, характер продуктов синтеза практически одинаков. В целом эффективность встраивания аналогов dCTP вместо dCTP с использованием системы Б снижается в последовательности dCTP > (I) ≥ (II) ≥ (III) > (VI) ≥ ≥ (IV) ≫ (V) как в отсутствие природных трифосфатов (дор. 1, 7, 10, 16, 4, 13), так и в присутствии следующего, комплементарного матрице dTTP (дор. 2, 8, 11, 17, 5, 14) или всех природных dNTP, кроме dCTP (дор. 3, 9, 12, 18, 6, 15). В ряду N⁴-этиленаминокarbonильных производных dCTP (I), (III) и (IV) наблюдается некоторое снижение субстратной активности и увеличение терминирующих свойств с увеличением размера арилизидного остатка (дор. 3, 9, 12). Субстратные свойства N⁴-алкилпроизводных (I), (III), (IV) в целом лучше, чем N⁴-карбамоил- (VI) и особенно N⁴-оксипроизводных (V). Эти результаты не противоречат предположению о влиянии таутомерного равновесия между амино- и иминоформами пиримидинов на специфичность их узнавания в качестве тимидина или цитидина. Известно [8], что введение электроотрицательных заместителей в экзоциклическую аминогруппу цитидина вызывает пони-



Рис. 4. Проверка субстратных свойств фотоактивируемых аналогов dCTP в реакции синтеза РНК-зависимого синтеза ДНК, катализируемой HIV1-RT с использованием матрично-затравочной системы В (см. "Экспер. часть"). Реакционные смеси содержали стандартные компоненты (см. "Экспер. часть") и один из аналогов dCTP в концентрации 10 мкМ или dTTP (50 мкМ): 1 – аналог (I), 2 – (III), 3 – (IV), 4 – (V), 5 – (VI), 6 – dTTP, 7 – без dNTP.

жение значения ее pK_a и заметно сдвигает таутомерное равновесие из нормальной аминной формы в минорную иминоформу. Находясь в этой форме, аналоги (V) и (VI) по способности образовывать уотсон-криковские водородные связи больше напоминают dTTP, чем dCTP, и поэтому они хуже включаются в праймер вместо dCTP. Полное отсутствие продуктов удлинения праймера при использовании аналога (V) позволяет предположить, что он существует исключительно в иминоформе. Согласно структуре матрицы, следующей позицией по встраиванию за dCMP является dTMP, однако встраивания аналогов (I), (III), (IV) и (VI) в качестве dTTP в праймеры, предварительно ими же элонгированные, в условиях проведения эксперимента не происходит (рис. 3, 1, 7, 10, 16). Заметное элонгирование праймера на два шага наблюдается только для аналога (II) и dCTP, т.е. ошибочное элонгирование праймеров, уже содержащих на 3'-конце один из аналогов dCMP, замещенных по положению N^4 основания, происходит значительно хуже, чем для аналога (II), где заместитель введен в положение 5, или природного dCTP.

Как уже отмечалось, синтезированные аналоги могут имитировать dTTP. В связи с этим представлялось интересным исследовать возмож-

ность использования этих N^4 -производных dCTP в качестве аналогов dTTP. На рис. 4 приведен радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов реакции РНК-зависимого синтеза ДНК с матрично-затравочной системой В. Аналоги (I), (III)–(V) однократно встраиваются в праймер, после чего дальнейшая элонгация праймера прекращается (рис. 4, 1–4 соответственно). Для аналога (VI) наблюдается включение двух остатков аналога в праймер и затем синтез terminates (рис. 4, 5). При последующем добавлении dTTP все праймеры, элонгированные аналогами (I)–(VI), давали полномерные продукты. При использовании в качестве матрично-затравочной системы синтетических гетероолигонуклеотидов, в которой первым остатком по встраиванию, согласно структуре матрицы, должен быть dTMP, также наблюдается включение аналогов (I)–(VI) в праймер и дальнейшая элонгация праймеров, содержащих на конце модифицированный остаток dCTP, в присутствии природных dNTP, причем наиболее эффективно в качестве dTTP встраиваются аналоги (II), (V) и (VI) (данные не представлены).

В целом для N^4 -карбамоилэтильных производных dCTP (I), (III), (IV) увеличение арилизидного остатка снижает эффективность использования в качестве dTTP. Аналоги dCTP с повышенным содержанием иминоформы (V) и (VI) включаются в праймер вместо dTTP эффективнее, чем N^4 -карбамоилэтильные производные. Следует особо подчеркнуть, что аналог (V) во всех использованных нами матрично-затравочных комплексах узнавался HIV1-RT только как dTTP и не встраивался как dCMP (рис. 2, 13–15, рис. 3, 13–15; рис. 4, 4).

