



УДК 547.963.057:577.325

## РЕАГЕНТЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ. III. САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ЭЛОНГИРУЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ $\beta$ АРИЛАЗИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ПРАЙМЕРОВ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ $\gamma$ -АМИДАМИ АТР

© 2001 г. И. В. Сафронов<sup>\*,#</sup>, И. А. Драчкова<sup>\*\*</sup>, И. О. Петрусева<sup>\*</sup>, С. Н. Ходырева<sup>\*,\*\*</sup>,  
М. И. Добриков<sup>\*</sup>, Т. М. Иванова<sup>\*</sup>, Г. В. Шишкин<sup>\*</sup>, О. И. Лаврик<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

<sup>\*\*</sup> Новосибирский государственный университет,  
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 08.09.2000 г. Принята к печати 07.03.2001 г.

Синтезированы и охарактеризованы  $\gamma$ -амиды АТР, содержащие в  $\gamma$ -N-положении остатки 1-метилпирена, 9-метилантрацена, 10-хлор-9-метилантрацена и 3-метилперилена. Эти соединения использованы как сенсibilизаторы сайт-специфической фотомодификации реконструированного элонгирующего комплекса ДНК-полимеразы  $\beta$  млекопитающих. Фотомодификацию проводили с помощью фотоаффинных реагентов, которые были синтезированы *in situ* элонгацией  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченых праймеров фотоактивными аналогами dCTP, содержащими в *экзо*-N-положении цитозина различные перфторарилазидные группы. Исследовано влияние структур сенсibilизаторов и фотоаффинных реагентов на эффективность и селективность образования фотопрививок праймеров к ферменту и матрице, а также образования ряда других продуктов фотомодификации. Показано, что сенсibilизаторы, содержащие остатки 10-хлор-9-метилантрацена и 3-метилперилена позволяют получать фотосшивки в таких условиях облучения, когда фотомодификация в их отсутствие практически не наблюдается.

*Ключевые слова:* антрацен; пирен; перилен; перфторарилазид; ДНК-полимераза  $\beta$ ; аффинная модификация.

### ВВЕДЕНИЕ

Недавно был разработан метод сенсibilизированной аффинной фотомодификации ДНК-полимераз бинарными системами фотоаффинный реагент-сенсibilизатор [2]. В качестве фотоаффинных реагентов (F) выступали праймеры, элонгированные с помощью ДНК-полимераз *in situ* замещенным по основанию 4-азидотетрафторбензоиламинопроизводным dUTP. Сенсibilизатором служило замещенное по основанию пиреновое производное dUTP. В таких ферментативных комплексах F локализован в ДНК-связывающем канале, а сенсibilизатор – в dNTP-связывающем кармане фермента. При облучении

УФ-светом с длиной волны 365–390 нм энергия, первоначально поглощенная пиреновой группой сенсibilизатора, может переноситься на ариллазидогруппу фотоаффинного реагента F и приводить к фотопрививкам праймера к ферменту. Было показано, что в этих условиях облучения скорость образования фотопрививок  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченых праймеров к ДНК-полимеразе  $\beta$  в присутствии пиренового производного dUTP в 10 раз выше, чем при проведении фотомодификации без сенсibilизатора [2]. Аналогичные результаты были получены при использовании ДНК-полимеразы из *Thermus thermophilus* [3].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основная цель данной работы – повысить отношение скоростей протекания фотомодификации в белково-нуклеиновых праймер-матричных комплексах в присутствии и в отсутствие сенсibilизаторов-производных dNTP. Для решения этой

Сообщение II см. [1].

Сокращения: НК – нуклеиновые кислоты; п/м – праймер-матричная система; F – фотоаффинный реагент; МКХ – микроколоночная хроматография.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (383-2) 333-762; эл. почта: safron@niboch.nsc.ru).

задачи мы использовали подход, который ранее успешно реализован при проведении комплементарно-адресованной сенсibilизированной фотомодификации одонитчатых ДНК-матриц с помощью бинарных систем олигонуклеотидных конъюгатов [4–7]. Замена пиреновых флуоресцентных групп на антраценовые и периленовые в олигонуклеотидах-сенсibilизаторах и 4-азидотетрафторбензоильных групп на 4-азидотетрафторбензилиденные в фотоактивных производных олигонуклеотидов позволила проводить облучение видимым светом и привела к увеличению отношения скоростей сенсibilизированной фотомодификации к прямой от ~100 до ~300000, а также к повышению эффективности фотомодификации одонитчатой ДНК-матрицы от 58 [7] до 90–100% [4–6].

Кроме того, мы хотели исследовать влияние структур сенсibilизаторов и **F** на направление фотомодификации в серии комплексов ДНК-полимеразы  $\beta$  с матрицами и фотореакционноспособными праймерами, несущими на экзоциклических аминогруппах 3'-концевых dCMP различные перфторарилазидные группы [1].

При конструировании представляемой серии сенсibilизаторов мы стремились получить нуклеозидтрифосфатные производные, которые максимально сохраняли бы способность адсорбироваться комплементарнозависимым способом в dNTP-связывающем кармане комплексов ДНК-полимеразы  $\beta$  с праймер-матрицами, но не могли быть использованы в качестве субстратов для элонгации фотоактивных праймеров.

При выборе  $\gamma$ -фосфата нуклеозидтрифосфата для введения сенсibilизирующей группы мы исходили из данных рентгеноструктурного анализа комплекса ДНК-полимеразы  $\beta$  с матрицей, праймером, содержащим на 3'-конце остаток ddCMP, и ddCTP [8]. Согласно этим данным, двухнитчатый участок праймер-матрицы располагается в ложбинке молекулы фермента (ДНК-связывающем канале), а ddCTP – в dNTP-связывающем кармане.  $\gamma$ -Фосфатная группа ddCTP представляется удобной для присоединения объемных флуоресцентных групп, так как при этом напрямую не затрагивается система взаимодействий между компонентами комплекса. Расстояние между  $\gamma$ -фосфатом ddCTP и азотом экзоциклической аминогруппы 3'-ddCMP-праймера составляет примерно 12–13 Å\*, что достаточно для протекания фотоиндуцированного синглет-синглетного резонансного переноса энергии и переноса электрона между используемыми флуоресцентными и перфторарилазидными группами [6, 9]. Таким образом, замещенные по  $\gamma$ -фосфатной группе производные dNTP теоретически способны выступать в качестве фотосенсibilизаторов для проведения фотомодификации в

составе исследуемых белково-нуклеиновых комплексов ДНК-полимеразы  $\beta$ . Кроме того, мы решили использовать короткий линкер, чтобы ограничить подвижность флуоресцентной группы относительно  $\gamma$ -фосфата сенсibilизатора, уменьшив таким образом до минимума размер зоны действия сенсibilизатора относительно его  $\gamma$ -фосфатной группы.

