



УДК 547.963.057:577.34

ФОТОРЕАКЦИОННОСПОСОБНЫЙ АНАЛОГ 2',3'-ДИДЕЗОКСИУРИДИН-5'-ТРИФОСФАТА: ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ФОТОАФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ ФАКТОРА РЕПЛИКАЦИИ А ЧЕЛОВЕКА

© 2000 г. Д. М. Колпашиков, Л. А. Александрова*, Н. Ф. Закирова*,
С. Н. Ходырева, О. И. Лаврик#

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

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Поступила в редакцию 23.02.99 г. Принята к печати 21.07.99 г.

Осуществлен синтез нового реагента для фотоаффинной модификации биополимеров 5-[*транс-N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-3-аминопропенил-1]-2',3'-дидезоксиуридин-5'-трифосфата (NAV-ddUTP). Показано, что данный аналог, как и ранее описанное аналогичное производное 2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата (NAV-dUTP), эффективно замещает dTTP в синтезе ДНК, катализируемом эукариотической ДНК-полимеразой β . При этом в присутствии NAV-ddUTP синтез ДНК терминируется. 5'-³²P-Меченый праймер, содержащий фотореакционноспособную группу на 3'-конце, полученный с использованием NAV-ddUTP, был применен для фотоаффинного мечения репликативного белка А человека (RPA). Показано ковалентное присоединение р32- и р70-субъединиц RPA к меченым праймерам. NAV-ddUTP – перспективный инструмент для исследования взаимодействия белков репликативного комплекса с НК в клеточных экстрактах и живых клетках в условиях терминации синтеза ДНК.

Ключевые слова: фотоаффинная модификация; фотоактивируемые аналоги dNTP и ddNTP; эукариотическая ДНК-полимераза β ; репликативный белок А человека.

ВВЕДЕНИЕ

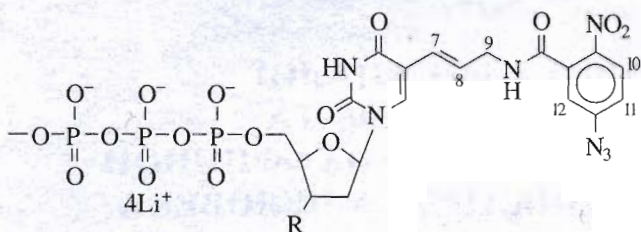
Ранее нами были получены аналоги dCTP и dUTP, несущие фотореакционноспособные арил-азидогруппы, присоединенные по экзоциклической аминогруппе цитозина и по 5-му положению урацила соответственно [1–5]. Данные аналоги оказались эффективными субстратами исследованных ДНК-полимераз и имели каталитические характеристики, близкие к природным dNTP, что было использовано для получения фотореакционноспособных праймеров *in situ* с целью их последующего применения для аффинной модификации ДНК-полимераз [3–11], ДНК-матриц в комплексе с ДНК-полимеразами [10], а также факторов репликации [9]. Разработанный подход “мечение *in vitro*” был использован для идентификации компонентов репликативного комплекса в ядерном экстракте миксомицета *Physarum*

polycephalum [11]. Фотохимические характеристики аналогов позволяют проводить УФ-облучение в области, где не происходит фотоинактивации белков и нуклеиновых кислот (>300 нм) [1, 3]. В то же время естественная способность многих ДНК-полимераз к ошибочному введению в ДНК остатков нуклеотидов не позволяла для некоторых ДНК-полимераз найти условия строгой терминации роста цепи при использовании праймера с фотореакционноспособной группой, введенной в 3'-конец [3, 10]. Определение этих условий является совершенно необходимым для того, чтобы избежать ошибочного включения фотореакционноспособной группы в продукты синтеза ДНК, а затем и в продукты модификации белков, взаимодействующих с ДНК. Таким образом, введение фотореакционноспособного остатка в определенную позицию новосинтезированной ДНК имеет большое значение для изучения как репликативных систем *in vitro*, так и на уровне клеточных органелл. С этой целью можно использовать аналоги дидезоксинуклеотидов. Так, аналог ddUTP, содержащий в качестве фотореакционноспособной группы 4-(3-трифторметил-3Н-диазиридин)стирильный остаток, был применен ранее для аффинной

Сокращения: RPA – репликативный белок А человека; NAV-dUTP и NAV-ddUTP – 5-[*транс-N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-3-аминопропенил-1]-производное 2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата (литиевая соль) и 2',3'-дидезоксиуридин-5'-трифосфата (литиевая соль).