Таким образом, введение фотореакционно-способных групп по экзоциклической аминогруппе dCTP не вызывает потерю субстратных свойств полученных аналогов в реакции полимеризации ДНК, катализируемой HIV1-RT. Направленная модификация пиримидинового основания, приводящая к сдвигу таутомерного равновесия в сторону иминоформы, позволяет получить аналоги, имитирующие dTTP. Вновь синтезированные аналоги dCTP могут быть использованы для фотоаффинной модификации HIV1-RT, а также ДНК-матрицы в комплексе с этим ферментом при УФ-облучении в области >300 нм, где не наблюдается фотоинактивации белков и нуклеиновых кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали poly(rA) (Boehringer-Mannheim), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, трис-гидроксиметиламинометан (Sigma), синтетические олигонуклеотиды (Oregon corporation, США), Т4-полинуклеотидкиназу ("Сибэнзим", Новосибирск), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с уд. акт. $>$

> 110 ТБк/ммоль ("Биосан", Новосибирск), реактивы для электрофореза в ПААГ (Sigma), неионный детергент Nonidet-P40 (Serva), 2-меркаптоэтанол (Fluka), Polysil SA-500 ("Вектор", Кольцово), Sephadex G-10 (Pharmacia, Швеция), LichroPrep RP-18 (Merck, ФРГ).

dCTP любезно предоставлен В.С. Богачевым (НИБХ СО РАН); дигидробромид O-(4-аминоксидутил)гидроксиламина, синтезированный как описано в работе [20], – В.И. Высочиным (НИБХ СО РАН), а сукцинимидный эфир 5-азидо-2-нитробензойной кислоты (VIII), синтезированный по методике [21], – Т.А. Приходько (НИБХ СО РАН). Рекомбинантная обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека, гетеродимерная форма (КФ 2.7.7.49), была выделена из штамма *E. coli* DH5, несущего плазмиду PUC 12N, содержащую ген *pol* вируса иммунодефицита человека, согласно [22] с некоторыми модификациями.

Производные dCTP анализировали микроколоночной хроматографией (МКХ) на хроматографе "Милихром-2" на колонке (2 × 62 мм) Polysil SA-500 в ступенчатом градиенте K₂HPO₄, рН 7.5, в 30% метаноле (ступени [K₂HPO₄], М): 0.0 – 400 мкл; 0.10; 0.15; 0.20; 0.25; 0.30; 0.40 – по 300 мкл; общий объем градиента 2.2 мл; скорость 200 мкл/мин; многоволновая детекция. Математическую обработку полученных денситограмм проводили с помощью программы "Chrom" (А.П. Зенков, НИБХ СО РАН). Препаративные хроматографии проводили с помощью HPLC-насоса HPP 5001 (Чехия) и хроматографического комплекта фирмы LKB (Швеция): Uvicord SD/Ultragas II. Спектры ¹H-ЯМР записывали на спектрометре AC-200 (Bruker, Германия) на частоте 200.13 МГц в D₂O; КССВ приведены в Гц. УФ-спектры записывали на спектрофотометре Spesord M-40 (Karl Zeiss, Германия); приведены λ_{max} (нм) и ε (М⁻¹ см⁻¹). Фотолиз производных dCTP проводили светом ртутной лампы высокого давления ДРК-120 осветителя ОИ-18А (ЛОМО, Санкт-Петербург) через фильтры ЖС-3 и УФС-2 (303–313 нм, W = 1 × 10⁻⁴ Вт/см²). Мощность излучения лампы (W) в диапазоне 303–313 нм определяли с помощью ферриоксалатного актинометра [23]. Чистоту выделенного препарата обратной транскриптазы проверяли с помощью электрофореза в ПААГ по Лэммли [24] с последующей окраской серебром [25].

Сукцинимидный эфир 4-азидотетрафторбензилиденаминооксиметилкарбоновой кислоты (IX) синтезирован так, как описано в работе [21].

Производные dCTP, N⁴-(2-аминоэтил)-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (VII), N⁴-[2-(4-азидотетрафторбензоиламино)этил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (I) и 5-[*транс*-3-(4-азидотетрафторбензоиламино)-1-пропенил]-2'-дезоксиди-

тидин-5'-трифосфат (II), синтезированы по методике, описанной в работе [13].

