



УДК 547.963.057:577.325

## ФОТОАКТИВНЫЕ АНАЛОГИ dTTP КАК СУБСТРАТЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ИЗ *Thermus thermophilus* В35

© 2004 г. Н. А. Лебедева\*, Н. И. Речкунова\*\*#, С. В. Дежуров\*,  
С. Х. Дегтярев\*\*, О. И. Лаврик\*

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

\*\*Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН, Новосибирск

Поступила в редакцию 04.03.2003 г. Принята к печати 12.05.2003 г.

Изучены субстратные свойства ряда аналогов dTTP – NAB- $\chi$ -dUTP, где  $\chi = 2, 4, 7-13$  и означает количество атомов в цепи линкера, соединяющего фотореакционноспособную 2-нитро-5-азидобензоильную группу (NAB) с 5-м положением урацила. Все аналоги являются субстратами для ДНК-полимеразы из *Thermus thermophilus* В35 в реакции удлинения 5'-<sup>32</sup>P-меченого праймера в комплексе с матрицей. Определены кинетические параметры некоторых аналогов в сравнении с природным dTTP. Показано, что субстратная эффективность аналогов возрастает по мере увеличения длины линкера. Включение в 3'-конец праймера остатков NAB- $\chi$ -dUMP не приводит к ингибированию дальнейшего удлинения цепи в присутствии природных dNTP.

Ключевые слова: фотоактивные аналоги dTTP, термостабильная ДНК-полимераза.

### ВВЕДЕНИЕ

Метод аффинной модификации с использованием фотоактивных аналогов dNTP, содержащих реакционноспособную группу, связанную линкерами разной длины с гетероциклическим основанием, широко применяется для изучения белок-нуклеиновых взаимодействий [1], в том числе dNTP-связывающих участков ДНК-полимераз [2]. Основное преимущество применения фотоактивных реагентов вместо аффинных реагентов других типов связано с тем, что фотореагенты до облучения светом инертны и фотосоединение может быть индуцировано после формирования правильного комплекса биополимер-реагент. Кроме того, можно варьировать скорость фотохимической реакции путем изменения мощности облучения.

Особенности фотохимического поведения 2-нитро-5-азидобензоильной (NAB) группы позволяют проводить активацию светом с длиной волны более 300 нм, т.е. вне области собственного поглощения белков и нуклеиновых кислот, что позволяет проводить облучение без существенной фотоинактивации биополимеров. Кроме того, эта группа эффективно модифицирует белки [3, 4] и относительно слабо реагирует с ДНК [3, 5]. Аналоги dTTP, содержащие 4-азидобензоильный ос-

таток, соединенный линкерами разной длины с 5-м положением урацила, были синтезированы ранее и применены для изучения взаимодействия фактора транскрипции TFIIIB с ДНК [1]. Ранее было показано, что NAB-4-dUTP служит хорошим субстратом для обратной транскриптазы ВИЧ-1 [6], эукариотических ДНК-полимераз  $\alpha$  и  $\beta$ , а также фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E. coli* [4]. К настоящему времени синтезирован ряд фотоактивных производных dUTP, содержащих NAB-группу, соединенную линкерами разной длины с 5-м положением урацила. NAB- $\chi$ -dUTP применялись для изучения взаимодействий ДНК-полимеразы  $\beta$  и субъединиц гетеротримерного репликативного белка А человека с частичным ДНК-дуплексом, содержащим выступающий 5'-конец праймерной цепи [7–9]. Однако до настоящего времени не было проведено систематического изучения субстратных свойств данных аналогов для ДНК-полимераз.

В данной работе для изучения субстратных свойств нитроаналогов dNTP нами была выбрана ДНК-полимераза из экстремально термофильной бактерии *Thermus thermophilus* В35 (*Te*-полимераза, КФ 2.7.7.7). Термостабильные ДНК-полимеразы являются интересными объектами для изучения точности репликации ДНК, поскольку способны обеспечивать высокую специфичность синтеза ДНК при экстремально высоких температурах. Установление закономерностей функци-