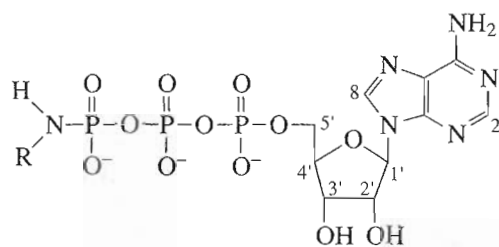
Следует отметить, что введение флуоресцентных групп по  $\gamma$ -фосфату позволяет избежать проблемы последовательного включения фотореакционноспособных и флуоресцентных групп в праймер, несмотря на то, что  $\gamma$ -амиды dNTP могут служить элонгирующими субстратами для ряда ДНК-полимераз [10], поскольку при использовании таких производных в качестве элонгирующих субстратов флуоресцентные группы окажутся связанными с пирофосфатом, а не с праймерами. В данной работе мы выбрали рибозный остаток вместо дезоксирибозного для того, чтобы избежать расхода **F** в результате использования сенсibilизаторов в качестве элонгирующих субстратов. Это могло привести к появлению дополнительных продуктов, детектируемых при применении  $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -меченых праймеров, и затруднить анализ полученных результатов. Выбор гетероциклического основания в сенсibilизаторе обусловлен тем, что аденозин комплементарен первому свободному основанию матрицы после встраивания в праймер фотоактивного аналога dCTP. В качестве объектов для тестирования сенсibilизаторов (I)–(IV) использовали описанные в предыдущем сообщении [1] комплексы ДНК-полимеразы  $\beta$  с матрицами и **F**, полученными *in situ* элонгацией  $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -меченых праймеров перфторарилазидными производными dCTP (V)–(VIII) (далее **F<sub>V</sub>**–**F<sub>VIII</sub>**).

В отличие от ранее использованной для этого же фермента бинарной системы, в которой перфторарилазидная группа была присоединена к 3'-концевому 5-замещенному dUMP, в качестве сенсibilизатора выступало 5-замещенное производное dUTP, к которому флуоресцентная пиреновая группа была присоединена через длинный сложный линкер [2] (теоретически способный обеспечить сенсibilизацию практически из любой конформационно возможной позиции перфторарилазидной группы), сенсibilизаторы на основе  $\gamma$ -амидов будут направлять фотоиндуцируемые реакции в участок связывания каталитически важных катионов магния остатками аспартатов D190, D192 и D256 [8].

Используемые в качестве сенсibilизаторов фосфамиды (II) и (III) были синтезированы конденсацией ATP с соответственно 9-аминометилантраценом и 10-хлор-9-аминометилантраценом в присутствии 2,2-дитио-бис(4,6-диметилпиридина), трифенилфосфина и 4-(*N,N*-диметиламино)пиридина согласно методике, приведенной в работе [11]. Полученные  $\gamma$ -амиды ATP (II) и (III) выделя-

\* База данных Swiss Prot, файл 2BPF.pdb.



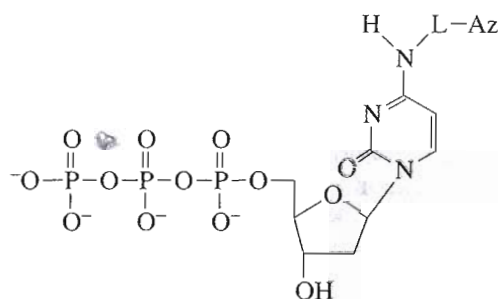
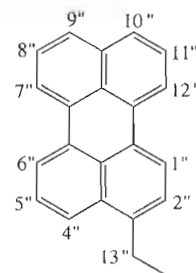
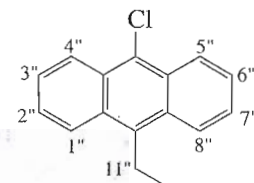
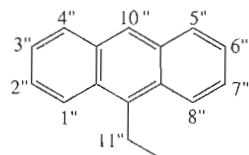
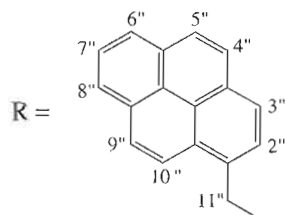


(I)

(II)

(III)

(IV)



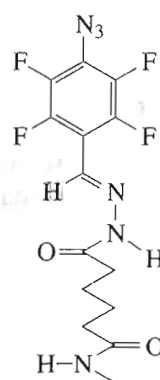
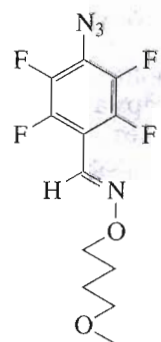
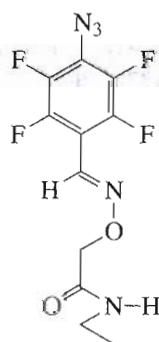
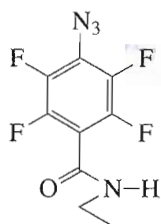
(V)

(VI)

(VII)

(VIII)

L-Az =



ли с помощью обращенно-фазовой хроматографии с выходами 37 и 34% соответственно. Производные (I) и (IV) были получены конденсацией АТР с 1-аминометилпиреном и 3-аминометилпиреном в присутствии ДСС при 50°C. Очистку этих  $\gamma$ -амидов проводили так же, как и фосфами-

дов (II) и (III). Выход соединений (I) и (IV) составил 40 и 15% соответственно.

Строение соединений (I)–(IV) подтверждено спектрами поглощения и флуоресценции и данными  $^1\text{H}$ -ЯМР. Сигналы протонов  $\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{P}$

**Таблица 1.** Максимумы поглощения ( $\lambda_{\max}$ , нм) и флуоресценции ( $\lambda_{\text{фл}}$ , нм), а также изменение интенсивности флуоресценции ( $F_{\text{отн}}$ )\* флуорофоров в составе АТР-производных

Амин $\rightarrow$ фосфамид АТР	$\lambda_{\max}/\lambda_{\text{фл}}$	$F_{\text{отн}}$
1-Аминотилпирен $\rightarrow$ (I)	342/376 $\rightarrow$ 345/378	5.5
9-Аминотилантрацен $\rightarrow$ (II)	386/390 $\rightarrow$ 388/394	1.8
10-Хлор-9-аминотилантрацен $\rightarrow$ (III)	397/400 $\rightarrow$ 400/406	1.6
3-Аминотилперилен $\rightarrow$ (IV)	440/445 $\rightarrow$ 443/451	1.5

\*  $F_{\text{отн}}$  определяли как отношение интенсивности флуоресценции водных растворов литиевых солей производных АТР (I)–(IV) и растворов гидрохлоридов соответствующих аминов в этиловом спирте при возбуждении в максимумах поглощения. Оптическая плотность всех растворов в максимумах поглощения ( $\lambda_{\max}$ ) составляла 0.1 ОЕ.