N⁴-[2-(2-Нитро-5-азидобензоиламино)этил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (III). К раствору 53 мг (85 мкмоль) Na₄-соли трифосфата (VII) в 13 мл 0.5 М триэтанолламин-НСl (рН 8.0) добавляли при перемешивании 40 мг (130 мкмоль) реагента (VIII) в 7 мл DMF. Через 1 ч реакционную смесь наносили на колонку (2.5 × 100 см), заполненную сорбентом Sephadex G-10, уравновешенным H₂O. Элюцию проводили H₂O со скоростью 20 мл/ч. Фракции, содержащие нуклеотидный материал, собирали и наносили на колонку (1 × 25 см), заполненную сорбентом Polysil SA-500 в фосфатной форме, уравновешенным 10 мМ K₂HPO₄ (рН 7.5) в 10% метаноле, и элюировали в градиенте 0.01–1 М K₂HPO₄ (рН 7.5) в 10% метаноле. Состав поглощающих при 277 нм фракций контролировали МКХ. Фракции, содержащие больше 98% аналога (III), собирали, концентрировали на ротационном испарителе и наносили на колонку (1 × 8 см), заполненную сорбентом LichroPrep RP-18. Элюцию проводили в градиенте 0–50% метанола. Фракции, содержащие аналог (III), собирали и лиофилизировали на лиофильной сушке LGA 05 (Германия). Выход K₄-соли (III) 64 мг (79 мкмоль, 93%). Чистота полученного препарата (III) была выше 99%. УФ-спектр: λ_{max} (ε): 278 (1.2 × 10⁴), 322 (0.84 × 10⁴). ¹H-ЯМР (D₂O), δ: 2.35–2.55 (м, H₂', 2H), 3.65–3.85 (м, H₈, H₉, 4H), 4.20–4.40 (м, H₅', H₄', 3H), 4.6–4.7 (м, H₃', 1H), 6.24 (д, J 7.5, H₅, 1H), 6.44 (т, J 6.5, H₁', 1H), 7.20 (д, J 2.5, H₁₇, 1H), 7.49 (дд, J₁ 9.0, J₂ 2.5, H₁₅, 1H), 8.00 (д, J 7.5, H₆, 1H), 8.36 (д, J 9.0, H₁₄, 1H).

N⁴-[2-(4-Азидотетрафторбензилиденаминооксиметилкарбамоил)этил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (IV). К раствору 26 мг (44 мкмоль) Na₄-соли нуклеотида (VII) в 13 мл 0.5 М триэтанолламин-НСl (рН 8.0) добавляли при перемешивании 30 мг (77 мкмоль) реагента (IX) в 7 мл DMF, а через 1 ч еще 30 мг реагента (IX) в 5 мл DMF. Еще через 1 ч реакционная смесь содержала 95% аналога (IV). Аналог (IV) очищали в той же последовательности, что и аналог (III). Чистота полученного препарата (IV), по данным МКХ, превышала 99%. УФ-спектр: λ_{max} 282 (ε 3.6 × 10⁴). Выход аналога (IV) в виде K₄-соли 27 мг (30 мкмоль, 39%). ¹H-ЯМР (D₂O), δ: 2.25–2.45 (м, H₂', 2H), 3.50–3.80 (м, H₈, H₉, 4H), 4.20–4.35 (м, H₅', H₄', 3H), 4.6–4.7 (м, H₃', 1H), 6.07 (д, J 7.5, H₅, 1H), 6.27 (т, J 6.5, H₁', 1H), 7.84 (д, J 7.5, H₆, 1H), 8.49 (с, H₁₅, 1H).

N⁴-[4-(4-Азидотетрафторбензилиденаминоокси)бутилокси]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (V). К раствору 1.128 г O-(4-аминоксидутил)гидроксиламина дигидробромид в 3 мл H₂O, доведенному 11 М NaOH до рН 4.0, добавляли 250 мг Li₄-соли dCTP (≈0.5 ммоль) и выдерживали 5 ч при 50°C. Конечная реакционная смесь содержала

58% соединения (X). Производное (X) очищали так же, как и аналог (III). Оксим (V) получали медленным добавлением раствора 3 мг/мл альдегида (XI) в метаноле в раствор производного (X) (1600 ОЕ₂₅₀, 215 мкмоль в 100 мл) при pH 4.0 до прекращения изменения УФ-поглощения в области 280–330 нм. Аналог очищали так же, как и аналог (III). Выход K₄-соли (V) 142 мг (150 мкмоль, 30%). УФ-спектр: λ_{\max} 284 нм (ϵ 2.7×10^4). ¹H-ЯМР (D₂O), δ : 1.80–1.90 (м, H10, H11, 4H), 2.30–2.45 (м, H2', 2H), 4.05–4.35 (м, H4', H5', H9, H12, 7H), 4.6–4.7 (м, H3', 1H), 5.80 (д, J 8.0, H5, 1H), 6.29 (т, J 6.5, H1', 1H), 7.18 (д, J 8.0, H6, 1H), 8.17 (с, H15, 1H).

