



УДК 577.113.3

## ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ 5'-О-ФОСФОНИЛМЕТИЛТИМИДИНА И ЕГО ВКЛЮЧЕНИЕ В ДНК КЛЕТОК HeLa

© 1998 г. М. В. Ясько<sup>#</sup>, Г. В. Сидоров\*, Р. В. Кондратов,  
В. С. Прасолов, Н. Ф. Мясоедов\*, А. А. Краевский

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117984, Москва, ул. Вавилова, 32;

\*Институт молекулярной генетики РАН, Москва

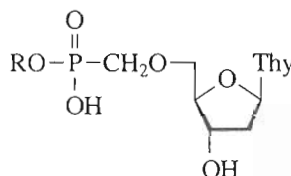
Поступила в редакцию 03.03.97 г. Принята к печати 05.08.97 г.

<sup>3</sup>H-Меченый 5'-О-фосфонилметилтимидин с удельной активностью 71 Ки/ммоль получен методом изотопного обмена. При его инкубации в культуре клеток HeLa были идентифицированы <sup>3</sup>H-меченые 5'-О-(β-фосфорил-α-фосфонилметил)тимидин, 5'-О-(β,γ-дифосфорил-α-фосфонилметил)тимидин и [<sup>3</sup>H]ДНК, что доказывает способность 5'-О-фосфонилметилтимидина фосфорилироваться в клетках человека и включаться в ДНК.

*Ключевые слова:* <sup>3</sup>H-меченый 5'-О-фосфонилметилтимидин, фосфорилирование, клетки.

Недавно нами сообщалось, что 5'-О-(β,γ-дифосфорил-α-фосфонилметил)тимидин (Ia) является эффективным субстратом ДНК-полимеразы α, но не узнается ДНК-полимеразами β и ε человека [1]. Таким образом, соединение (Ia) оказалось полезным для дискриминации этих близких по свойствам ферментов. Позднее было также показано, что аналог трифосфата (Ia) не является субстратом ДНК-полимеразы δ человека, но включается в цепь ДНК при катализе синтеза ДНК комплексом этого фермента с PCNA [2]. Это наблюдение позволило показать, что ДНК-полимераза δ, не связанная в комплексе с PCNA, проявляет более высокую точность копирования ДНК, чем в комплексе с PCNA [2]. Однако все исследования с веществом (Ia) могут проводиться лишь в бесклеточных системах, поэтому внутриклеточное фосфорилирование его предшественника (Iб) было бы существенно для его применения в изучении роли индивидуальных ДНК-полимераз при синтезе ДНК в репликативной вилке в клетке. Здесь мы описываем получение <sup>3</sup>H-меченого 5'-О-фосфонилметилтимидина (Iб), его внутриклеточное фосфорилирование до 5'-О-(β,γ-дифосфорил-α-фосфонилметил)тимидина (Ia) и вклю-

чение в ДНК в культуре клеток HeLa. В качестве контроля использовался <sup>3</sup>H-меченый тимидин.



(Ia) R = H<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P<sub>2</sub>; (Iб) R = H; (Iв) R = H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>P

Твердофазная реакция изотопного обмена для введения трития в исходный фосфонат (Iб) проводилась по методике, применявшейся для <sup>3</sup>H-меченного 5'-фосфата тимидина [3]. Выход продукта реакции сильно зависел от температуры. Данные табл. 1 показывают, что, хотя при увеличении температуры удельная активность получаемого фосфоната ([<sup>3</sup>H]Iб) слегка увеличивается, его выход резко падает. Поэтому далее мы не использовали температуру выше 150° С.

Методом ЯМР показано, что примерно 90% трития в фосфонате ([<sup>3</sup>H]Iб) локализовано в 5-СН<sub>3</sub>-группе тимина; в среднем в одной молекуле содержится 2.4 атома трития.

Для опытов по внутриклеточному фосфорилированию фосфоната ([<sup>3</sup>H]Iб) и [<sup>3</sup>H]тимидина была выбрана культура клеток HeLa. Результаты включения радиоактивности в нерастворимую в

Сокращения: PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – ядерный антиген пролиферирующих клеток; TCA – трихлоруксусная кислота.