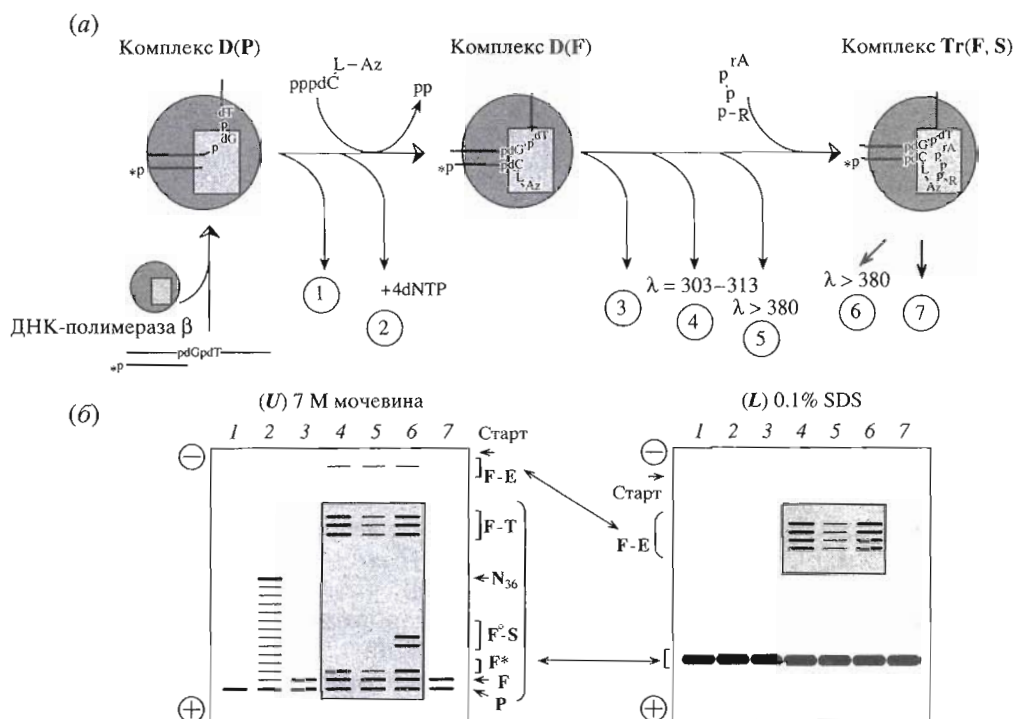
в спектрах производных (I)–(IV) в  $D_2O$  не удалось зафиксировать в условиях подавления сигналов воды. Сигналы этих протонов присутствовали в виде синглетов в спектрах гидрохлоридов 9-аминотилантрацена (5.17 м.д.), 10-хлор-9-аминотилантрацена (5.07 м.д.), 1-аминотилпирена (4.8 м.д.) и 3-аминотилперилена (4.46 м.д.).

Присоединение флуорофоров к АТР сопровождается существенными изменениями их спектральных и флуоресцентных свойств (см. табл. 1). Наблюдаются длинноволновые сдвиги на 3–4 нм в спектрах поглощения и на 2–6 нм – в спектрах флуоресценции, а также существенное увеличение интенсивности флуоресценции, наиболее значительное в случае пирена. Исходя из фотофизических свойств используемых полициклических ароматических групп [12], можно предположить, что усиление интенсивности флуоресценции происходит в результате изменения полярности микроокружения флуорофоров и уменьшения гашения кислородом их  $S_1$ -состояний вследствие экранирующего действия рибонуклеотидных остатков.

Спектральный диапазон и интенсивность облучения ( $\lambda > 380$  нм,  $W \times 10^{-4}$  Вт/см<sup>2</sup>) для проведения сенсibilизированной фотомодификации были выбраны на основании данных работ [13, 14] с таким расчетом, чтобы избежать двухквантовой триплет-триплетной сенсibilизации, особенно характерной для пиренсодержащих сенсibilизаторов. Сенсibilизированную фотомодификацию проводили по схеме, представленной на рис. 1а. На первой стадии получали двойной комплекс ДНК-полимеразы  $\beta$  с праймер-матричной системой (комплекс D(P)). Затем, добавляя один из трифосфатов (V)–(VIII), синтезировали *in situ* F (получали комплекс D(F)), добавляли один из сенсibilизаторов (получали комплекс Tr(F, S)) и облучали. Состав смесей до и после облучения анализировали с помощью 20% ПААГ-электрофореза в присутствии 7 М мочевины [15] (рис. 1б, схематическая электрофореграмма (U)). Кроме того, параллельно анализировали состав продуктов фотопришивок праймеров к ферменту в 12.5% ПААГ-электрофорезе в присутствии 0.1% SDS по Леммли [16] (рис. 1б, схематическая элект-

рофореграмма (L)). В предварительных контрольных опытах оценивали эффективность элонгации [ $5'$ -<sup>32</sup>P]праймеров (рис. 1б, (U), дорожка 1) ДНК-полимеразой  $\beta$  в присутствии природных dNTP (рис. 1б, (U), 2) и с помощью производных dCTP (рис. 1б, (U), 3). Кроме того, проводили несенсибилизированную сайт-специфическую фотомодификацию комплексов D(F) при облучении УФ-светом с длиной волны 303–313 нм (рис. 1б, (L) и (U), 4) и  $>380$  нм (рис. 1б, (L) и (U), 5). Время облучения для проведения сенсibilизированной фотомодификации (10 мин) выбрали с таким расчетом, чтобы суммарная фотопришивка [ $5'$ -<sup>32</sup>P]праймеров к компонентам комплекса D(F) без сенсibilизации не превышала 1–2% при использовании для получения F наиболее светочувствительного аналога dCTP (VIII). Важные для дальнейшего обсуждения фрагменты радиоавтографов разделения продуктов фотомодификаций в составе комплексов D(F) и Tr(F, S) (обозначены затененными прямоугольниками на рис. 1б) представлены на рис. 2. Каждой из дорожек, выделенных прямоугольниками на рис. 1б, соответствует кинетическая серия из трех дорожек на рис. 2.

Продукты фотомодификаций мы условно разделили на четыре группы (рис. 1б). Три группы продуктов накапливаются при проведении фотомодификаций в обоих типах комплексов (D(F) и Tr(F, S)) и описаны в предыдущем сообщении [1]. Первую группу составляют продукты фотопришивки F к ферменту (F–E), которые при проведении электрофореза в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины имеют очень малую подвижность, но хорошо разделяются и характеризуются с помощью 12.5% ПААГ в присутствии 0.1% SDS (рис. 1б, схемы (U) и (L) и рис. 2, гели A(L)–D(L)). Ко второй группе относятся продукты фотопришивки праймеров к матрице (F–T), которые имеют при электрофоретическом разделении в 7 М мочеvine меньшую подвижность, чем полностью элонгированные праймеры (рис. 1б, схема (U) и рис. 2, радиоавтографы A(U)–D(U), выше стрелок N<sub>36</sub>). Третью группу составляют накапливающиеся при проведении фотомодификации продукты, имеющие подвижности, совпадающие (F) или ма-



