



УДК 547.963.057:577.325

НОВЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ АФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ БИОПОЛИМЕРОВ. ФОТОАФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ Tte-ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ

© 1999 г. Д. М. Колпащиков, А. Л. Захаренко, С. В. Дежуров*, Н. И. Речкунова, С. Н. Ходырева, С. Х. Дегтярев**, В. В. Литвак***, О. И. Лаврик#

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

* Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2;

** Институт молекулярной патологии и экологической биохимии СО РАМН, Новосибирск;

*** ООО "Синтез", Новосибирск

Поступила в редакцию 09.02.98 г. Принята к печати 27.03.98 г.

Осуществлен синтез арилазидов *N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-β-аланина (Ia), *N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)глицина (Iб). Полученные азиды ковалентно присоединены по аминогруппе в 5-(3-аминопропенил-1)-dUTP с образованием 5-{*N*-[*N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропенил]-*транс*-3-аминопропенил-1} дезоксиуридин-5'-трифосфата (IIa) и 5-{*N*-[*N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)аминоацетил]-*транс*-3-аминопропенил-1} дезоксиуридин-5'-трифосфата (IIб). Проведен фотолиз полученных реагентов в водном растворе. Спектральные и фотохимические характеристики азидов (I) и (II) указывают на перспективность их использования для модификации биополимеров. Показано, что соединения (IIa, б) эффективно замещают dTTP в реакции полимеризации ДНК, катализируемой термостабильной ДНК-полимеразой из *Thermus thermophilus* B-35 (Tte-ДНК-полимераза). Проведена фотоаффинная модификация Tte-ДНК-полимеразы аналогами dTTP (IIa, б), а также ранее полученными 5-[*N*-(5-азидо-2-нитробензоил)-*транс*-3-аминопропенил-1] дезоксиуридин-5'-трифосфатом (III) и 5-[*N*-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)-*транс*-3-аминопропенил-1] дезоксиуридин-5'-трифосфатом (IV) с использованием двух вариантов мечения. Показано, что все четыре аналога dTTP модифицируют Tte-ДНК-полимеразу.

Ключевые слова: ароматические азиды; фотоаффинная модификация; фотоактивируемые аналоги dNTP; термофильная ДНК-полимераза.

Многообещающим и широко используемым подходом для изучения деталей механизмов таких клеточных процессов как репликация, репарация, транскрипция является метод аффинной модификации с использованием фотоактивируемых групп, в том числе арилазидов. Эффективность аффинной модификации биополимеров зависит от структуры реагента и условий реакции [1], поэтому поиск новых универсальных реагентов для этой цели – важная задача.

Для фотоаффинной модификации ряда ДНК-полимераз ранее были получены и использованы фотоактивные производные дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, содержащие арилазидогруппы, присоединенные к основанию с помощью различных спейсеров [2–9]. В этих работах показано, что многие аналоги dNTP, содержащие объемные ароматические заместители в азотистом основании, яв-

ляются субстратами для данного класса ферментов. Фотоактивные нуклеотиды вводили в олигонуклеотид с помощью ДНК-полимераз, и затем фотореакционноспособный праймер ковалентно присоединяли к ДНК-полимеразе под воздействием УФ-облучения (классическое мечение). Кроме того, показано, что аналоги dNTP, ковалентно присоединенные к ферменту через основание, являлись субстратами в реакции элонгации праймера в присутствии матрицы (каталитически компетентное мечение).

Задача данной работы – синтез новых арилазидов *N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-β-аланина (Ia), *N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)глицина (Iб), а также фотоактивных аналогов dTTP (IIa, б), содержащих эти арилазиды, исследование субстратных свойств аналогов dTTP в реакции синтеза ДНК, катализируемой термофильной ДНК-полимеразой, а также фотоаффинное мечение этого фермента. Представляло интерес изучить возможность увеличения эффективности мечения белка с использованием нового ряда производных dNTP в области, удаленной от

Сокращения: ТЕА – триэтиламин; Tte-ДНК-полимераза – ДНК-полимераза из экстремально термофильной бактерии *Thermus thermophilus* B-35.

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

целенаправленно изменять реакционную способность азида и его спектральные характеристики.

При синтезе фотореагентов (IIa, б) из производных аминокислот (Ia, б) сначала получали их *N*-оксисукцинимидные эфиры и далее ацилировали ими триэтиламмониевую соль 5-(*транс*-3-аминопропенил-1)дезоксисуридин-5'-трифосфата (VII) по аминогруппе. Структура трифосфатов (IIa, б) подтверждена данными ^1H -, ^{31}P -, ^{19}F -ЯМР и УФ-спектроскопий, данными ТСХ и микроколоночной анионообменной хроматографии.