<sup>#</sup>Автор для переписки.

**Таблица 1.** Влияние температуры на образование фосфоната ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) из исходного соединения (Iб) в смеси тритий-водород (1 : 1000) в присутствии 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> (40 мин)

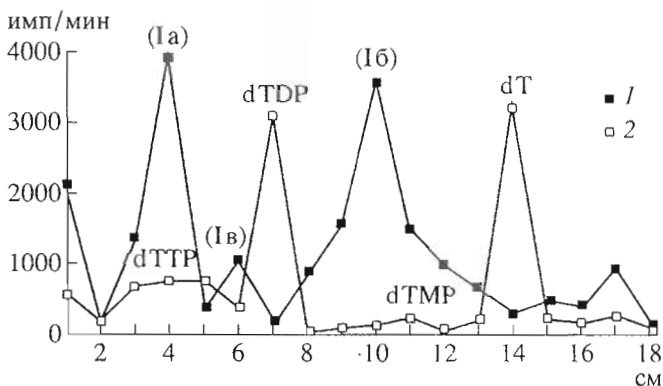
Температура, °С	Удельная радиоактивность, мКи/ммоль	Выход, %
150	270	23
160	350	12
170	390	5.5

**Таблица 2.** Включение фосфоната ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) или  $[^3\text{H}]$ -тимидина в ДНК (нерастворимую в ТСА фракцию)

Условия опыта	Удельная активность $\times 10^{-3}$ , имп/мин
Фосфонат ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) (400 мКи) + клетки	50.5
$[^3\text{H}]$ Тимидин (5 мКи) + клетки	4.9
Фосфонат ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) (20 мКи)	2

5% ТСА фракцию – полимерную ДНК – приведены в табл. 2.

Кроме того, для изучения состава радиоактивной низкомолекулярной фракции (растворимой в 5% ТСА) проводилась хроматография лизата клеток на силикагеле (рисунок) и показано, что молярное соотношение ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) – ( $[^3\text{H}]\text{Iв}$ ) – ( $[^3\text{H}]\text{Iа}$ ) приблизительно 5 : 1 : 8 (данные трех экспериментов). Таким образом, кажется вероятным, что фосфорилирование фосфоната ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) проходит в две стадии: ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ )  $\rightarrow$  ( $[^3\text{H}]\text{Iв}$ )  $\rightarrow$  ( $[^3\text{H}]\text{Iа}$ ), т.е. по традиционному механизму, хотя не исключена и другая последовательность процессов, а именно



ТСХ-анализ растворимой в 5% ТСА фракции, полученной при культивировании клеток HeLa с фосфонатом ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) (1) или с  $[^3\text{H}]$ тимидином (2) (см. "Экспер. часть")

( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ )  $\rightarrow$  ( $[^3\text{H}]\text{Iа}$ )  $\rightarrow$  ( $[^3\text{H}]\text{Iв}$ ), причем первая стадия катализируется фосфорибозилпирофосфатсинтетазой (PRPP-synthetase) [4, 5] или сходным ферментом, а второй этап – дефосфорилирующими ферментами. Скорость лимитирующей стадией в рамках первой схемы, очевидно, является стадия  $\beta$ -фосфорилирования.

Около 80% радиоактивности, по данным трех опытов, было обнаружено в нерастворимой в 5% ТСА фракции (ДНК).

Суммарное количество фосфорилированных в клетках форм, т.е. ( $[^3\text{H}]\text{Iа}$ ) + ( $[^3\text{H}]\text{Iв}$ ), составило около  $10^4$  имп/мин (рисунок; сумма пиков ( $[^3\text{H}]\text{Iа}$ ) + ( $[^3\text{H}]\text{Iв}$ )). Однако, если учитывать, что на хроматограмму наносилось половинное количество радиоактивности опыта (см. "Экспер. часть"), а также приблизительно 80% погашение радиоактивности на пластинке, эта величина должна составлять около  $10^5$  имп/мин. В то же время в опыт вносилось 400 мКи ( $2.7 \times 10^8$  имп/мин) фосфоната ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ). Таким образом, интенсивность метаболизма соединения ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) невелика. Расчет с учетом значений отношения радиоактивности фосфоната ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ), добавленного в клеточную среду, к сумме радиоактивности в клетках ( $[^3\text{H}]\text{ДНК}$  + ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) + ( $[^3\text{H}]\text{Iв}$ ) + ( $[^3\text{H}]\text{Iа}$ )) и отношения объема клеток к общему объему инкубационной среды показывает, что в клетках концентрация трития примерно в 150 раз выше, чем в случае статистического распределения. Из этих данных нельзя сделать вывод, поступает ли фосфонат ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) в клетки активным либо пассивным путем, но обогащение клеток веществом ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) очевидно.