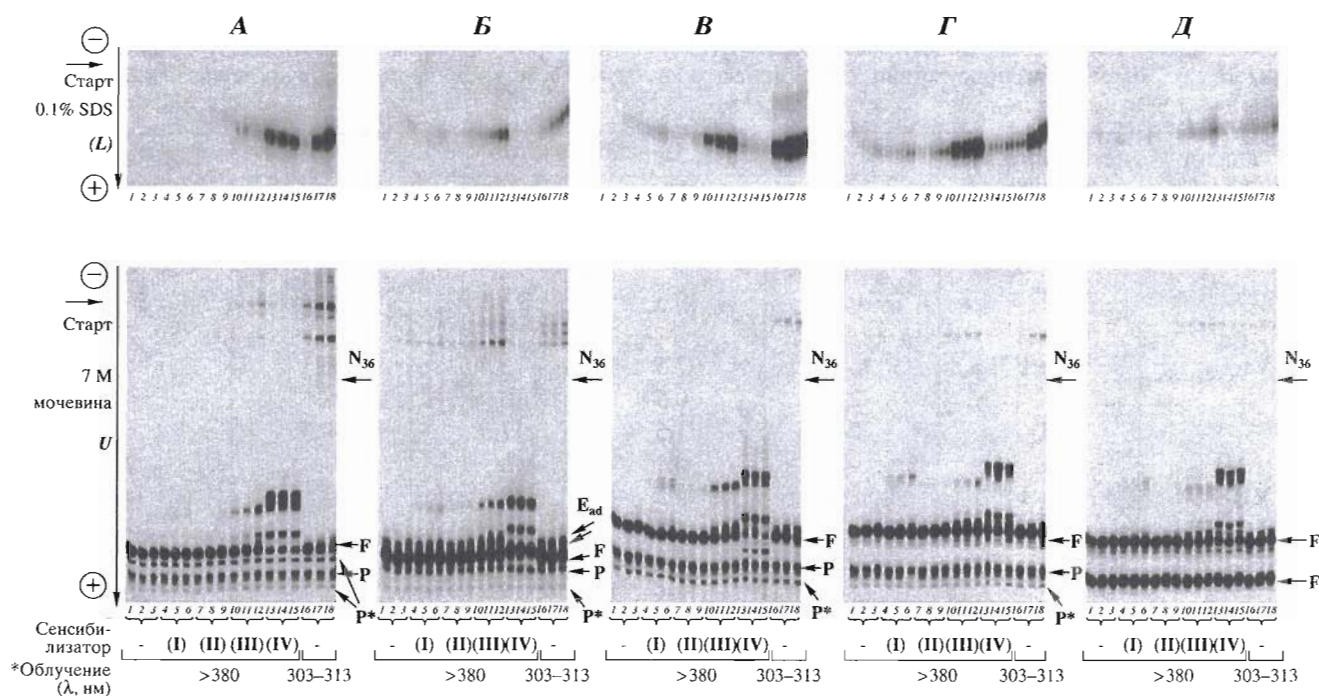
**Рис. 1.** Общая схема получения исследуемых комплексов и их фотомодификации (а), анализ полученных продуктов (б) с помощью ПААГ-электрофореза в 7 М мочеvine (U) и 0.1% SDS (L). D(P) – двойной комплекс ДНК-полимеразы  $\beta$  с исходным 5'- $^{32}$ P-меченым праймером и матрицей; D(F) образуется из D(P) в результате элонгации исходного праймера одним из аналогов dCTP с образованием реагента (F); Tr(F, S) – тройной комплекс D(F) с сенсibilизатором (S). Номера в кружочках обозначают номера дорожек на схематических электрофореграммах разделения нуклеиновых кислот, продуктов их фотомодификаций (U) и фотоиндуцированных сшивок F с ферментом (L) и соответствуют распределению радиоактивности между компонентами комплексов D(P), D(F) и Tr(F, S) в следующих реакционных смесях: 1) комплекс D(P); 2) комплекс D(P) в присутствии четырех природных dNTP через 30 мин инкубации; 3) комплекс D(F); 4) комплекс D(F) после облучения УФ-светом с  $\lambda$  303–313 нм; 5) комплекс D(F) после облучения УФ-светом с  $\lambda > 380$  нм; 6) комплекс Tr(F, S) после облучения УФ-светом с  $\lambda > 380$  нм; 7) комплекс Tr(F, S) без облучения. Фрагменты радиоавтографов, выделенные затененными прямоугольниками, представлены на рис. 2.

лоотличающиеся (F\*) от подвижностей фотореагента (рис. 2, радиоавтографы A(U)–D(U)). Ее, вероятнее всего, составляют продукты фотоиндуцируемых реакций F с водой и компонентами буфера. Поскольку нам не удалось надежно разделить в используемых условиях фракционирования исходные фотоаффинные реагенты F и часть продуктов этой группы, то в дальнейшем мы вынуждены их объединить в смешанную группу [F + F\*]. При проведении фотомодификаций в составе комплексов Tr(F, S) появляется группа новых продуктов (F–S) с подвижностью, промежуточной между подвижностью, характерной для продуктов группы [F + F\*] и продуктов полной элонгации исходных праймеров природными dNTP (между стрелками F\* и N<sub>36</sub> на рис. 1б, схема (U) и на рис. 2, радиоавтографы A(U)–D(U), дорожки 4–15). В отличие от продуктов первых трех групп продукты F–S проявляются только при проведении сенсibilизированных фотомодификаций в комплексах Tr(F, S). Их состав и подвижность заметно отличаются при использовании разных сенсibilизаторов с одними и теми же реагентами F.

Таким образом, продукты F–S являются сенсibilизаторспецифичными и, вероятнее всего, образуются в результате фотопрививки праймеров к сенсibilизаторам (более точно охарактеризовать эти продукты предполагается в последующих работах).

На всех дорожках радиоавтографов A(U)–D(U) (рис. 2) видны полосы исходных неэлонгированных праймеров (стрелки P), а также дополнительные полосы, имеющие одинаковую электрофоретическую подвижность и близкую интенсивность на всех дорожках (стрелки P\*). Все они возникают на стадии элонгации праймеров аналогами dCTP, наблюдаются в контрольных опытах (данные не приведены), и их количества не изменяются при проведении фотомодификаций в комплексах D(F) и Tr(F, S). Поскольку интенсивность этих полос не изменялась при облучении, скорее всего, они соответствуют продуктам, не содержащим перфторариллазидных групп, и поэтому не учитывались при проведении количественной оценки результатов фотомодификации. Результаты количественного определения выхо-





**Рис. 2.** Фрагменты радиоавтографов гелей после электрофоретического разделения в ПААГ компонентов фотомодифицированных комплексов ДНК-полимеразы  $\beta$ . Представленные фрагменты радиоавтографов соответствуют выделенным затенением прямоугольникам на схематических электрофореграммах (рис. 1б). Верхний ряд (L) представляет электрофоретическое разделение продуктов фотоиндуцированных сшивок F с ДНК-полимеразой  $\beta$  в присутствии 0.1% SDS. Нижний ряд (U) – разделение олигонуклеотидов и продуктов их фотомодификации в присутствии 7 М мочевины. Буквы над верхним рядом относятся к разным комбинациям аналогов dCTP и матрично-праймерных комплексов, использованных при получении комплексов D(F) и Tr(F, S), и соответствуют: А – (V), п/м-2, Б – (VI), п/м-1, В – (VII), п/м-1, Г – (VIII), п/м-2, Д – (VIII), п/м-1. Условия облучения и применявшиеся сенсibilизаторы обозначены под рисунком. Группы из трех дорожек, объединенные фигурными скобками, соответствуют различным временам облучения: 1, 3 и 10 мин при  $\lambda > 380$  нм; 0.5, 1 и  $3\tau_{1/2}$  при  $\lambda 303\text{--}313$  нм.  $\tau_{1/2}$  равны: 10 мин для аналога dCTP (V), 30 с для аналога (VI), 1 мин для аналога (VII) и 10 с для аналога (VIII). Стрелками обозначены расположения полос, определенные в контрольных опытах (рис. 1б, (U), дорожки 1–3) и соответствующие исходному  $5^{1-32}\text{P}$ -меченому праймеру (P), продукту его полной элонгации в присутствии четырех природных dNTP до 36-мерного олигонуклеотида ( $N_{36}$ ), фотоаффинному реагенту (F) и дополнительным полосам, появившимся на стадии элонгации, но не содержащим арилизидных групп (P\*). На фрагменте Б(U) обозначены также две полосы, соответствующие продуктам удлинения  $F_{VI}$  аналогом dCTP (VI) на один-два нуклеотида (стрелки  $F_{ad}$ ).

да продуктов фотомодификаций после проведения сенсibilизированных (в течение 10 мин) и несенсibilизированных (в течение трех времен полуфотолитиза) фотомодификаций представлены в табл. 2 (метод расчета описан в предыдущем сообщении [1]).