# Автор для переписки (тел.: (383-2) 34-42-96; факс: (3832) 333-677; эл. почта: nadyarec@niboch.nsc.ru).

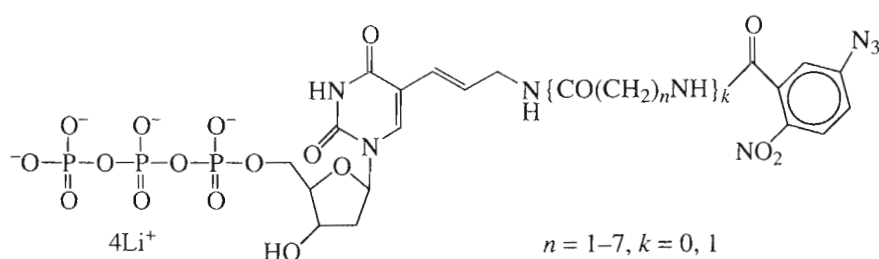
онирования этих ферментов необходимо для понимания механизма репликации ДНК вообще и, в частности, для выяснения влияния условий реакции на специфичность процесса отбора dNTP. Интерес к термостабильным ферментам усилен тем обстоятельством, что они относительно хорошо кристаллизуются, поэтому некоторые закономерности механизма функционирования в растворе могут быть сопоставлены с данными рентгеноструктурного анализа [10].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одно из наиболее существенных преимуществ арилизидопроизводных нуклеиновых кислот –

возможность изменения длины линкера, соединяющего фотоактивную группу с гетероциклическим основанием нуклеиновой кислоты. Это может оказаться полезным при изучении белкового окружения не только в непосредственной близости от нуклеиновой кислоты, но и на значительном расстоянии.

В данной работе изучены субстратные свойства синтезированных ранее [7] фотоактивных аналогов dNTP (NAV-*x*-dUTP), в которых реакционноспособная нитроазидобензойная группа присоединена к урацилу линкерами различной длины. Структура 5-(NAV-*x*)-2'-дезоксуридин-5'-трифосфатов ( $x = 4, 7-13$ ) может быть задана общей формулой:



$k = 0$ , NAV-4 – *N*-(2-нитро-5-азидобензоил)-*транс*-3-аминопропенил;

$k = 1, n = 1$ , NAV-7 – *N*-(*N*'-(2-нитро-5-азидобензоил)глицил)-*транс*-3-аминопропенил;

$k = 1, n = 2$ , NAV-8 – *N*-(*N*'-(2-нитро-5-азидобензоил)-3-аминопропионил)-*транс*-3-аминопропенил;

$k = 1, n = 3$ , NAV-9 – *N*-(*N*'-(2-нитро-5-азидобензоил)-4-аминобутирил)-*транс*-3-аминопропенил;

$k = 1, n = 4$ , NAV-10 – *N*-(*N*'-(2-нитро-5-азидобензоил)-5-аминопентаноил)-аминопропенил;

$k = 1, n = 5$ , NAV-11 – *N*-(*N*'-(2-нитро-5-азидобензоил)-6-аминогексаноил)-*транс*-3-аминопропенил;

$k = 1, n = 6$ , NAV-12 – *N*-(*N*'-(2-нитро-5-азидобензоил)-7-аминогептаноил)-*транс*-3-аминопропенил;

$k = 1, n = 7$ , NAV-13 – *N*-(*N*'-(2-нитро-5-азидобензоил)-8-аминооктаноил)-*транс*-3-аминопропенил.