Автор для переписки (тел.: (383-2) 34-42-96; факс: (383-2) 33-36-77; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru).

модификации обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека [12].



R = H: NAB-ddUTP
R = OH: NAB-dUTP

В настоящей работе синтезирован аналог ddUTP, содержащий фотореакционноспособную 2-нитро-5-азидобензоильную группу, введенную по 5-му положению уридина через аминопропильный линкер (NAB-ddUTP). Исследована его субстратная активность в реакции синтеза ДНК, катализируемой эукариотической ДНК-полимеразой β (далее полимеразы β). Проведена фото-

аффинная модификация RPA ДНК-дуплексом, содержащим на 3'-конце фотореакционноспособный остаток терминирующего нуклеотида.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аналог NAB-ddUTP был получен согласно методике, описанной ранее для синтеза NAB-dUTP [1]. Структура соединения подтверждена данными УФ-, ^1H - и ^{31}P -ЯМР-спектроскопии. Субстратная активность NAB-ddUTP в реакции элонгации $5'$ - ^{32}P -меченого 16-звенного праймера, катализируемой полимеразой β , исследована в присутствии 36-звенного олигонуклеотида-матрицы. Показано, что NAB-ddUTP является примерно в 20–25 раз более плохим субстратом для полимеразы β , чем NAB-dUTP и dTTP (V_{\max}/K_m 1.3×10^{-5} , 2.8×10^{-4} , $3.3 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ соответственно). Из картины анализа продуктов удлинения праймера в присутствии NAB-ddUTP (рис. 1, 2, 3, 4), NAB-dUTP (5, 6, 7) и dTTP (8, 9, 10) видно, что в присутствии как dTTP (8), так и аналогов (2, 5) формируется только один продукт удлинения праймера. При добавлении в реакцию смесь dATP, комплементарного следующему основанию матрицы, в случае NAB-ddUTP не наблюдается дополнительных продуктов удлинения праймера (3), тогда как в присутствии NAB-dUTP и dTTP образуется праймер, удлиненный на два нуклеотида (6, 9). Аналогичная картина получена при добавлении в реакцию смесь трех недостающих природных нуклеотидов (4, 7, 10). Таким образом, NAB-ddUTP действительно является терминирующим субстратом для полимеразы β .

Ранее нами показано, что фактор репликации А человека взаимодействует с ДНК-дуплексом, имеющим участок матрицы, выступающий за 3'-конец праймера. Остаток NAB-dUTP вводился в 3'-конец праймера с помощью ДНК-полимераз, последующее УФ-облучение приводило к его ковалентному присоединению к средней по молекулярной массе субъединице RPA (32 кДа), а также и к более тяжелой субъединице (70 кДа) [9]. Поскольку было продемонстрировано, что взаимодействие RPA с растущей нитью ДНК происходит также на уровне хроматина [13], то представляло интерес оценить чувствительность RPA к отсутствию 3'-концевой гидроксильной группы.

На рис. 2 представлен радиоавтограф геля, полученного после электрофоретического разделения продуктов модификации полимеразы β и RPA фотореакционноспособным $5'$ - ^{32}P -меченым праймером, содержащим на 3'-концевом нуклеотиде 2-нитро-5-азидобензоильный остаток. Видно, что как в случае NAB-dUTP (1–5, 7), так и в случае NAB-ddUTP (6, 8–12), в отсутствие RPA при облучении УФ-светом мечению подвергалась полиме-