Эффективность образования  $5^{1-32}\text{P}$ -меченых реагентов F *in situ* в контрольном эксперименте (рис. 1б, схема (U), дорожка 3) составила 85–95% при элонгации исходных праймеров арилизидными производными dCTP (V)–(VII). При использовании трифосфата (VIII) эффективность удлинения  $[5^{1-32}\text{P}]$ праймеров ДНК-полимеразой  $\beta$  различалась для систем п/м-2 (85–90%) и п/м-1 (45–50%) в одних и тех же условиях эксперимента. Кроме того, в контрольных опытах наблюдалось удлинение  $F_{VI}$  аналогом dCTP (VI) на один-два нуклеотида (рис. 2, радиоавтограф Б(U), стрелки  $F_{ad}$ ). В отличие от дополнительных продуктов группы

P\*, они расходуются при проведении фотомодификаций, особенно при использовании сенсibilизатора (IV) (комплекс Tr( $F_{VI}$ , IV), рис. 2, Б(U), дорожки 13–15). В экспериментах по фотомодификации ферментативных комплексов использовался четырехкратный мольный избыток фермента по отношению к праймер-матрице, чтобы избежать влияния факторов, связанных с конкуренцией за связывание с ферментом ДНК-дуплексов, не содержащих реагентов F.

Очевидно, что после 10 мин облучения только фотомодификации, сенсibilизированные периленом (IV) (рис. 2, электрофореграммы А–Д, дорожки 13–15 и табл. 2), можно считать завершившимися для всех реагентов F, поскольку не наблюдается существенного изменения набора продуктов при увеличении времени облучения от 1 до 10 мин. При использовании сенсibilизаторов (I)–(III) наблюдается увеличение количества

**Таблица 2.** Эффективность (%) образования фотопришивок  $5'$ - $^{32}\text{P}$ -меченых фотоаффинных реагентов  $\text{F}_{\text{V}}\text{--}\text{F}_{\text{VIII}}$  к ДНК-полимеразе  $\beta$  и ДНК-матрице, а также ряда других продуктов фотомодификации после облучения УФ-светом ( $\lambda > 380$  нм, 10 мин) в присутствии сенсibilизаторов (I)–(IV) и трех времен полужелтого света в отсутствие сенсibilизаторов

F: аналог dСТР-п/м	Детектируемые продукты	Сенсibilизатор				Без сенсibilизатора*
		(I)	(II)	(III)	(IV)	
V-2	[F + F*]	98	98.5	72.5	24	42
	F-S	1.5	1	22	74	–
	F-T	0.5	0.5	5.5	1	56
	F-E	–	–	–	1	2
VI-1	[F + F*]	96	97.5	75.5	1.5	91
	F-S	2	0.5	10	98	–
	F-T	2	1.5	11.5	0.5	6.5
	F-E	–	0.5	3	–	2.5
VII-1	[F + F*]	88.5	94.5	48	11	74.5
	F-S	10	4	44	88	–
	F-T	0.5	0.5	1	–	5.5
	F-E	1	1	7	1	20
VIII-2	[F + F*]	94	97.5	71	39	92.5
	F-S	4	0.5	21.5	60	–
	F-T	1	1	1.5	–	3
	F-E	1	1	6	1	4.5
VIII-1	[F + F*]	91	96	74	41	96
	F-S	8	3	22	57	–
	F-T	0.5	0.5	2	1	1.5
	F-E	0.5	0.5	2	1	2.5

\* Время облучения ( $\lambda$  303–313 нм) составляет три времени полужелтого света (см. [21]).

продуктов фотомодификации F-S, F-T и F-E в течение всего времени облучения. В этих случаях мы не можем точно определить, какая часть фотоаффинных реагентов израсходована, так как используемый метод детекции позволяет определять только сумму [F + F\*]. Возможно подсчитать только суммарный выход продуктов фотомодификации F-S, F-T и F-E к 10 мин облучения. Суммарное количество этих продуктов зависит от характера реагента F и колеблется в пределах 28–56% для хлорантрацена (III), 2–11% для пирена (I) и 1.5–5.5% для антрацена (II). Прямую сайт-специфическую фотомодификацию можно считать почти завершённой, поскольку известно, что при облучении в течение трех времен полужелтого света расходуется около 85% арилизидной компоненты. С точки зрения практики исследования элонгирующих комплексов ДНК-полимераз с помощью сенсibilизированной сайт-специфической фотомодификации, пиреновые и антраценовые флуорофоры малоперспективны вследствие низкого выхода продуктов фотопришивок. Вероятнее всего, это связано с низкой скоростью фотосенсibilизации реагентов F, но для большей достоверности необходимо разработать специальную систему детекции, позволяющую надежно отличать реагенты F от всех продуктов его фотореакций с

растворителем и низкомолекулярными компонентами реакционных смесей. Таким образом, из протестированных флуоресцентных групп по своим фотофизическим свойствам наиболее перспективны для исследования элонгирующих комплексов ДНК-полимераз производные хлорантрацена и перилена.

Основным изменением, наблюдаемым при переходе от прямой к сенсibilизированной фотомодификации, является появление новой группы продуктов фотоиндуцируемых реакций F-S и уменьшение в большинстве случаев эффективности образования фотопришивок к матрице F-T.

Существенное повышение эффективности фотопришивок праймеров к матрице наблюдается только в случае сенсibilизированной хлорантраценом (III) модификации в комплексе  $\text{Tr}(\text{F}_{\text{VI}}, \text{III})$ . Интерпретация этого эффекта затруднена, так как в него могут вносить вклад фотопришивки, обусловленные участием соединений  $\text{F}_{\text{ad}}$ , образовавшихся в результате дополнительной (~10%) элонгации  $\text{F}_{\text{VI}}$  аналогом (VI) (рис. 2, электрофореграмма B(U), стрелка F и две расположенные рядом полосы (стрелки  $\text{F}_{\text{ad}}$ ) соответственно).

Изменение направления фотомодификации может быть обусловлено множеством различных факторов.



Различие фотомодификаций в белково-нуклеиновых комплексах  $D(F)$  и  $Tr(F, S)$  может объясняться тем, что они отличаются по составу и структуре. Сайт-специфическую фотомодификацию в этих комплексах начинали после элонгации большей части  $5'$ - $^{32}P$ -меченого праймера фотореакционноспособными аналогами dCTP в условиях четырехкратного избытка фермента и полуторакратного избытка матрицы по отношению к праймеру при концентрации трифосфатов (I)–(V) в 10–100 раз ниже  $K_m$ . В таких условиях фотосшивки в комплексе  $D(F)$  должны происходить в основном в составе комплекса матрица–фотореагент–фермент, т.е. при свободном dNTP-связывающем кармане. При связывании сенсibilизаторов в dNTP-узлающем кармане в комплексах  $Tr(F, S)$  образуются надмолекулярные структуры, аналогичные по составу и структуре элонгирующему комплексу ДНК-полимеразы  $\beta$  на стадии, предшествующей нуклеотидилтрансферной реакции. Это может приводить к ряду значительных изменений в локализации и микроокружении арилизидных групп. В праймер-матричном комплексе  $D(F)$  эти группы присоединены к основанию  $3'$ -концевого dCMP праймера и способны перемещаться на длину линкера между искаженной большой бороздкой двухнитчатого фрагмента праймер-матрицы и заполненным молекулами воды dNTP-связывающим карманом. Связывание сенсibilизатора может приводить к уменьшению подвижности арилизидных групп и вызывать изменение в характере их микроокружения от протонного к апротонному. Такое изменение свойств среды благоприятствует образованию фотопришивок в результате реакций внедрения по C–H-, C–C- и N–H-связям, характерным для синглетных арилнитренов. Кроме изменения конформационной подвижности и характера микроокружения арилизидных групп, связывание сенсibilизаторов в dNTP-связывающем кармане может приводить к конформационным перестройкам в третичной структуре ДНК-полимеразы  $\beta$ , обычно предшествующим нуклеотидилтрансферной реакции. При этом возможно дополнительное изменение микроокружения и локализации арилизидных групп относительно матрицы и фермента.