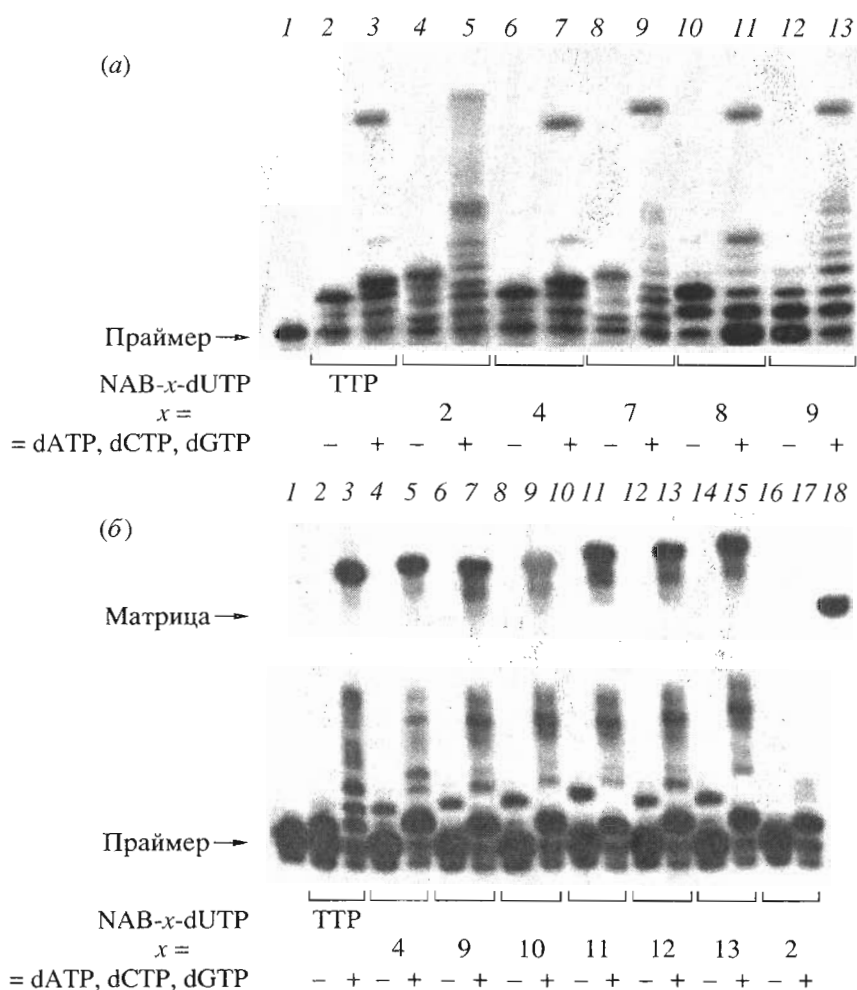
NAV-2-dUTP – 5-[*N*-(2-нитро-5-азидобензоил)аминометил]-2'-дезоксуридин-5'-трифосфат – синтезирован по другой схеме и не соответствует общей формуле.

Мы исследовали зависимость способности *Tte*-полимеразы встраивать комплементарные матрице дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (dTTP и NAV-*x*-dUTP) от концентрации фермента и субстрата, а также от времени реакции.

Из рисунка, демонстрирующего результаты электрофоретического разделения продуктов реакции, катализируемой 500 и 10 нМ *Tte*-полимеразой в присутствии только одного из аналогов

NAV-*x*-dUTP или природного dTTP (четные дорожки), а также с добавлением недостающих трех dNTP (нечетные дорожки), видно, что удлинение <sup>32</sup>P-меченого праймера наблюдается в присутствии каждого из исследованных NAV-*x*-dUTP. В реакционной смеси, содержащей аналог и три недостающих природных dNTP, происходит образование радиоактивного продукта, соответствующего по длине полной достройке праймера, так же как и в случае использования всех четырех природных dNTP (рисунок, дорожка 3). Из рисунка а также видно, что при концентрации фермента 500 нМ, помимо специфического удлинения праймера на одно звено (встраивание комплементарного матрице нуклеотида), наблюдаются дополнительные продукты, соответствующие ошибочному включению остатков dNMP, причем эти продукты присутствуют как в случае использования природного dTTP, так и аналогов.

Как видно из рисунка б, при концентрации фермента 10 нМ в 3'-конец праймера встраивается только один нуклеотидный остаток, комплементарный матрице. При полной достройке праймера в присутствии одного из аналогов NAV-*x*-dUTP ( $x = 7-13$ ) и трех недостающих природных dNTP наблюдается понижение электрофоретической подвижности праймеров в денатурирующем ПААГ с увеличением длины линкерной группы, что может быть объяснено увеличением эффективного размера этих праймеров.



Электрофоретическое разделение продуктов реакции, катализируемой *Tte*-ДНК-полимеразой при ее концентрации 500 (а) и 10 нМ (б). Дорожки 1 – праймер 16-мер без добавления dNTP, дорожка 18 (б) – матрица 36-мер. Реакционные смеси, содержащие 0.1 мкМ дуплекс [<sup>32</sup>P]праймер–матрица, 10 мкМ аналог dTTP и *Tte*-полимеразу, а также стандартные компоненты буфера (см. “Эксперимент. часть”), инкубировали в течение 15 мин при 65°C. Условия разделения: 20% ПААГ (акриламид–бисакриламид = 20 : 1) с 8 М мочевиной.