При облучении фотореагентов (Ia), (IIa) в диапазоне 334–365 нм сохраняются изобестические точки в их УФ-спектрах при 224, 264 и 320 нм для соединения (Ia) и 220, 214, 308 и 333 нм для соединения (IIa) (рис. 1), что свидетельствует о протекании только одного фотохимического процесса по схеме $\text{A} \rightarrow \text{B}$. Аналогичные данные (не представлены) были получены для соединений (Iб) и (IIб). На основании этого мы считаем правомерным использовать данные по изменению УФ-спектров для оценки относительной фотоактивности вновь синтезированных фотореагентов (Ia, б), (IIa, б). Нами была оценена фотоактивность данных соединений при облучении УФ-светом ртутной лампы в диапазоне длин волн: 334–365 нм и >280 нм. В качестве параметра их относительной фотоактивности использовано время полуфотоллиза ($\tau_{1/2}$), т.е. время, за которое концентрация исходного азида уменьшается в 2 раза. В табл. 1 сопоставлены результаты облучения фотореагентов (Ia,б), (IIa,б) с данными для азидов (VI) и полученных ранее трифосфатов (III) [2] и (IV) [3], несущих остатки арилазидов – 5-азидо-2-нитробензойной кислоты и 4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензойной кислоты. Сопоставление значений λ_{max} для азидов (Ia,б) и (VI) показывает, что введение электронодонорной карбоксиалкиламиногруппы в положение б пиридинового цикла приводит к увеличению поглощения в длинноволновой области спектра (λ 320 нм для реагента (Ia) и 318 нм для реагента (Iб)), тогда как у соединения (VI) максимум поглощения находится в области 254 нм. Поэтому фотоактивность веществ (Ia, б) возрастает, особенно при облучении в диапазоне длин волн 334–365 нм, как видно из сравнения времен полуфотоллиза. Фотоактивность реагентов (IIa, б) не уступает фотоактивности реагента (III) и примерно в 300 и 3.5 раза превышает фотоактивность соединения (IV) при облучении в диапазоне длин волн 334–365 нм и >280 нм соответственно.

В качестве объекта для изучения субстратных свойств фотоактивных аналогов dTTP и их способности модифицировать фермент была выбрана ДНК-полимераза из экстремально термофильной бактерии *Thermus thermophilus*. Tte-ДНК-полимераза – привлекательный объект, поскольку она представляет собой достаточно просто организованный односубъединичный фермент, который функционирует при высоких температурах, значи-

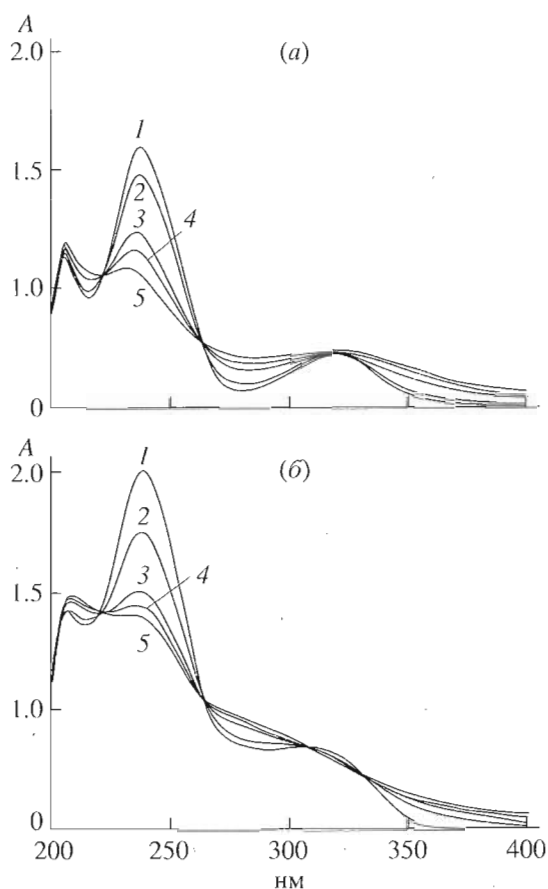


Рис. 1. Фотоллиз фотореагентов (Ia) – (a) и (IIa) – (б) в 0.05 М Трис-НСl, pH 7.5 в диапазоне 334–365 нм, показаны спектры поглощения в зависимости от времени облучения (с): 0 (1), 20 (2), 60 (3), 80 (4), 120 (5).

тельно уменьшающих неспецифические взаимодействия. Кроме того, возможно практическое использование термофильной ДНК-полимеразы и фотоактивируемых аналогов dNTP как для амплификации ДНК с включением фотоактивных остатков dNMP [3], так и для комплементарно адресованной модификации ДНК со сложной третичной структурой, с помощью реакционноспособного праймера, синтезированного *in situ* [7].

Для аналогов dTTP (IIa, б), (III), (IV) были проверены субстратные и терминирующие свойства в реакции матричного синтеза ДНК, катализируемого Tte-ДНК-полимеразой с использованием 36- и 16-звенного олигонуклеотида (см. эксперимент. часть) в качестве матрицы и праймера соответственно. Согласно последовательности матрицы первым должен встраиваться dTMP, а затем dCMP и далее два dTMP.