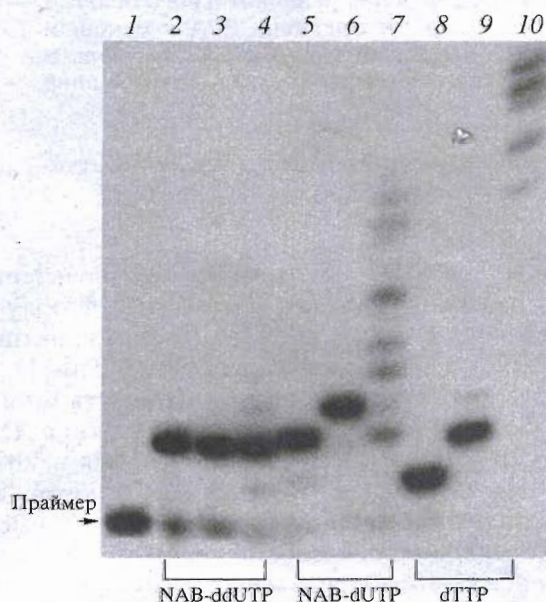


Рис. 1. Проверка субстратных свойств NAB-ddUTP, NAB-dUTP и dTTP в реакции синтеза ДНК, катализируемой полимеразой β . Реакционные смеси помимо стандартных компонентов (см. "Эксперимент. часть") содержали NAB-ddUTP (2–4), NAB-dUTP (5–7), dTTP (8–10). После инкубации (20 мин, 25°C) к реакционным смесям добавляли dATP (3, 6, 9) либо смесь dCTP, dGTP, dATP (4, 7, 10) до концентрации каждого 10 мкМ и инкубировали дополнительно 20 мин при 25°C. Затем реакционные смеси обрабатывали 10 мкл 90% формамида, содержащего 50 мМ EDTA и 0.1% бромфеноловый синий, и выдерживали в течение 3 мин при 80°C. Продукты ковалентного присоединения идентифицировали разделением электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях с последующей радиоавтографией.

раза β (3, 9), а в присутствии RPA также и р70-, и р32-субъединицы RPA (4, 10). Если же в реакционные смеси после инкубации с аналогами были добавлены три недостающих природных нуклеотида и смеси инкубированы дополнительно в условиях синтеза ДНК, то в случае NAV-ddUTP картина мечения не изменялась (11, 12), тогда как в присутствии NAV-dUTP наблюдались радиоактивно меченные продукты с молекулярной массой в области 14 кДа (5, 7), которые могли образоваться в результате ковалентного присоединения праймера к матрице. При этом происходило уменьшение интенсивности мечения как полимеразы β , так и RPA.

Таким образом, новый фотореакционноспособный терминирующий аналог дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата может быть использован в качестве субстрата ДНК-полимеразы β для строго селективной остановки роста новосинтезируемой цепи ДНК. Особенный интерес представляет использование подобного аналога в ядерных и клеточных экстрактах. Поскольку при исследовании таких систем возникает необходимость добавления других dNTP (в том числе меченных ^{32}P по α -фосфату), в результате чего фотореакционноспособные аналоги статистически распределяются по новосинтезированной ДНК, это усложняет картину мечения [11]. Применение же терминирующих аналогов, несущих фотореакционноспособную группу, позволит более точно выявлять белки, взаимодействующие с 3'-концом растущей ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реагенты: нерадиоактивные дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (Сибэнзим, Новосибирск), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Биосан, Новосибирск), маркеры молекулярной массы Rainbow (Amersham), Т4-полинуклеотидкиназу (New England Biolabs), трисгидроксиметиламинометан (Трис), изопропил- β -D-тиогалактозид (IPTG), ампициллин (Sigma), лизоцим (Boeringer Mannheim), MgCl_2 , KCl , KSCN (все отечественного производства квалификации "ос. ч."), β -меркаптоэтанол, NP-40, пептон, дрожжевой экстракт (Fluka), DEAE-toyopearl, SP-toyopearl (Toyo-Soda), одноцепочечную ДНК-целлюлозу (USB-Amersham), гепаринсефарозу (Pharmacia). Олигонуклеотиды: 36-звенная матрица (5')GGTTCGATATCGTAGTTCTAGTGTATAGCCCTACC, 16-звенный праймер (3')CACATATCGGGGATGG синтезированы в институте Жака Моно (Париж). Плазмида pRSET, содержащая ген ДНК-полимеразы β крысы, и штамм *E. coli* BL21 (DE 3) pLysE для экспрессии белка были любезно предоставлены проф. С. Вилсоном (NIHNS, Сев. Каролина, США). RPA был любезно предоставлен К. Вайссхартом (IMB,