Помимо этого, мы исследовали зависимость удлинения праймера от времени и от концентрации dTTP. Было выявлено, что увеличение концентрации dTTP до 75 мкМ приводит к появлению

продуктов неспецифического (не комплементарного матрице) удлинения праймера. В работе [11] показано, что при сильном преобладании или недостатке в реакционной смеси одного из дезокси-

**Таблица 1.** Субстратные свойства аналогов dTTP в реакции, катализируемой *Tte*-полимеразой

Субстрат	dTTP	НАВ- <i>x</i> -dUTP при <i>x</i> , равном								
		2	4	7	8	9	10	11	12	13
Продукт удлинения праймера на одно звено, %*	85 ± 15	9 ± 2	48 ± 7	42 ± 12	50 ± 14	63 ± 13	57 ± 11	69 ± 13	84 ± 14	76 ± 5
Полноразмерный продукт, %*	70 ± 12	5 ± 1	30 ± 3	25 ± 12	29 ± 9	32 ± 6	26 ± 8	24 ± 10	43 ± 11	61 ± 7

\* По отношению к полному количеству праймера в реакционной смеси приведены средние значения, полученные из трех независимых измерений.

**Таблица 2.** Значения кинетических параметров для dTTP и аналогов в реакции, катализируемой *Tte*-полимеразой

Аналоги TTP	$K_m$ , мкМ	$V_{max}$ , нМ/мин	$V_{max}/K_m$ , мин <sup>-1</sup>
dTTP	$2.0 \pm 0.6$	60	$3 \times 10^{-2}$
NAV-2-dUTP	$40 \pm 13$	2	$5 \times 10^{-5}$
NAV-4-dUTP	$5.5 \pm 1.6$	27	$4.9 \times 10^{-3}$
NAV-9-dUTP	$0.3 \pm 0.05$	14	$4.7 \times 10^{-2}$
FAB-4-dUTP	$8.3 \pm 2.7$	64	$7.7 \times 10^{-3}$
FAB-9-dUTP	$1.3 \pm 0.4$	27	$2.1 \times 10^{-2}$

нуклеозид-5'-трифосфатов по сравнению с другими, ДНК-полимеразы могут вести синтез продукта, некомплементарного матрице. При концентрации *Tte*-полимеразы 10 нМ найдено, что время реакции 15 мин соответствует времени полупревращения праймера в продукт удлинения на одно звено для большинства аналогов dTTP.

Данные по субстратным свойствам аналогов dTTP представлены в табл. 1. Можно видеть, что введение заместителя по 5-му положению основания (кроме соединения с  $x = 2$ ) практически не влияет на способность аналога присоединяться к 3'-концу праймера, однако несколько затрудняется дальнейшее включение остатков dNMP в растущую цепь. Также нетрудно видеть, что по мере увеличения длины линкера способность аналога встраиваться приближается к эффективности природного dTTP. Низкую активность включения NAV-2-dUTP можно объяснить стерическими препятствиями, которые возникают из-за объемного заместителя и короткого линкера.

Таким образом, все аналоги (NAV- $x$ -dUTP) являются субстратами в реакции полимеризации ДНК, катализируемой *Tte*-ДНК-полимеразой, и незначительно терминируют синтез ДНК после включения их в растущую цепь.

Для более детального изучения взаимодействия dNTP с ДНК-полимеразой *Tte* в полимеразной реакции мы использовали кинетические подходы, то есть проводили количественную оценку значений кинетических констант ( $K_m$  и  $V_{max}$ ) для dNTP в присутствии матрично-праймерного комплекса. Были определены кинетические параметры для NAV-2-dUTP, NAV-4-dUTP и NAV-9-dUTP как субстратов в реакции удлинения праймера на один шаг. Для сравнения были измерены  $K_m$  и  $V_{max}$  для перфторариазидных аналогов dTTP, содержащих линкер такой же длины, как и нитроари-

лазидные производные dTTP, а также для природного dTTP. Все данные представлены в табл. 2.

Как известно, при определенных допущениях, константа Михаэлиса  $K_m$  отражает сродство субстрата к ферменту и отражает прочность фермент-субстратного комплекса [12]. Из табл. 2 видно, что для NAV-2-dUTP  $K_m$  на порядок больше, чем для других аналогов dUTP и природного dTTP, а  $V_{max}$  значительно ниже, следовательно, NAV-2-dUTP является малоэффективным субстратом для *Tte*-ДНК-полимеразы. Возможно, из-за короткого спейсера, несущего объемный заместитель, возникают стерические препятствия для образования каталитически компетентного комплекса этого аналога с *Tte*-полимеразой.