Для аналогов dTTP и каталитических количеств фермента (20 нМ) (рис. 2, дор. 12–21) основным продуктом удлинения праймера является 18-звенный олигонуклеотид (дор. 12, 14, 16, 18), что свидетельствует о проявлении субстратных свойств всеми исследуемыми аналогами; и после

Таблица I. Спектральные характеристики и времена полуфотоллиза для азидов (Ia, б), (IIa, б), (III), (IV), (VI)

Соединение	λ_{\max} , нм	ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	λ_{\min} , нм	ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\tau_{1/2}$, с, при фотоллизе светом	
					334–365 нм	>280 нм
(Ia)	238	19600	280	1450	30	17
	320	4000				
(Iб)	237	18500	279	1200	28	18
	318	3800				
(IIa)	238	38700	291	8400	34	14
	310	8900				
(IIб)	236	32900	273	6700	32	16
	300	9600				
(III)	235	16300	265	9400	26	14
	302	13800				
(IV)	255	32600	218	17000	9000	53
(VI)	254	6400	225	1200	>10000	110

включения одного ошибочного нуклеотида синтез ДНК значительно замедляется. В присутствии фермента в эквимольных праймеру и матрице количествах (500 нМ) (дор. 1–10) для всех аналогов наблюдается многократное ошибочное включение (дор. 1, 3, 5, 7), такое же как и для dTTP (дор. 9). В работе [18] показано, что при сильном преобладании или недостатке в реакционной смеси одного из дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов по сравнению с другими ДНК-полимеразы могут вести синтез продукта, некомплементарного матрице. В присутствии каталитических количеств Tte-

ДНК-полимеразы, аналога dTTP и трех природных dNTP (dCTP, dGTP, dATP) для всех аналогов образуется продукт удлинения праймера и более высокомолекулярные продукты (дор. 13, 15, 17, 19), тогда как в присутствии dTTP основным продуктом является 36-звенный олигонуклеотид (дор. 21). Эти данные свидетельствуют о том, что при каталитических количествах фермента для всех аналогов наблюдается заметное снижение скорости матрично-зависимого синтеза ДНК. В противоположность этому, при больших концентрациях фермента для всех аналогов, так же как и для

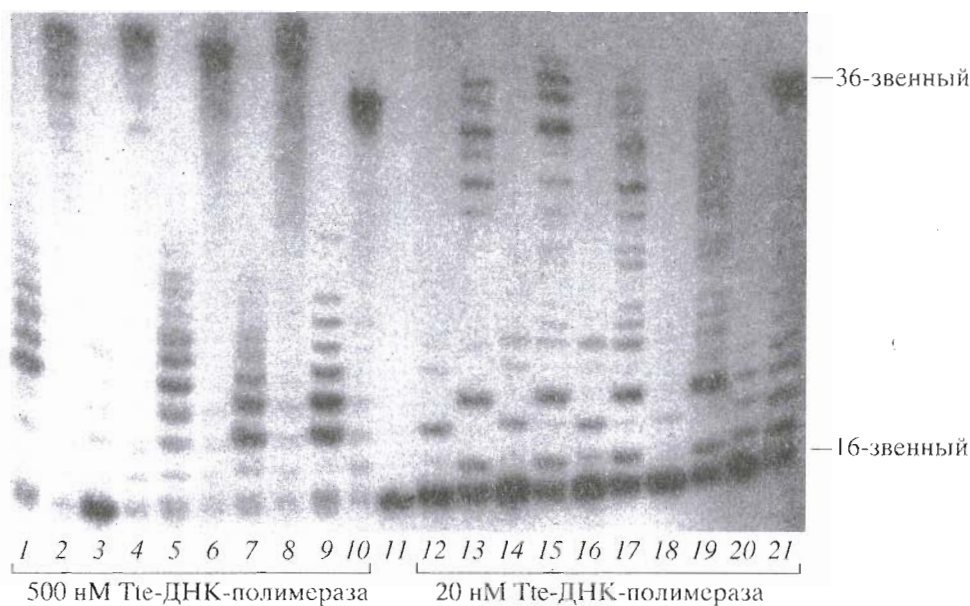


Рис. 2. Проверка субстратных свойств аналогов dTTP в реакции синтеза ДНК, катализируемой Tte-ДНК-полимеразой. Реакционные смеси содержали стандартные компоненты, указанные в разделе "Эксперимент. часть" и Tte-ДНК-полимеразу 500 нМ (дор. 1–10) и 20 нМ (дор. 12–21), dATP, dCTP и dGTP в концентрациях по 10 мкМ (там, где они присутствуют), аналоги dTTP 10 мкМ. Представлены результаты электрофоретического разделения реакционных смесей, содержащих аналоги: (IIб) – дорожки 1, 2, 12, 13, (IIa) – 3, 4, 14, 15, (III) – 5, 6, 16, 17, (IV) – 7, 8, 18, 19; dTTP – 9, 20, 4dNTP – 10, 21, 5'-³²P-меченый праймер – 11. Дорожки 2, 13, 4, 15, 6, 17, 8, 19 соответствуют экспериментам в присутствии 3dNTP.

dTTP, основным продуктом удлинения праймера является полноразмерная копия матрицы (дор. 2, 4, 6, 8, 10), т.е. при больших концентрациях фермента терминирующие свойства аналогов не проявляются. Существенной разницы между субстратными свойствами аналогов (IIa,б), (III) и (IV) не наблюдается.