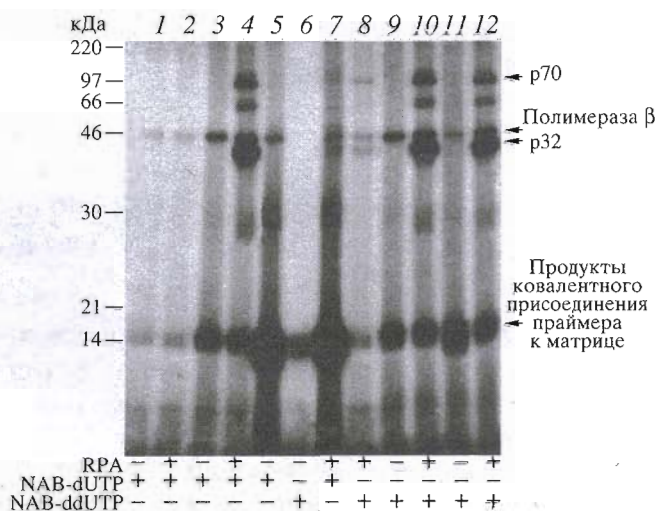


Рис. 2. Фотоаффинное мечение полимеразы β и RPA с использованием NAV-dUTP и NAV-ddUTP. Все реакционные смеси содержали 5'- ^{32}P -меченый праймер-матрицу, 1.4 мкМ полимеразу β ; другие стандартные компоненты указаны в "Эксперимент. части". Кроме того, реакционные смеси содержали 10 мкМ NAV-dUTP (1-5, 7) либо NAV-ddUTP (6, 8-12), а также 0.7 мкМ RPA (2, 4, 7, 8, 10, 12). После завершения удлинения праймера (20 мин, 25°C) в реакционные смеси (4, 5, 11, 12) добавляли смесь dGTP, dATP, dCTP до концентрации каждого 10 мкМ и инкубировали 20 мин при 25°C. Реакционные смеси (3-5, 7, 9-12) облучали 15 мин УФ-светом с длиной волны 315 нм, добавляли к ним 10 мкл буфера Лэммли и разделяли 12% ПААГ-электрофорезом с последующей радиоавтографией.

Йена). 5-(3-Аминопропил-1)-2',3'-дидезоксиридин-5'-трифосфат получали как описано ранее [14].

Спектры ^1H - и ^{31}P -ЯМР регистрировали на спектрометре WP-200 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 200 и 81 МГц соответственно при температуре 20°C в D_2O с использованием внешнего стандарта тетраметилсилана и 85% фосфорной кислоты соответственно; приведены химические сдвиги в миллионных долях и КССВ в герцах. УФ-спектры записывали на спектрофотометре Specord UV/VIS M-40 (Германия).

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) в смеси растворителей: изопропанол-25% водн. NH_3 -вода, 7 : 1 : 2 (система А) и на пластинках PEI-Cellulose F (Merck) в 1 М K_2HPO_4 (рН 8.0) в 10% этанол-вода-диоксан, 1 : 3 : 2 (система Б).

5-[транс-N-(2-Нитро-5-азидобензоил)-3-аминопропил-1]-2',3'-дидезоксиридин-5'-трифосфат (NAV-ddUTP) был получен из 5-(3-аминопропил-1)-2',3'-дидезоксиридин-5'-трифосфата в соответствии с методикой, описанной для синтеза NAV-dUTP [1]. Выход 1.4 мг (91%). Продукт индивидуален по данным ТСХ, R_f 0.33 (А), 0.35 (Б). УФ-спектр (H_2O): λ_{max} , нм (ϵ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) 304

(13900), λ_{\min} 267 (11100), ^{31}P -ЯМР, δ : -9.2 (д, 1P, P γ , $J_{\text{P}\beta}$ 23); -10.8 (д, 1P, P α , $J_{\text{P}\beta}$ 23); -22.3 (дд, 1P, P β , $J_{\text{P}\alpha, \text{P}\gamma}$ 20); ^1H -ЯМР, δ : 1.90-2.06 (м, 3H, H2' β , H3' α, β); 2.30 (м, 1H, H2' α); 3.98 (м, 3H, H9, H5' β); 4.12 (м, 1H, H5' α); 4.25 (м, 1H, H4'); 5.98 (дд, 1H, H1', $J_{\text{H}2'\alpha}$ 7 и $J_{\text{H}2'\beta}$ 4); 6.28-6.44 (м, 2H, H7, H8); 7.16 (д, 1H, H12, $J_{\text{H}11}$ 2.5); 7.19 (дд, 1H, H11, $J_{\text{H}10}$ 8.5 и $J_{\text{H}12}$ 2.5); 7.80 (с, 1H, H6); 8.15 (д, 1H, H10, $J_{\text{H}11}$ 8.5).

Полимераза β (КФ 2.7.7.7) получена в основном как описано в работе [15]. Клетки *E. coli* BL21 (DE 3) pLysE, содержащие плазмиду с геном полимеразы β крысы, выращивали при 37°C в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), до оптического поглощения 0.6 OE_{600} , затем добавляли IPTG до конечной концентрации 0.5 мМ. Клетки дополнительно инкубировали в течение 4 ч при интенсивной аэрации. Для разрушения клеток использовали метод 2, приведенный в работе [15] с дополнительным озвучиванием для деградаций ДНК. Полимеразу β выделяли с помощью последовательных хроматографических процедур на гепаринсефарозе, одноцепочечной ДНК-целлюлозе, SP-toyopearl.