Что касается остальных аналогов dTTP,  $K_m$  для некоторых из них либо на порядок ниже, либо почти такая же, как для природного dTTP (в пределах ошибки). То есть присоединение гидрφοфобного заместителя по 5-му положению основания с помощью линкера длиной более чем в одно метиленовое звено, практически не влияет на взаимодействие с ферментом, а в некоторых случаях даже увеличивает сродство аналога (NAV-9-dUTP) к ферменту. Возможно, это происходит за счет дополнительных гидрофобных взаимодействий между аналогом и ДНК-полимеразой, где, скорее всего, не последнюю роль играет "гидрофобный карман" ДНК-полимеразы, расположенный вблизи активного центра фермента. В то же время максимальная скорость реакции для большинства аналогов dTTP значительно меньше, чем для природного dTTP. Это свидетельствует о том, что на каталитических стадиях реакции, когда происходит формирование переходного состояния, окончательная подгонка субстрата к активному центру фермента стерически затруднена из-за присутствия объемного заместителя в азотистом основании.

Сравнение эффективности аналогов dTTP в качестве субстратов *Tte*-полимеразы, определенной как  $V_{max}/K_m$ , показало, что субстратные свойства большинства исследованных аналогов близки к свойствам природного dTTP, за исключением NAV-2-dUTP, демонстрирующего низкую субстратную активность. Практически все исследованные аналоги не терминируют дальнейшее включение остатков нуклеотидов в растущую цепь ДНК, а аналоги, содержащие достаточно длинный линкер, являются более эффективными субстратами для *Tte*-полимеразы. Это свойство аналогов может быть использовано для получения фотореакционноспособных ДНК, в том числе с помощью ПЦР. Ранее NAV-4-dUTP был использован для амплификации ДНК с помощью ДНК-полимеразы *Taq* [13] с последующим применением полученной фотореакционноспособной ДНК в качестве зонда для локализации определенных нукле-

отидных последовательностей в реплицируемой хромосоме [14].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы нерадиоактивные dNTP и T4-полинуклеотидкиназа (Сибэнзим, Россия), [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТР (Биосан, Россия), реактивы для электрофорезов и основные компоненты буферов (Sigma, США). Остальные реагенты отечественного производства имели квалификацию "ос. ч." или "х. ч."

Рекомбинантную ДНК-полимеразу *Tte* выделяли из штамма *E. coli*, несущего плазмиду pGTTE, содержащую ген термостабильной ДНК-полимеразы, как описано ранее в работе [15]. Матрица (5')GGTTCGATATCGTTGTTCCACTGTATAGCCCTACC и праймер (5') GGTAGGGGCTATA-CAG синтезированы в Новосибирском институте биоорганической химии СО РАН. Фотореакционноспособные аналоги dTTP (NAV-x-dUTP) синтезированы согласно [7] и любезно предоставлены Д.М. Колпащиковым.

Введение радиоактивной метки в 5'-конец олигонуклеотида проводили по методике, описанной в [16]. Меченые олигонуклеотиды очищали с помощью электрофореза согласно [17]. Гибридизацию праймера и матрицы в эквимольном соотношении проводили при комнатной температуре в течение 5 мин.

**Определение субстратных свойств аналогов.** Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.1 мкМ комплекс матрица – [ $5'$ - $^{32}$ P]праймер, 10 мкМ dTTP (или NAV-x-dUTP), 10 либо 500 нМ *Tte*-полимеразу, а также стандартные компоненты буфера: 50 мМ Трис-НСl, рН 9.0 (при 25°C), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Инкубацию проводили в течение 15 мин при 65°C. Для получения полностью удлиненного праймера в реакционную смесь добавляли dATP, dCTP и dGTP в концентрации 10 мкМ (по каждому dNTP). Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях, как описано ранее [16], с последующей радиоавтографией. Полосы, соответствующие продуктам удлинения праймера, вырезали и просчитывали по Черенкову на сцинтилляционном счетчике.