Далее нами была проведена фотоаффинная модификация Tte-ДНК-полимеразы с использованием двух вариантов мечения. В классическом варианте остатки аналогов dTMP с помощью ДНК-полимеразы вводились в радиоактивно меченный праймер, а затем фотореакционноспособный праймер ковалентно присоединялся к ферменту при облучении УФ-светом. В случае каталитически компетентного мечения фотоактивные аналоги dTTP, ковалентно присоединенные к ДНК-полимеразе с помощью облучения УФ-светом, элонгировали радиоактивно меченный праймер в присутствии матрицы.

На рис. 3 и 4 представлены радиоавтографы гелей после электрофоретического разделения продуктов фотоаффинной модификации Tte-ДНК-полимеразы в классическом и каталитически компетентном варианте с использованием фотореагентов (IIa, б) и (III) в диапазоне длин волн 334–365 нм (рис. 3) и с использованием соединений (IIa, б), (III) и (IV) при длине волны >280 нм (рис. 4). Реагент (IV) не применяли для фотоаффинной модификации в диапазоне длин волн 334–365 нм из-за большого времени полужизни. Из данных рис. 3 и 4 следует, что с использованием всех аналогов происходит модификация фермента как в случае классического, так и в случае каталитически компетентного мечения. Причем модификация Tte-ДНК-полимеразы приводит к уменьшению подвижности фермента, в соответствии с изменением молекулярной массы продукта на 5–10 кДа, в результате ковалентного присоединения праймера и образования нескольких продуктов модификации. Дополнительные продукты наблюдались также и ранее при модификации обратной транскриптазы ВИЧ-1 N⁴-[2-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторобензоиламино)этил]дезоксцитидин-5'-трифосфатом (FABdCTP) и 5-[N-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторобензоил)-транс-3-аминопропенил-1]дезоксцитидин-5'-трифосфатом (AFABdCTP) [7], соединением (III) [9] и комплекса ДНК-полимеразы α с праймазой с помощью FABdCTP [6]. Следует отметить, что электрофоретическая подвижность белков одинаковой массы может существенно меняться в зависимости от химического состава, в том числе мутации или модификации единственной аминокислоты [19], поэтому мы предполагаем, что продукты модификации Tte-ДНК-полимеразы по разным аминокислотам могут иметь различную электрофоретическую подвижность.

Как видно из табл. 2, в диапазоне длин волн 334–365 нм для соединений (IIa,б) уровень классического мечения в 2,5, а каталитически компетент-

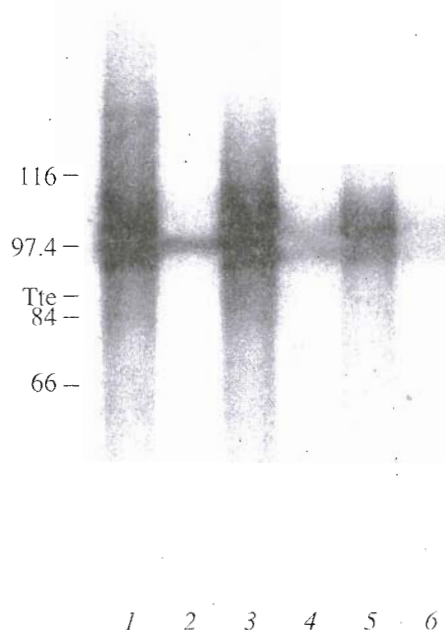


Рис. 3. Фотоаффинная модификация Tte-ДНК-полимеразы аналогами dTTP. Реакционные смеси (20 мкл) помимо стандартных компонентов содержали: Tte-ДНК-полимеразу, 5'-меченый [³²P] праймер-матрицу (500 нМ), а также соединения (IIa), (IIб) и (III) (10 мкМ). Представлены результаты электрофоретического разделения продуктов фотомодификации Tte-ДНК-полимеразы при облучении в 334–365 нм: нечетные дорожки – классическое мечение, четные – каталитически компетентное (см “Эксперимент. часть”) с использованием следующих аналогов: (IIб) (1, 2); (IIa) (3, 4); (III) (5, 6). Время облучения каждой из реакционных смесей указано в “Эксперимент. части”. Слева обозначены положения маркеров белковой массы (кДа) и Tte-ДНК-полимеразы (обозначено Tte).