Суммируя полученные результаты, можно утверждать, что внутримолекулярное фосфорилирование фосфоната ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) в клетках происходит, что позволяет использовать соединение ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) в качестве модельного субстрата для изучения процессов биосинтеза ДНК в интактных клетках человека.

Ранее сообщались косвенные данные о фосфорилировании двух аналогов фосфоната ( $[^3\text{H}]\text{Iб}$ ) в культурах клеток. Отмечалось ингибирование репродукции вируса иммунодефицита человека в культуре клеток 5'-О-фосфонилметил-3'-азидо-3'-дезокситимидином [6, 7] и 5'-О-фосфонилметил-3'-фтор-3'-дезокситимидином [7], которое трудно объяснить без внутриклеточного фосфорилирования этих модифицированных нуклеотидов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез 5'-О-фосфонилметилтимидина (Iб) осуществляли по методике [8], получение катализатора – 5% Pd/BaSO<sub>4</sub> – по [9]. ТСХ проводили на пластинках с PEI-целлюлозой (Merck) в 1 М NaCl (система 1), на пластинках Plastikfolien Kieselgel

60 F<sub>254</sub> (Merck) в системе диоксан – 25% водн. аммиак – вода, 6 : 1 : 4 (система 2), жидкостную хроматографию выполняли на колонке (16 × 250 мм) с DE-32-целлюлозой (Whatman), вещества элюировали градиентом 0.05 → 0.15 М ТЕАВ-буфера, рН 8.6. ВЭЖХ проводили на колонке (4.6 × 250 мм) с сорбентом Nucleosil 120-5 C18, элюировали 0.1 М ТЕАВ, содержащим 2% ацетонитрила (система 3), и 0.1% трифторуксусной кислотой + 5% метанола (система 4). Скорость потока 0.5 мл/мин.

**Фосфонат ([<sup>3</sup>H]I6).** Смесь 3.2 мг (10 мкмоль) соединения (I6) и 50 мг катализатора помещали в стеклянную ампулу, ампулу вакуумировали и наполняли газообразным тритием до давления 250 мм рт. ст. Реакционную смесь нагревали 40 мин при 150° С, охлаждали и удаляли избыток трития вакуумированием. Лабильно связанный тритий отгоняли упариванием с 50% водным этанолом (3 × 10 мл). Далее продукт ([<sup>3</sup>H]I6) очищали ВЭЖХ в системе 3 и затем хроматографировали на колонке с DE-32-целлюлозой. Фосфонат ([<sup>3</sup>H]I6) выделяли с выходом 23.4%. Удельная активность 71 Ки/ммоль, радиохимическая чистота – более 97%.

**Эксперименты с клетками.** Клетки HeLa (500 тыс.) высевали на 6-луночные плашки с 1 мл среды DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, и культивировали 24 ч при 37° С в присутствии 5% СО<sub>2</sub>. После этого среду заменяли 1 мл свежей, содержащей 400 мкКи фосфоната ([<sup>3</sup>H]I6) или 5 мкКи [<sup>3</sup>H]тимидина. Клетки культивировали 9 ч в указанных условиях, обрабатывали трипсином, суспендировали в среде, содержащей сыворотку, и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Осадок клеток ресуспендировали в PBS (забуференном фосфатом физиологическом растворе) с последующим осаждением в подобных же условиях, лизис клеток проводили быстрым замораживанием в жидком азоте с последующим размораживанием (процедуру повторяли 3 раза). К обработанному таким образом остатку приливали 100 мкл 5% ТСА и суспензию интенсивно перемешивали. Часть суспензии (0.5 объема) наносили на стеклянные фильтры GF/C (диаметром 1 см), промывали 40 мл 1% пиррофосфата натрия в 5% ТСА и затем 1 мл этанола. Фильтры высушивали на воздухе и просчитывали в толуольном сцинтиллято-