**Определение кинетических параметров для dTTP и его аналогов.** Реакционные смеси (10 мкл) содержали стандартные компоненты буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 9.0 (при 25°C), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>), 0.5 мкМ дуплекс матрица – [ $5'$ - $^{32}$ P]праймер, 0.01 мкМ *Tte*-полимеразу, 0.05–50 мкМ dTTP (или его аналог). Смеси инкубировали в течение 6 мин при 65°C. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях, как описано ранее [16], с последующей радиоавтографией. Участки геля, соответствующие ис-

ходному или удлиненному праймеру, вырезали и просчитывали по Черенкову. Значения кинетических параметров определяли по уравнению Михаэлиса–Ментен с помощью программы Microcal Origin (Microcal Software, США).

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 01-04-48861, 02-04-48404).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Persinger J., Bartolomew B. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 33039–33046.
2. Кнорре Д.Г., Кудряшова Н.В., Лаврик О.И. // *Успехи химии.* 1998. Т. 67. С. 486–502.
3. Шербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Дымищ Г.М., Лаврик О.И. // *Молекуляр. биология.* 1997. Т. 31. С. 344–352.
4. Lavrik O.I., Nasheuer H.P., Weisshart K., Wold M.S., Prasad R., Beard W.A., Wilson S.H., Favre A. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 602–607.
5. Добриков М.И., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // *Биоорг. химия.* 1992. Т. 18. С. 1190–1198.
6. 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.
7. Kolpashchikov D.M., Ivanova T.M., Boghachev V.S., Nasheuer H.P., Weisshart K., Favre A., Pstryakov P.E., Lavrik O.I. // *Bioconjug. Chem.* 2000. V. 11. P. 445–451.
8. Lavrik O.I., Kolpashchikov D.M., Weisshart K., Nasheuer H.P., Khodyreva S.N., Favre A. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. P. 4235–4240.
9. Kolpashchikov D.M., Khodyreva S.N., Khlimanov D.Y., Wold M.S., Favre A., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. 373–379.
10. Kim Y., Eom S.H., Wang J., Lee D.S., Suh S.W., Steitz T.A. // *Nature.* 1995. V. 376. P. 612–616.
11. Cariello N.F., Thilly W.G., Swenberg J.A., Skopek T.R. // *Gene.* 1991. V. 99. P. 105–108.
12. Podust V.N., Korobeinicheva T.O., Nevinsky G.A., Levina A.S. // *Mol. Biol. Reports.* 1990. V. 14. P. 247–249.
13. Godovikova T.S., Kolpashchikov D.M., Orlova T.N., Richter V.A., Ivanova T.M., Grochovsky S.L., Nasedkina T.V., Victorova L.S., Poletaev A.I. // *Bioconjug. Chem.* 1999. V. 10. P. 529–537.
14. Наседкина Т.В., Мальков Р.В., Федорова Л.И., Годовикова Т.С., Колпащиков Д.М., Поletaев А.И. // *Цитология.* 1998. Т. 40. С. 763–767.
15. Акишев А.Г., Речкунова Н.И., Лебедева Н.А., Лаврик О.И., Дегтярев С.Х. // *Биохимия.* 1999. Т. 64. С. 1536–1543.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N. Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
17. Ямищев В.Ф. // *Методы молекулярной генетики и геной инженерии* / Ред. Салганик Р.И. М.: Наука, 1990. С. 112–114.

## Photoreactive dTTP Analogues as Substrates for Thermostable DNA Polymerase from *Thermus thermophilus* B35

N. A. Lebedeva\*, N. I. Rechkunova\*#, S. V. Dezhurov\*,  
S. Kh. Degtyarev\*\*, and O. I. Lavrik\*

# Phone: +7 (3832) 34-4296; fax: +7 (3832) 33-4677; e-mail: nadyarec@niboch.nsc.ru

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

\*\* Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Division,  
Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

Substrate properties of several dTTP analogues bearing a photoreactive 2-nitro-5-azidobenzoyl (NAB) group attached at position 5 of uracil through linkers of various lengths, dTTP-NAB-*x*-dUTP (where *x* = 2, 4, 7–13 is the number of atoms in the linker), were studied. All the analogues are substrates for thermostable *Thermus thermophilus* B35 DNA polymerase in the elongation reaction of the 5'-<sup>32</sup>P-labeled primer-template complex. The kinetic parameters of some of the analogues were determined and compared with those of natural dTTP. It was shown that an increase in the linker length results in a higher efficiency of the analogue. The incorporation of NAB-*x*-dUMP residues into the 3'-primer end did not impede a further elongation of the chain in the presence of natural dNTP. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* photoreactive dTTP analogues, thermostable DNA polymerase