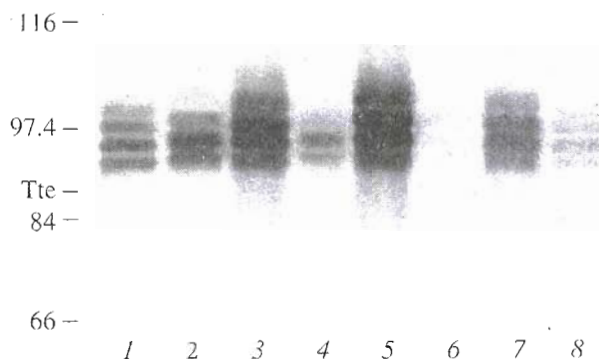


Рис. 4. Фотоаффинная модификация Tte-ДНК-полимеразы аналогами dTTP. Реакционные смеси (20 мкл) помимо стандартных компонентов содержали: Tte-ДНК-полимеразу, 5'-[³²P] праймер-матрицу (500 нМ), а также соединения (IIa), (IIб), (III) и (IV) (по 10 мкМ). Представлены результаты электрофоретического разделения продуктов фотомодификации Tte-ДНК-полимеразы: нечетные дорожки – классическое мечение, четные – каталитически компетентное при облучении >280 нм с использованием следующих аналогов: (IIб) (1, 2); (IIa) (3, 4); (IV) (5, 6); (III) (7, 8). Время облучения каждой из реакционных смесей указано в “Эксперимент. части”. Слева обозначены положения маркеров белковой массы и Tte-ДНК-полимеразы (Tte).

Таблица 2. Относительные интенсивности мечения Tte-ДНК-полимеразы фотоактивируемыми аналогами ТТР*

Аналог	(Ia)		(Iб)		(III)		(IV)	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
(334–365 нм)	8.6	1.7	9.3	1.7	3.9	1.0	–	–
(>280 нм)	2.9	1.2	2.0	1.5	1.2	1.0	2.5	1.0

* Приведены средние значения из двух независимых экспериментов, полученные с использованием классического (А) и каталитически компетентного (Б) вариантов мечения.

ного в 1.7 раза выше, чем для фотореагента (III). Примерно те же соотношения интенсивностей наблюдаются при облучении УФ-светом >280 нм. Новые реагенты не уступают по интенсивности мечения соединению (IV) как в классическом, так и в каталитически компетентном варианте мечения (табл. 2).

Таким образом, азиды (Ia) и (Iб) являются перспективными фотореагентами для модификации биополимеров вследствие простоты их получения, высокой реакционной способности при облучении УФ-светом в диапазоне длин волн 334–365 нм, а также возможности легкого введения по аминогруппам биологических молекул. Полученные на их основе аналоги dNTP – эффективные субстраты реакции полимеризации ДНК, катализируемой Tte-ДНК-полимеразой, и эффективные реагенты для фотоаффинной модификации ДНК-полимераз. Поскольку фотоактивируемые аналоги dNTP предназначены для исследования структурно-функциональной топографии ферментов, то в дальнейшем представляет интерес создание ряда производных перфторазидопиридина с различными длинами линкеров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантную ДНК-полимеразу *Th. thermophilus* B-35 получали с помощью штамма *Escherichia coli*, содержащего соответствующий ген. В работе использованы следующие реагенты: нерадиоактивные dNTP (Сибэнзим), [γ - 32 P]АТР (Биосан), маркеры молекулярной массы Sigmamarker High Range (Sigma), олигонуклеотиды: 36-звенная матрица (5') GGT TAA ATA AAA TAG TAA GAA TGT ATA GCC CCT ACC, 16-звенный праймер (5') GGT AGG GGC TAT ACA T синтезированы в Новосибирском институте биоорганической химии, T₄-полинуклеотидкиназа (Сибэнзим), N-гидрокси-сукцинимид (Fluka, Швейцария), глицин, β -аланин (Reanal, Венгрия), 2,4,5,6-тетрафтор-3-хлорпиридин (V), азид натрия, DCC (Merck, Германия), DMF, TEA, ацетонитрил очищены согласно методикам [20], 4-азидо-2,5,6-трифтор-3-хлорпиридин (VI) получен согласно [10], 5-(транс-3-аминопропенил-1)дезоксуридин-5'-трифосфат (триэтиламмониевая соль) (VII) получен согласно [21]. Остальные реагенты были марки х. ч.

ТСХ на пластинках Kieselgel (Merck, Германия) проводили в системах растворителей хлоро-

форм-уксусная кислота 10 : 1 (А), диоксан-вода – 25% водный аммиак 6 : 4 : 1 (Б). Визуализацию соединений, поглощающих в УФ-свете, осуществляли облучением пластин УФ-светом (254 нм), и азиды детектировали по окрашенным пятнам; соединения, содержащие аминогруппу, обнаруживали реакцией с нингидрином (2% раствор в метаноле, содержащий 1% уксусной кислоты).

ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Waters (США) на колонках размером 4.6 × 250 мм на смоле с обращенной фазой LiChrosorb-RP18 (Merck) в градиенте концентрации (0 → 30%) ацетонитрила в 0.05 М ТЕАВ, рН 7.5 за 60 мин при скорости элюции 2 мл/мин.

Аналитическую микроколоночную хроматографию проводили на хроматографе Милихром (Россия) с использованием анионообменной фазы Полисил-СА 15 мкм (Вектор, Россия) на колонке 2.5 × 30 мм в линейном градиенте концентрации NaCl (0 → 1 М) в 0.05 М Трис-НСl, рН 7.5 со скоростью 100 мкл/мин (детекция на 260 и 360 нм).

Спектры ^1H -, ^{31}P -, ^{19}F -ЯМР регистрировали на спектрометре WP-200 (Bruker, Германия) при температуре 20°C с использованием в качестве внешнего стандарта тетраметилсилана, 85% фосфорной кислоты и гексафторбензола, соответственно; КССВ приведены в Гц.

УФ-спектры всех фотореагентов регистрировали в 0.05 М Трис-НСl, рН 7.5 с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-2100 (Япония) в кюветках толщиной 1 см. Данные приведены в табл. 1.

N-(4-Азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)- β -аланин (Ia). К раствору азида (VI) (0.713 г, 3.52 ммоль) в 2 мл ацетонитрила добавляли 0.313 г (3.52 ммоль) β -аланина и 0.971 г (7.04 ммоль) карбоната калия. Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 24 ч. За ходом реакции следили по ТСХ в системе А. После окончания реакции ацетонитрил упаривали, к остатку добавляли 30 мл воды и доводили рН до 2 добавлением 3 мл 10 М НСl. Целевое соединение (Ia) экстрагировали хлороформом (3 × 15 мл). Объединенные фракции упаривали. Остаток перекристаллизовывали из СНCl₃. Выход: 0.83 г (87%). Соединение индивидуально по данным ТСХ, R_f 0.64 (А). т. пл. 110–115°C. ЯМР-спектры (DMSO-d₆), ^{19}F (δ , м.д.): 5.24 (д, 1F, F5, J_{F2} 26), 88.70 (д, 1F, F2, J_{F5} 26), ^1H (δ , м.д.): 2.50 (т, 2H, H9, J_{H8} 9), 3.58 (кажущийся к, 2H, H8, J_{H9} 9, J_{H7} 4.5), 6.18 (т, 1H, H7, J_{H8} 4.5), 6.22

(уш.с., 1H, N10). Найдено, %: С 34.7, Н 2.17, Cl 13.0, F 13.6, N 25.2. $C_8H_6ClF_2N_5O_2$. Рассчитано, %: С 34.6, Н 2.16, Cl 12.8, F 13.7, N 25.2.

N-(4-Азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-глицин (Iб) получали аналогично азиду (Iа). Выход 30% (не оптимизирован). Соединение индивидуально по данным ТСХ, R_f 0.57 (А). т. пл. 110–117°C. ЯМР-спектры (CCl_4), ^{19}F (δ , м.д.): 10.19 (д, 1F, F5, J_{F_2} 25), 88.17 (д, 1F, F2, J_{F_5} 25), 1H (δ , м.д.): 2.94 (д, 2H, H8, J_{H7} 3.5), 5.29 (т, 1H, H7, J_{H8} 3.5), 6.03 (уш.с., 1H, H9). Найдено, %: С 31.8, Н 1.55, Cl 13.7, F 14.8, N 26.3. $C_8H_6ClF_2N_5O_2$. Рассчитано, %: С 32.1, Н 1.53, Cl 13.6, F 14.6, N 26.7.