Субстратные свойства NAB-ddUTP проверяли в реакции синтеза ДНК, катализируемой полимеразой β . Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала следующие стандартные компоненты: 10 мкМ dNTP или их аналоги, 0.5 мкМ 5'- ^{32}P -меченый праймер-матрицу и 1.4 мкМ полимеразу β , 50 мМ Трис-НСI (рН 7.8), 10 мМ MgCl_2 , 50 мМ КСI. Концентрация RPA в реакционной смеси была 0.5 мкМ. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях [16].

Эксперименты по фотоаффинной модификации. После завершения элонгации праймера (25°C, 20 мин) реакционные смеси (см. предыдущий раздел) облучали УФ-светом с длиной волны 315 нм 15 мин с использованием монохроматора Vaush и Lomb и лампы высокого давления (НВО W). Продукты модификации анализировали электрофорезом в 12% ПААГ по Лэммли [16] с последующей радиоавтографией.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Н.А. Лебедеву за техническую помощь. Работа поддержана грантами РФФИ № 99-04-49277, 98-04-49718, 98-03-32930 и грантом ИНТАС № 96-1778.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Godovikova T.S., Kolpashchikov D.M., Orlova T.N., Richter V.A., Ivanova T.M., Grochevsky S.L., Nasedkina T.V., Poletaev A.I. // *Bioconjugate Chem.* 1999. V. 10. P. 529-537.
3. Колпащиков Д.М., Захаренко А.Л., Дежуров С.В., Речкунова Н.И., Ходырева С.Н., Дегтярев С.Х., Литвак В.В., Лаврик О.И. // *Биоорганическая химия.* 1999. Т. 25. С. 129-136.
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. Щербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Дымшиц Г.М., Лаврик О.И. // *Молекулярная биология.* 1997. Т. 31. С. 344-352.
9. 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.
10. Захаренко А.Л., Ходырева С.Н., Речкунова Н.И., Сафронов И.В., Пышный Д.В., Дегтярев С.Х., Лаврик О.И. // *Биохимия.* 1998. Т. 63. С. 1090-1096.
11. Doerhoefer S., Khoireva S., Safronov I.V., Wlassoff W.A., Anarbaev R., Lavrik O.I., Holler E. // *Microbiology.* 1998. V. 144. P. 3181-3193.
12. Yamaguchi T., Saneyoshi M. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 3364-3369.
13. Mass G., Nethanel T., Kaufmann G. // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 6399-6407.
14. Дьяченко Л.Б., Ченчик А.А., Лукин М.А., Александрова Л.А., Краевский А.А., Бибилашвили Р.Ш. // *Молекулярная биология.* 1994. Т. 28. С. 102-112.
15. Date T., Yamaguchi M., Hirose F., Nishimoto Y., Tanibara K., Matsukage A. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 2983-2990.
16. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680-685.

**The Preparation of a Photoreactive Analogue
of 2',3'-Dideoxyuridine 5'-Triphosphate and Its Use
for Photoaffinity Modification of Human Replication Protein A**

D. M. Kolpashchikov*, L. A. Alexandrova,
N. F. Zakirova**, S. N. Khodyreva*, and O. I. Lavrik****

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

***Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP-1 Moscow, 117984 Russia*

A new reagent for photoaffinity modification of biopolymers, 5-[E-N-(2-nitro-5-azidobenzoyl)-3-amino-1-propen-1-yl]-2',3'-dideoxyuridine 5'-triphosphate (NAB-ddUTP), was synthesized. Like a similar derivative of 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (NAB-dUTP), it was shown to be able to effectively substitute for dTTP in the synthesis of DNA catalyzed by eukaryotic DNA polymerase β and to terminate DNA synthesis. A 5'-³²P-labeled primer with a photoreactive group at the 3'-terminus was derived from NAB-ddUTP and used for photoaffinity labeling of the human replication protein A (RPA). The covalent attachment of RPA p32 and p70 subunits to the labeled primers was demonstrated. NAB-ddUTP is a promising tool for studying the interaction of proteins of the replicative complex with NA in cellular extracts and living cells during the termination of DNA synthesis.

Key words: eukaryotic DNA polymerase β , human replication protein A, photoactivatable dNTP and ddNTP analogues, photoaffinity modification

*# To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (383-2) 34-4296; fax: +7 (383-2) 33-3677;
e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru.*

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 2. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.