При проведении сенсibilизированной фотомодификации важнейшее значение имеет параметр, называемый ферстеровским радиусом. Этот параметр фактически определяет максимальное расстояние между арилизидной и флуоресцентной группой, на котором можно ожидать эффективного переноса энергии или электрона между ними. Это свойство позволяет локализовывать все фотоиндуцируемые реакции в пределах исследуемого комплекса или даже его части в зависимости от ферстеровского радиуса выбранной донорно-акцепторной пары. Так, в отсутствие сенсibilизаторов реагенты  $F$  с одинаковыми скоростями

фотолизуются как в комплексах  $D(F)$ , так и в составе несвязанных с ферментом дуплексов фотореагент–матрица. При проведении фотомодификаций в присутствии сенсibilизаторов (III) и (IV) и облучении УФ-светом с  $\lambda > 380$  нм эти реакции проходят на несколько порядков медленнее, чем фотомодификации в составе комплексов  $Tr(F, S)$ . Наиболее ярко разница в направлении фотомодификации в присутствии и в отсутствие сенсibilизатора видна при использовании  $F_V$  (табл. 2). При облучении УФ-светом с  $\lambda$  303–313 нм в отсутствие сенсibilизатора образуются в основном фотосшивки  $F-T$ , а в составе комплекса  $Tr(F_V, IV)$  – в основном сенсibilизаторзависимые продукты фотомодификации  $F-S$ .

По-видимому, разница в ферстеровских радиусах (наряду с различием в механизме сенсibilизации) является одной из основных причин различий результатов фотомодификации, сенсibilизированных хлорантраценом (III) и периленом (IV). При сенсibilизации периленом (IV) направление реакции слабо зависит от природы используемого аналога dCTP. Подавляющая часть реагентов  $F$  расходуется на фотореакции, приводящие к продуктам  $F-S$ , а эффективность сенсibilизированных периленом (IV) фотопришивок праймеров к ДНК-полимеразе  $\beta$  ( $F-E$ ) не превышает 1% при использовании любого реагента  $F$  (табл. 2). Это позволяет предположить, что фотосенсibilизированные химические реакции арилизидных групп проходят из одной или нескольких точек, расположенных очень близко к этому сенсibilизатору в составе комплексов  $Tr(F, IV)$ .

При сенсibilизации хлорантраценом (III) наблюдается более сильная зависимость направления фотомодификации от используемого реагента  $F$ . При этом выход продуктов  $F-E$  и  $F-T$ , как правило, выше, чем при использовании перилена (IV) и их соотношение коррелирует с данными, полученными в комплексах  $D(F)$ . Это позволяет предполагать, что ферстеровские радиусы у донорно-акцепторных пар хлорантрацен–перфторарилазид существенно больше, чем у пар перилена–перфторарилазид.

С таким предположением согласуются и результаты по сенсibilизированной фотомодификации двух фотореагентов типа  $F_{VIII}$ , полученным при использовании п/м-1 ( $F_{VIII-1}$ ) и п/м-2 ( $F_{VIII-2}$ ). Эти фотоаффинные реагенты различаются тем, что в  $F_{VIII-1}$  рядом с несущим арилизидную группу  $3'$ -концевым dCMP располагается остаток dGMP, а в  $F_{VIII-2}$  – dAMP.

С учетом данных рентгеноструктурного анализа [8] можно ожидать, что эти предпоследние от  $3'$ -конца праймера нуклеотиды удалены от  $\gamma$ -фосфатов сенсibilизаторов не более чем на 15–17 Å и являются потенциальными мишенями для фотоиндуцируемых реакций арилизидных групп. Учи-



тывая, что гуанин наиболее реакционноспособен по отношению к синглетным арилнитренам, а аденин наиболее устойчив [17, 18], можно предположить, что замена гуанина на аденин приведет к изменению соотношения продуктов модификации. Действительно, как видно из табл. 2, такая замена приводит к увеличению количества фотопршивок праймера к ДНК-полимеразе  $\beta$  как при несенсибилизированной фотомодификации, так при сенсибилизированной хлорантраценом (III), но практически не влияет на результаты реакций, сенсибилизированных периленом (IV). Следовательно, можно предположить, что перилен (IV) не сенсибилизирует фотоиндуцированные реакции перфторарилазидов, локализованных около предпоследних от 3'-конца праймера нуклеотидов.

На основании полученных результатов можно сделать несколько основных выводов. Во-первых, хлорантраценовая и периленовая группы перспективны для использования в составе сенсибилизаторов для проведения фотомодификаций в составе комплексов ДНК-полимераз типа Tr(F, S) вблизи их каталитических центров с помощью фотоаффинных реагентов, несущих перфторарилазидные группы. При сенсибилизированной фотомодификации в комплексах Tr(F, S) ДНК-полимеразы  $\beta$  с использованием  $\gamma$ -N-замещенных флуоресцентных производных АТР в качестве сенсибилизаторов наблюдаются продукты F-S, отсутствующие при прямом фотолизе в праймер-матричном комплексе D(F). Вероятнее всего, это фотоиндуцированные пришивки праймеров к сенсибилизаторам.

Следует отметить, что данные, полученные при проведении представленной серии сенсибилизированных сайт-специфических фотомодификаций, согласуются с представлениями о трехмерной структуре тройных комплексов ДНК-полимеразы  $\beta$ , основанными на данных рентгеноструктурного анализа [10].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трифенилфосфин (Chemapol, Чехия), 4-(N,N-диметиламино)пиридин, DCC, перилен (Fluka, Швейцария). Остальные реактивы отечественного производства квалификации не ниже "ч.д.а.". Для аналитической и препаративной жидкостной хроматографии применяли сорбенты Polysil SA-500 (10–15 мкм) (Вектор, Кольцово, Россия), Sephadex G-10 и Sephadex A-25 (Pharmacia, Швеция), Dowex 50  $\times$  2 (Sigma, США), LiChrosorb RP-18 (5 мкм), LiChroprep RP-18 (15–20 мкм) и RP-8 (40–63 мкм) (Merck, ФРГ). Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, ФРГ).

Препараты АТР (Reanal, Венгрия) очищали анионообменной хроматографией на колонке 2.5  $\times$  40 см, наполненной сорбентом Sephadex A-25

в Cl<sup>-</sup>-форме, используя линейный градиент 0.003–0.4 М LiCl в 3 мМ HCl общим объемом 1 л.

Препаративную хроматографию проводили с помощью хроматографического комплекта Uvicord SD/Ultracor II (LKB, Швеция). Спектры ЯМР записывали на спектрометре AC-200 (Bruker, Германия) в D<sub>2</sub>O, рабочая частота 200.133 МГц (1H, стандарт – Me<sub>4</sub>Si), 81.015 МГц (<sup>31</sup>P, стандарт – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Приведены сдвиги в миллионных долях и КССВ (J) в герцах. УФ-спектры (H<sub>2</sub>O) записывали на спектрофотометре Specord M-40 (Karl Zeiss, Германия). Приведены  $\lambda$ , нм ( $\epsilon$ , M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Спектры флуоресценции записывали на флуориметре MPF-4 (Hitachi, Япония).