5-{N-[N-(4-Азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил]-транс-3-аминопропенил-1}дезоксинуридин-5'-трифосфат (IIа). К 8 мг (30 мкмоль) (Iа) в 50 мкл DMF добавляли 3.45 мг (30 мкмоль) N-гидроксисукцинимид и 6.18 мг (30 мкмоль) DCC. После окончания реакции (2 ч при 20°C) раствор N-оксисукцинимидного эфира азиды (Iа) отделяли от дициклогексилмочевины центрифугированием и добавляли к 80 ОЕ₂₉₀ (10 мкмоль) триэтиламмониевой соли трифосфата (VII) в 200 мкл DMF. К реакционной смеси добавляли 8 мкл (57 мкмоль) триэтиламина. За ходом реакции следили по ТСХ (система Б). После окончания реакции (1 ч при 37°C) к реакционной смеси добавляли 1 мл 2% $LiClO_4$ в ацетоне, осадок отделяли центрифугированием, промывали ацетоном. Соединение (IIа) выделяли ВЭЖХ (время удерживания 37 мин), элюент упаривали в вакууме, растворяли в 100 мкл воды, соединение (IIа) переосаждали 2% $LiClO_4$ в ацетоне, промывали ацетоном и эфиром, сушили в вакууме при 20°C. Выход 5.7 мг (70.6%). Продукт индивидуален по данным анионообменной хроматографии и ТСХ, R_f 0.37 (Б). ЯМР-спектры (2H_2O), ^{31}P (δ , м.д.): -5.55 (д, 1P, P_γ , $J_{P\beta}$ 20), -9.67 (д, 1P, P_α , $J_{P\beta}$ 20), -20.14 (т, 1P, P_β , $J_{P\alpha, P_\gamma}$ 20), 1H (δ , м.д.): 2.45 (т, 2H, H2', $J_{H1', H3'}$ 5.5), 2.55 (м, 2H, H10), 3.82 (м, 2H, H11), 4.00 (м, 2H, H9), 4.35 (м, 4H, H5', H4', H3'), 6.20–6.45 (м, 3H, H1', H7, H8), 7.86 (с, 1H, H6), ^{19}F (δ , м.д.): 8.93 (д, 1F, F5, J_{F2} 23), 87.73 (д, 1F, F2, J_{F5} 23).

5-{N-[N-(4-Азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)аминоацетил]-транс-3-аминопропенил-1}дезоксинуридин-5'-трифосфат (IIб) был получен из азиды (Iб) аналогично (IIа). Выход 4.6 мг (58.7%). Продукт индивидуален по данным анионообменной хроматографии и ТСХ, R_f 0.35 (Б). ЯМР-спектры (2H_2O), ^{31}P (δ , м.д.): -9.37 (д, 1P, P_γ , $J_{P\beta}$ 20), -12.59 (д, 1P, P_α , $J_{P\beta}$ 20), -23.40 (т, 1P, P_β , $J_{P\alpha, P_\gamma}$ 20), 1H (δ , м.д.): 2.45 (т, 2H, H2', $J_{H1', H3'}$ 5.5), 3.95 (м, 2H, H10), 4.10 (м, 2H, H9), 4.25 (м, 4H, H5', H4', H3'), 6.25–6.46 (м, 3H, H1', H7, H8), 7.86 (с, 1H, H6), ^{19}F (δ , м.д.): 7.59 (д, 1F, F5, J_{F2} 23), 85.88 (д, 1F, F2, J_{F5} 23).

Фотолиз азидов проводили в 0.05 М водном Трис-НСl, pH 7.5, концентрация всех фотореагентов при облучении была 0.1–0.5 М. Для УФ-облу-

чения использовали свет ртутной лампы высокого давления ДРК-120: осветитель ВИО-1 (ЛОМО, Санкт-Петербург), расстояние 110 мм: в области 334–365 нм через светофильтр УФС-6 с интенсивностью падающего света $I = 8 \times 10^{14}$ квант $с^{-1} см^{-2}$, а также в области >280 нм через светофильтр WG-280 $I = 1.2 \times 10^{15}$ квант $с^{-1} см^{-2}$. Время фотолиза ($\tau_{1/2}$) оценивали по изменению оптического поглощения при λ_{max} в зависимости от времени облучения. Интенсивность излучения лампы на разных длинах волн оценивали с помощью ферриоксалатного актинометра [22], для WG-280 с использованием дополнительно светофильтра УФС-1 для удаления излучения лампы в видимой части спектра.

^{32}P -метку по 5'-концу олигонуклеотида вводили по методике, описанной в [23]; меченые олигонуклеотиды очищали с помощью электрофореза согласно [24].

Проверка субстратных свойств аналогов (IIа, б), (III), (IV). Реакцию синтеза ДНК проводили в течение 30 мин при 70°C. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 10 мкМ dNTP или их аналоги (IIа, б), (III), (IV), 500 нМ $[\gamma\text{-}^{32}P]$ праймер-матрицу и 500 нМ или 20 нМ Tte-ДНК-полимеразу, а также следующие стандартные компоненты: 50 мМ Трис-НСl, pH 8.8 (25°C), 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ NaCl. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях.

Классическое мечение Tte-ДНК-полимеразы аналогами dTTP. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала стандартные компоненты, перечисленные выше и 500 нМ Tte-ДНК-полимеразу. Реакционную смесь инкубировали 30 мин при 70°C, затем облучали 90 или 45 с для соединений (IIа), (IIб), (III) в диапазоне длин волн 334–365 нм и >280 нм или 150 с для соединения (IV) при длине волн >280 нм.

Каталитически компетентное мечение. Реакционную смесь инкубировали 30 мин при 70°C и облучали как описано выше, добавляли 500 нМ ^{32}P праймер-матрицу и дополнительно инкубировали 30 мин при 70°C.