N⁴-[4-(4-Азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонил)бутилкарбамоил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат (VI). 250 мг (0.5 ммоль) Li₄-соли dCTP растворяли в 20 мл раствора, содержащего 1 М дигидразид адипиновой кислоты и 1 М NaHSO₃ (pH 5.0). Через 2 ч pH реакционной смеси доводили 11 М NaOH до 10.0 и оставляли на ночь при 4°C. Трифосфат (XII) очищали в основном так же, как и вещество (III). К раствору соединения (XII) в 30% метаноле медленно добавляли раствор 3 мг/мл альдегида (XI) в метаноле, поддержания pH 4.0 до прекращения изменения УФ-поглощения в районе 300–330 нм. Соединение (VI) очищали так же, как и трифосфат (III). Выход K₄-соли (VI) 120 мг (120 мкмоль, 24%). УФ-спектр: λ_{\max} 303 (ϵ 2.6×10^4). ¹H-ЯМР (D₂O), δ : 1.75–1.85 (м, H11, H12, 4H), 2.40–2.55 (м, H2', H10, H13, 6H), 4.15–4.25 (м, H5', H4', 3H), 4.6–4.7 (м, H3', 1H), 6.25–6.35 (м, H5, H1', 2H), 8.10–8.15 (м, H6, 1H), 8.32 (с, H17, 1H).

Субстратные свойства фотоактивируемых производных dCTP проверяли в реакции синтеза ДНК, катализируемой HIV1-RT, с использованием трех матрично-затраговочных систем: А) матрица – (5')d(CATCCAAATTGTCGTGACTGGGAAAAC), праймер – (5')*pd(GTTTTCCCAGTCACGA); Б) (5')d(GGTAAATTAATAAGTAAGAATGTATAGCCCTACC) и (5')*pd(GGTAGGGGCTATA-CATT); В) poly(rA) и d*рT₁₆.

Праймеры были помечены ³²P по 5'-концу (*р) с помощью T4-полинуклеотидкиназы [26] и очищены электрофорезом в ПААГ [27].

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала следующие стандартные компоненты: 50 мМ трис-HCl (pH 8.0), 10 мМ MgCl₂, 75 мМ KCl, 0.1% Nonidet-P40, 7 мМ β-меркаптоэтанол.

В реакции РНК-зависимого синтеза ДНК смесь дополнительно содержала 1 ОЕ₂₆₀/мл poly(rA), 25 мкМ *рdT₁₆ и 10 мкМ аналог dCTP или 50 мкМ dTTP.

При проведении ДНК-зависимого синтеза ДНК в реакционную смесь помимо стандартных компонентов входила матрица в концентрации 0.6 мкМ, 5'-³²P-меченый праймер (0.2 мкМ) и аналог dCTP в концентрации 10 мкМ.

Реакцию синтеза ДНК запускали добавлением фермента (20 ед. акт.), проводили при 37°C в течение 10–20 мин и останавливали добавлением 5 мкл раствора, содержащего 90% формамид, 50 мМ EDTA, 0.1% бромфеноловый синий. Смесь прогревали 3 мин при 80°C и наносили 10 мкл смеси на гель. Продукты синтеза анализировали электрофорезом в 20% ПААГ, как описано ранее [28], с последующей радиоавтографией.