Производные (d)NTP, состав реакционных смесей и хроматографических фракций при синтезе сенсибилизаторов анализировали с помощью микроколоночной хроматографии (МКХ) на хроматографе Миллихром-4 (колонка 2  $\times$  62 мм, Polysil SA-500) в ступенчатом градиенте K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5) в 30% метаноле, общим объемом 2.5 мл (ступени K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, М/мл: 0/400, 0.1/400, 0.15/400, 0.2/400, 0.25/300, 0.3/200, 0.6/400) со скоростью 100 мкл/мин при многоволновой детекции. Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы "Chrom" (А.П. Зенков, НИИХ).

Облучение проводили светом ртутной лампы низкого давления ДРК-120 осветителем ОИ-18А (ЛОМО, Санкт-Петербург) на расстоянии 25 см через фильтры ЖС-3 и УФС-2 (полоса пропускания 303–313 нм, W 2  $\times$  10<sup>-5</sup> Вт/см<sup>2</sup>) и БС-8 (полоса пропускания 380–580 нм, W 1  $\times$  10<sup>-4</sup> Вт/см<sup>2</sup>). Мощность излучения лампы (W) определяли с помощью ферриоксалатного актинометра [19].

Синтез и свойства производных dСТР (V) и (VI)–(VIII) описаны в работах [20] и [21] соответственно. 1-Аминометилпирен синтезирован как описано в работе [7], 9-аминометилантрацен – в работе [4], 10-хлор-9-аминометилантрацен – в работе [5] и 3-аминометилперилен – в работе [6]. 2,2'-Дитио-бис(4,6-диметилпиридин), синтезированный как описано в работе [22], любезно предоставлен М.А. Подыминогиным (НИИХ).

**$\gamma$ -Пиренил-1-метил)амид АТР (I).** К 20 мкл 0.42 М раствора триэтиламмониевой соли АТР (8.4 мкмоль) в DMSO добавляли 80 мкл 0.25 М раствора DCC в DMSO и суспензию 4.6 мг (17 мкмоль) гидрохлорида пиренил-1-метиламина в 200 мкл DMSO. Смесью выдерживали при перемешивании в течение 1 ч и затем добавляли 3 мкл триэтиламина (21 мкмоль). Из реакционной смеси периодически отбирали аликвоты (40 мкл) и добавляли к ним 400 мкл 1% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Полученный осадок промывали охлажденным до 0°C ацетоном, высушивали, растворяли в воде и анализировали микроколоночной хроматографией как описано выше. Через 2 ч добавляли 10 мкл триэтиламина и 100 мкл 0.25 М DCC в DMSO, вы-

держивали реакционную смесь 3 ч при 50°C и 12 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь добавляли к 10-кратному объему 1% раствора  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне. Полученный осадок декантировали и дважды промывали 3 мл холодного ацетона. Полученную смесь литиевых солей нуклеотидов разделяли на хроматографической колонке (0.5 × 20 см, сорбент LichroPrep RP-18) в линейном градиенте 0–100% метанола в 0.01 М  $\text{LiClO}_4$  (общий объем 500 мл). Фракции, содержащие фосфамид (I), объединяли, концентрировали на ротационном испарителе до объема 1 мл, и полученный раствор добавляли к 20 мл предварительно охлажденного до –10°C ацетона. Полученный осадок трехлитиевой соли производного (I) дважды промывали 20 мл холодного ацетона. Выход амида (I) 2.6 мг (3.3 мкмоль, 40%). УФ-спектр: 243 (44000), 266 (21500), 277 (21500), 315 (7500), 329 (17000), 345 (24000), 376 (450).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 4.1–4.5 (м, 5H, H2', H3', H4', H5'), 5.43 (д, 1H, H1',  $J_{1,2}$  4), 6.97 (с, 1H, H2), 8.05–8.30 (м, 9H, H<sub>ар</sub>). Время удерживания при МКХ 14.8–15.0 мин.

**γ-(Антраценил-9-метил)амид АТР (II).** К 14 мкл 0.5 М раствора триэтиламмониевой соли АТР (10 мкмоль) в DMSO добавляли последовательно 200 мкл 0.1 М раствора 2,2'-дитио-бис(4,6-диметилпиримидина) в DMSO, 40 мкл 0.5 М раствора трифенилфосфина в DMSO и через 10 мин суспензию 9.8 мг (20 мкмоль) гидрохлорида антраценил-9-метиламина в 80 мкл DMSO. Через 1.5 ч реакционную смесь высаживали 10-кратным объемом 1% раствора  $\text{LiClO}_4$  в ацетоне. Выделение трифосфата (II) проводили аналогично очистке соединения (I). Выход литиевой соли производного (II) 1.85 мг (2.6 мкмоль, 37%). УФ-спектр: 254 (40000), 350 (1800), 368 (2600), 389 (2400).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 4.2–4.6 (м, 5H, H2', H3', H4', H5'), 5.45 (д, 1H, H1',

$J_{1,2}$  4.5), 7.45–7.6 (м, 4H, H2'', H3'', H6'', H7''), 7.98 (д, 2H, H4'', H5'',  $J_{4'',3''} = J_{5'',6''} = 9.0$ ), 8.13 (с, 1H, H8), 8.3–8.4 (м, 3H, H1'', H8'', H10''). Время удерживания при МКХ 12.1–12.2 мин.

**γ-(10-Хлорантраценил-9-метил)амид АТР (III).** Синтез и выделение продукта (III) проводили как описано для соединения (II) с той разницей, что вместо гидрохлорида антраценил-9-метиламина добавляли гидрохлорид 10-хлорантраценил-9-метиламина. Выход литиевой соли производного (III) 1.8 мг (2.4 мкмоль, 34%). УФ-спектр: 258 (42000), 359 (3400), 379 (5000), 400 (4800).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 4.2–4.55 (м, 5H, H2', H3', H4', H5'), 5.36 (д, 1H, H1',  $J_{1,2}$  4.5), 7.6–7.7 (м, 4H, H2'', H3'', H6'', H7''), 7.7 (с, 1H, H2), 8.11 (с, 1H, H8), 8.35–8.55 (м, 4H, H1'', H4'', H5'', H8''). Время удерживания при МКХ 12.6–12.8 мин.

**γ-(Периленил-3-метил)амид АТР (IV).** Синтез и выделение продукта (IV) проводили как описано для соединения (I) с той разницей, что вместо гидрохлорида пиренил-1-метиламина добавляли гидрохлорид периленил-3-метиламина. Выход литиевой соли фосфамида (IV) 1 мг (1.3 мкмоль, 15%). УФ-спектр: 255 (30000), 417 (19200), 444 (24600).  $^1\text{H}$ -ЯМР: 4.05–4.55 (м, 5H, H2', H3', H4', H5'), 5.47 (д, 1H, H1',  $J_{1,2}$  3.5), 7.26 (с, 1H, H2), 7.50–7.65 (м, 4H, H2'', H5'', H8'', H11''), 7.80 (д, 2H, H9'', H10''  $J_{7'',6''} = J_{8'',9''} = 8$ ), 7.89 (д, 1H, H4'',  $J_{2'',3''} = 8$ ), 7.91 (с, 1H, H8), 8–8.25 (м, 4H, H1'', H6'', H7'', H12''). Время удерживания при МКХ 22.5–23.0 мин.