Продукты модификации анализировали электрофорезом по Леммли [25] с последующей радиоавтографией. Количественную обработку радиоавтографов гелей проводили с помощью программ Gel-Pro Analyzer 3.0 (1993-97), со сканированных изображений (600 точек/дюйм), полученных с использованием сканера ScanJet 3p (Hewlett Packard, Япония).

Мы благодарим М.И. Добрикова за помощь в обсуждении результатов и В.В. Кандаурову (НИОХ СО РАН) за регистрацию ЯМР-спектров. Работа была поддержана грантом РФФИ (№ 98-04-49661) и грантом ИНТАС (№ 96-1778).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грещан Н.Г., Притчина Е.А. // Успехи химии. 1992. Т. 61. С. 910–939.
2. 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. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 352–360.
3. Godovikova T.S., Kolpashchikov D.M., Orlova T.N., Richter V.A. // FASEB J. 1997. V. 11. P. 1367.
4. 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.
5. Сафронов И.В., Щербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Шишкин Г.В., Лаврик О.И. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 576–585.
6. Doronin S.V., Dobrikov M.I., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1992. V. 313. P. 31–33.
7. Doronin S.V., Dobrikov M.I., Buckle M., Roux P., Buc H., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1994. V. 354. P. 200–202.
8. Lavrik O.I., Prasad R., Beard W.A., Safronov I.V., Dobrikov M.I., Srivastava D.K., Shishkin G.V., Wood T.G., Wilson S.H. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 21891–21897.
9. Щербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Дымищ Г.М., Лаврик О.И. // Молекул. биология. 1997. Т. 31. С. 344–352.
10. Soundararajan N., Platz M.S. // J. Org. Chem. 1990. V. 55. P. 2034–2044.
11. Schapp K.A., Poe R., Leyva E., Soundararajan N., Platz M.S. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 172–177.
12. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Шишкин Г.В. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 191–199.
13. McClelland R.A., Kahley H.S., Davidse P.A., Hadzrialic A. // J. Am. Chem. Soc. 1996. V. 118. P. 4794–4803.
14. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Левина А.С., Халимская Л.М., Шишкин Г.В. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 200–207.
15. Levina A.S., Tabatadze D.R., Dobrikov M.I., Shishkin G.V., Khalimskaya L.M., Zarytova V.F. // Nuc. Acid Drug Dev. 1996. V. 6. P. 119–126.
16. Kobrina L.S. // J. Fluor. Chem. 1974. V. 7. P. 1–114.
17. Banks R.E., Sparkes G.R. // J. Chem. Soc. 1972. V. 22. P. 2964.
18. Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H., Brow M.A.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 9436–9440.
19. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. С. 58.
20. Гордон А., Форд Р. Спутник химика: Пер. с англ. М.: Мир, 1976. С. 437–444.
21. Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 6633–6637.
22. Калвет Дж., Пумис Дж. Фотохимия: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. С. 625–627.
23. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor, 1982. P. 125.
24. Ямицкий В.Ф. // Методы молекулярной генетики и геномной инженерии / Ред. Салганик Р.И. М.: Наука, 1990. С. 112–114.
25. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

New Reagents for Directed Modification of Biopolymers: Photoaffinity Modification of Tte DNA Polymerase

D. M. Kolpashchikov*, A. L. Zakharenko*, S. V. Dezhurov**, N. I. Rechkunova*,
S. N. Khodyreva*, S. Kh. Degtyarev***, V. V. Litvak****, and O. I. Lavrik**

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

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

***Institute of Molecular Pathology and Ecological Biochemistry,
Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

****Sintez, Novosibirsk, Russia

Arylazides *N*-(4-azido-2,5-difluoro-3-chloropyridinyl-6)- β -alanine (Ia) and *N*-(4-azido-2,5-difluoro-3-chloropyridinyl-6)-glycine (Ib) were synthesized and covalently attached to 5-(3-aminopropenyl-1)-dUTP through the amino group to give 5'-triphosphate (IIa) and 5'-triphosphate (IIb). The resulting azides were subjected to photolysis in aqueous solution. The spectral and photochemical characteristics of azides (I) and (II) imply that their use for the modification of biopolymers holds promise. Compounds (IIa, b) effectively substituted dTTP in DNA polymerization catalyzed by thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* B-35 (Tte DNA polymerase). Photoaffinity modification of Tte DNA polymerase was carried out by dTTP analogues (IIa, b) and by earlier obtained 5-[*N*-(5-azido-2-nitrobenzoyl)-*trans*-3-aminopropenyl-1]deoxyuridine 5'-triphosphate (III) and 5-[*N*-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoyl)-*trans*-3-aminopropenyl-1]deoxyuridine 5'-triphosphate (IV) using two variants of labeling. All four dTTP analogues were shown to modify Tte DNA polymerase.

Key words: aromatic azides, photoaffinity modification, photoreactive dNTP analogues, thermophilic DNA polymerase

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (383-2) 356296; fax: +7 (383-2) 351665;
e-mail: lavrik@modul.bioch.nsk.su.