ре на счетчике радиоактивности Intertechnique (Франция). Оставшуюся половину суспензии экстрагировали эфиром (3 × 400 мкл) для удаления ТСА, смешивали с нерадиоактивными соединениями (Ia)–(Iv) (свидетелями) и хроматографировали на пластинке с силикагелем длиной 19 см в системе 2. Сорбент высушивали, пластинку разрезали на квадраты по 1 см<sup>2</sup>, их радиоактивность измеряли в 3 мл толуольного сцинтиллятора (рисунк).

Проведено исследование гашения при измерении радиоактивности фрагмента кизельгельной пластинки. Для этого исследовано гашение [<sup>3</sup>H]тимидина с активностью 1 мкКи/мкл. На фрагменты пластинки (1 × 1 см) наносили по 6 мкл раствора, высушивали на воздухе и измеряли радиоактивность в 3 мл толуольного сцинтиллятора. Усредненное значение по трем опытам составило 245 × 10<sup>3</sup> имп/мин, что соответствует эффективности 18.6%.

Данное исследование частично поддержано РФФИ (гранты № 96-04-48277 и 95-03-08142а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jasko M.V., Semizarov D.G., Victorova L.S., Mozzherin D.Ju., Krayevsky A.A., Kukhanova M.K. // FEBS Lett. 1995. V. 357. P. 23–26.
2. Mozzherin D.J., McConnell M., Jasko M.V., Krayevsky A.A., Tan C.-K., Downey K.M., Fisher P.A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 31711–31717.
3. Судоров Г.В., Мясоедов Н.Ф. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 299–304.
4. Balzarini J., De Clercq E. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990. V. 179. P. 781–787.
5. Balzarini J., De Clercq E. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 8686–8689.
6. Тарусова Н.Б., Хорлин А.А., Краевский А.А., Корнеева М.Н., Носик Д.Н., Круглов Н.Б., Галегов Г.А., Бибилашвили Р.Ш. // Молекуляр. биология. 1989. Т. 23. С. 1716–1724.
7. Jie L., Van Aerschot A., Balzarini J., Janssen G., Busson R., Hoodmartens J., De Clercq E., Herdewijn P. // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 2481–2487.
8. Куханова М.К., Кузнецова Е.В., Ясько М.В., О'Хара Б., Беккер Дж., Морин Дж., Глузман Я. // Молекуляр. биология. 1994. Т. 28. С. 875–886.
9. Mazingo R. // Org. Synth. 1955. Coll. V. 3. P. 685–691.

# Phosphorylation of 5'-O-Phosphonylmethylthymidine and Its Incorporation into the DNA of HeLa Cells

M. V. Jasko\*, G. V. Sidorov\*\*, R. V. Kondratov\*,  
V. S. Prassolov\*, N. F. Myasoedov\*\*, and A. A. Krayevsky\*

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

\*\**Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,  
pl. Akademika Kurchatova 46, Moscow, 123182 Russia*

**Abstract**— $^3\text{H}$ 5'-O-Phosphonylmethylthymidine with a specific activity of 71 Ci/mmol was obtained by isotope exchange. Its incubation with a HeLa cell culture resulted in the formation of  $^3\text{H}$ -labeled 5'-O-( $\beta$ -phosphoryl- $\alpha$ -phosphonylmethyl)thymidine, 5'-O-( $\beta,\gamma$ -diphosphoryl- $\alpha$ -phosphonylmethyl)thymidine, and  $^3\text{H}$ DNA. This proved the ability of 5'-O-phosphonylmethylthymidine to undergo phosphorylation and incorporation into the DNA of human cells.

*Key words:*  $^3\text{H}$ -labeled 5'-O-phosphonylthymidine, phosphorylation, cells.