Описание процедур получения препаратов рекомбинантной ДНК-полимеразы крысы, 5'- $^{32}\text{P}$ -меченых праймеров, а также элонгации праймеров экзо-*N*-замещенными производными dCTP (V)–(VIII) описаны в предыдущем сообщении [1].

Для получения *in situ* фотоаффинных реагентов использовали две праймер-матричные системы:

п/м 1 –

матрица (3')d(CCATCCCCGATATGTCGTCTTGTGCTATAGCTTGG),

праймер (5')d(GGTAGGGGCTATACAG);

п/м 2 –

матрица (3')d(CCATCCCCGATATGTTGTCCGTAAGCTATAGCTTGG),

праймер (5')d(GGTAGGGGCTATACAA).

**Сенсибилизированная модификация комплексов ДНК-полимеразы β.** После элонгации праймеров аналогами dCTP к реакционным смесям добавляли одно из производных АТР (I)–(IV) до концентрации 100 мкМ, помещали в лед и облучали светом с длиной волны более 380 нм (1, 3 и 10 мин). В отдельных экспериментах контролировали включение сенсибилизаторов в праймеры, а также скорость и эффективность прямой фотомодификации комплексов при облучении светом с длиной волны более 380 нм (1, 3 и 10 мин) и 303–313 нм в течение 0.5, 1 и 3 времен полуфотолитиза (времена полуфотолитиза аналогов dCTP были определены в

работе [21] и составляют: (V) – 10 мин, (VI) – 30 с, (VII) – 1 мин, (VIII) – 10 с). Для анализа продуктов фотопришивки 5'- $^{32}\text{P}$ -меченых праймеров к матрице из реакционных смесей отбирали аликвоты объемом 5 мкл и анализировали электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ с 7 М мочевиной [15] с последующей радиоавтографией. Для анализа продуктов аффинного фотомечения ДНК-полимеразы β отбирали 15 мкл смеси и анализировали электрофорезом в 12.5% ПААГ по Лэммли [16] с последующей автордиографией. Затем проводили количественную обработку как описано в предыдущем сообщении [1].



Настоящая работа поддержана грантами РФФИ № 98-03-32958, № 99-04-49277, № 99-04-04016, № 00-04-22002 и INTAS 96-1778, а также программой "Университеты России" (грант № ЗН-346-00).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Драчкова И.А., Петрусева И.О., Сафронов И.В., Захаренко А.Л., Шишкин Г.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. // *Биоорган. химия*. 2001. Т. 27. С. 197–204.
2. Kolpashchikov D.M., Rechkinova N.I., Dobrikov M.I., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Lavrik O.I. // *FEBS Lett*. 1999. V. 448. P. 141–144.
3. Речкунова Н.И., Колпащиков Д.М., Лебедева Н.А., Петрусева И.О., Добриков М.И., Дегтярев С.Х., Лаврик О.И. // *Биохимия*. 2000. Т. 65. С. 291–297.
4. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Иванова Т.М., Власов В.В. // *Биоорган. химия*. 1999. Т. 25. С. 137–146.
5. Добриков М.И., Гайнутдинов Т.И., Иванова Т.М., Власов В.В. // *Биоорган. химия*. 2000. Т. 26. С. 617–622.
6. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Гайнутдинов Т.И., Тенетова Е.Д., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорган. химия*. 1999. Т. 25. С. 31–39.
7. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Гайнутдинов Т.И., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 191–199.
8. Pelletier H., Sawaya M.R., Kumar A., Wilson S.H., Kraut J. // *Science*. 1994. V. 264. P. 1891–1903.
9. Dobrikov M.I., Bichenkova E.V., Douglas K.D., Gainutdinov T.I., Vlassov V.V. // *J. Biomol. Struct. Dyn*. 1999. V. 17. P. 213–221.
10. Arzumanov A.A., Semizarov D.G., Victorova L.S., Dyatkina N.B., Kravevsky A.A. // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. P. 24389–24394.
11. Knorre D.G., Alekseyev P.V., Gerassimova Y.V., Silnikov V.N., Godovikova T.S. // *Nucleosides Nucleotides*. 1998. V. 17. P. 397–410.
12. Dobestani R., Ivanov I.N. // *Photochem. Photobiol*. 1999. V. 70. P. 10–34.
13. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Кошкин А.А., Лукьянчук Н.П., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 553–560.
14. Добриков М.И., Гайдамаков С.А., Шишкин Г.В., Власов В.В. // *Биоорган. химия*. 1998. Т. 24. С. 831–838.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
17. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Шишкин Г.В. // *Биоорган. химия*. 1996. Т. 22. С. 191–199.
18. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Левина А.С., Халимская Л.М., Шишкин Г.В. // *Биоорган. химия*. 1996. Т. 22. С. 200–207.
19. Калверт Дж., Питтс Дж. // *Фотохимия: Пер. с англ.* М.: Мир, 1968. С. 625–627.
20. Wlassoff W.A., Dobrikov M.I., Safronov I.V., Dudko R.Y., Bogachev V.S., Kandaurova V.V., Shishkin G.V., Dumshits G.M., Lavrik O.I. // *Bioconjug. Chem*. 1995. V. 6. P. 352–360.
21. Сафронов И.В., Шербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Шишкин Г.В., Лаврик О.И. // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 576–585.
22. Field L., Lawson J.E. // *J. Amer. Chem. Soc*. 1958. V. 80. P. 838–841.

### Reagents for Modification of Protein–Nucleic Complexes.

### III. Site-Specific Photomodification of Elongation Complex of DNA Polymerase $\beta$ with Arylazide Derivatives of Primers Sensitized with Fluorescent ATP $\gamma$ -Amides

I. V. Safronov<sup>#</sup>, I. A. Drachkova<sup>\*\*</sup>, I. O. Petrusheva<sup>\*</sup>, S. N. Khodyreva<sup>\*,\*\*</sup>, M. I. Dobrikov<sup>\*</sup>, T. M. Ivanova<sup>\*</sup>, G. V. Shishkin<sup>\*</sup>, and O. I. Lavrik<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>\*</sup>*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, pr. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>\*\*</sup>*Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia*

ATP  $\gamma$ -amides containing in  $\gamma$ -N-position 1-methylpyrene, 9-methylanthracene, 10-chloro-9-methylanthracene, and 3-methylperylene residues were synthesized and characterized. These compounds were used as sensitizers of site-specific photomodification of the reconstituted elongating complex of the mammalian DNA polymerase  $\beta$ . The photomodification was carried out with the use of photoaffine reagents, which were synthesized *in situ* by the 5'-<sup>32</sup>P-labeled primers extension with photoactive analogues of dCTP containing in the *exo*-N-position of cytosine various perfluoroarylazide groups. The effect of structures of the sensitizers and photoactive reagents on the efficiency and selectivity of photolinking of primers to the enzyme and template, as well as formation of a number of other photomodification products was studied. It was shown that the sensitizers containing 10-chloro-9-methylanthracene and 3-methylperylene residues allow preparation of photolinks in such irradiation conditions when photomodification in their absence is not essentially observed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* anthracene, pyrene, perylene, perfluoroazide, DNA polymerase  $\beta$ , affinity modification

<sup>#</sup> *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (3832) 333-762; e-mail: safron@niboch.nsc.ru.*