Работа была поддержана РФФИ (грант № 96-04-50144).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doronin S.V., Dobrikov M.I., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1992. V. 313. P. 31–33.
2. Doronin S.V., Dobrikov M.I., Buckle M., Roux P., Buc H., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1994. V. 354. P. 200–202.
3. Dobrikov M.I., Doronin S.V., Safronov I.V., Shishkin G.V., Lavrik O.I. // Chem. Sustainable Dev. 1994. V. 2–3. P. 529–534.
4. Kapfer I., Jacques P., Toubal H., Goeldner M.P. // Bioconj. Chem. 1995. V. 6. P. 109–114.
5. Poe R., Schnapp K., Young M.J.T., Grayzar J., Platz M.S. // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 5054–5067.
6. Schnapp K.A., Poe R., Leyva E., Soundararajan N., Platz M.S. // Bioconj. Chem. 1993. V. 4. P. 172–177.
7. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Шишкин Г.В. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 191–199.
8. Кочетков Н.К., Будовский Э.И., Свердлов Е.Д., Симукова Е.А., Турчинский М.Ф., Шубаев В.Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970. С. 310–400.
9. Будовский Э.И., Свердлов Е.Д., Шубаев Р.П., Монаярская Г.С., Кочетков Н.К. // Молекулярная биология. 1968. Т. 2. С. 321–329.
10. Петренко В.А., Спирин Г.В. // Молекулярная биология. 1982. Т. 16. С. 644–648.
11. Rodgers D.W., Gamblin S.J., Harris B.A., Ray S., Culp J.S., Hellmig B., Woolf D.J., Debouck C., Harrison S.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 1222–1226.
12. Jacobo-Molina A., Ding J., Nani R.C., Clark A.D., Lu X., Tantillo C., Williams R.L., Cramer G., Ferris A.L., Clarc P., Hizi A., Huges S.H., Arnold E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 6320–6324.
13. Wlassoff W.A., Dobrikov M.I., Safronov I.V., Dudko R.Y., Bogachev V.S., Kandaurova V.V., Shishkin G.V., Dymshits G.M., Lavrik O.I. // Bioconj. Chem. 1995. V. 6. P. 352–360.
14. Hayatsu H. // Biochemistry. 1976. V. 15. P. 2677–2682.

15. Preston B.D., Poiesz B.J., Loeb L.A. // Science. 1988. V. 242. P. 1168–1171.
16. Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A. // Science. 1988. V. 242. P. 1171–1173.
17. Ricchetti M., Buc H. // EMBO J. 1990. V. 9. P. 1583–1593.
18. Bebenek K., Kunkel T. // Reverse Transcriptase / Eds A.M. Skalka, S.P. Goff. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. P. 85–102.
19. Perrino F.W., Preston B.D., Sandell L.L., Loeb L.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 8343–8347.
20. Bauer S., Suresh K.S. // J. Org. Chem. 1963. V. 28. P. 1604–1607.
21. Добриков М.И., Приходько Т.А., Сафронов И.В., Шишкин Г.В. // Сиб. хим. журн. 1992. Вып. 2. С. 18–23.
22. Hansen S., Shultze T., Moeling K.B. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 12393–12396.
23. Калверт Дж., Пумтс Дж. Фотохимия: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. С. 625–627.
24. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
25. Heukeshoven J., Dernick R. // Electrophoresis. 1985. V. 6. P. 102–112.
26. Protocols and Applications Guide Promega. 1991. P. 150–152.
27. Ямщиков В.Ф. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии / Ред. Р.И. Салганик. Новосибирск: Наука, 1990. С. 112–114.
28. Краев А.С. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии / Ред. Р.И. Салганик. Новосибирск: Наука, 1990. С. 145–154.

New Photoreactive N⁴-Substituted dCTP Analogues: Preparation, Photochemical Characteristics, and Substrate Properties in HIV-1 Reverse Transcriptase-Catalyzed DNA Synthesis

I. V. Safronov*, N. V. Shcherbik*, S. N. Khodyreva*, V. A. Vlasov**,
M. I. Dobrikov*, G. V. Shishkin*, and O. I. Lavrik*

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090, Russia

**Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090, Russia

Abstract—Photochemical characteristics and substrate properties of four newly synthesized dCTP analogues: N⁴-[2-(2-nitro-5-azidobenzoylamino)ethyl]-, N⁴-[2-(4-azidotetrafluorobenzylideneaminoxyethyl)carbamoyl]ethyl]-, N⁴-[4-(4-azidotetrafluorobenzylideneaminoxy)butyloxy]-, and N⁴-[4-(4-azidotetrafluorobenzylidenehydrazinocarbonyl)butylcarbamoyl]-, and N⁴-[4-(4-azidotetrafluorobenzylideneaminoxy)butyloxy]-2'-deoxycytidine 5'-triphosphates as well as those of the earlier described N⁴-[2-(4-azidotetrafluorobenzoylamino)ethyl]- and 5-[E-3-(4-azidotetrafluorobenzoylamino)-1-propenyl]-2'-deoxycytidine 5'-triphosphates were compared. When being irradiated with UV light at a wavelength of 303–313 nm, the new analogues demonstrated greater than 10-fold higher photoactivity as compared with the old compounds. The first three new compounds were utilized by HIV-1 reverse transcriptase as dCTP and dTTP, while the last derivative was recognized only as dTTP. Once incorporated into the primer 3'-terminus, none of the analogues synthesized terminated further primer elongation with natural triphosphates.

Key words: dCTP analogues, perfluoroaryl azides, HIV-1 reverse transcriptase