



УДК 547.963.057:577.34

ПОЛУЧЕНИЕ ФОТОРЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ДУПЛЕКСОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ФОТОАФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

© 2001 г. Д. Ю. Хлиманков, И. О. Петрусева, Н. И. Речкунова, Е. А. Белоусова*,
Д. М. Колпащиков, С. Н. Ходырева, О. И. Лаврик[#]

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

*Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Поступила в редакцию 27.09.2000 г. Принята к печати 19.10.2000 г.

Замещенные по основанию фотореакционноспособные производные дезоксинуклеозидтрифосфатов (5-[*N*-(2,3,5,6-тетрафтор-4-азидобензоил)-*транс*-3-аминопропенил-1]- и 5-{*N*-[*N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиримидин-6-ил)-3-аминопропионил]-*транс*-3-аминопропенил-1}-2'-деоксиуридин-5'-трифосфат) использовали в качестве субстратов в реакции, катализируемой ДНК-полимеразой β , для введения фотореакционноспособных остатков dNMP в 3'-конец моонуклеотидной бреши. Образовавшийся одноцепочечный разрыв (ник), содержащий на 3'-конце модифицированное основание, лигировали с помощью ДНК-лигазы фага T4. Предлагаемый подход позволяет получать ДНК-дуплексы, несущие фотореакционноспособные группы в определенном положении нуклеотидной цепи. С помощью полученных (фотореакционноспособных ДНК-дуплексов проведена фотоаффинная модификация ДНК-полимеразы β и репликативного белка A человека (hRPA). Показано, что уровень модификации ДНК-полимеразы β и субъединиц hRPA фотореакционноспособным олигонуклеотидом в составе двуцепочечной ДНК значительно ниже, чем при использовании фотореакционноспособной ДНК с одноцепочечным разрывом (ником). В случае двуцепочечной ДНК меченую подвергается преимущественно р70-субъединица hRPA, что свидетельствует о решающем вкладе этой субъединицы во взаимодействие белка с ДНК.

Ключевые слова: фотореакционноспособные олигонуклеотиды; ДНК-лигаза фага T4; ДНК-полимераза β ; репликативный белок A; фотоаффинная модификация.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее было показано, что аналоги dNTP, содержащие фотореакционноспособные тетрафторазидобензоильную и дифторхлоразидопиримидильную группы, присоединенные по 5-му положению остатка урацила, являются субстратами ряда ДНК-полимераз [1, 2], в том числе ДНК-полимеразы β (Pol β) – основной ДНК-полимеразы эукариот, участвующей в процессе репарации поврежденной ДНК [3]. Фотореакционноспособные производные dNTP использовались как субстраты в полимеразной реакции для удлинения радиоактивно меченного праймера в составе дуплекса с соответствующей матрицей. Последующее облучение

УФ-светом приводило к ковалентной пришивке фотоактивного праймера к ДНК-полимеразе или другому ДНК-связывающему белку [1, 2]. Поскольку фотореакционноспособная группа находится на 3'-конце праймера, ковалентной пришивке подвергаются только те белки, которые контактируют с этим участком. Так, было показано, что вблизи 3'-конца праймера локализована р32-субъединица фактора репликации A человека, тогда как р70-субъединица взаимодействует преимущественно с одноцепочечным участком – выступающим 5'-концом матрицы ДНК-дуплекса [4, 5].

В настоящей работе предлагается подход, который позволяет получать фотореакционноспособные ДНК-дуплексы, содержащие фотоактивные группы в заданном положении нуклеотидной цепи. Такие фотореакционноспособные ДНК могут быть использованы для исследования взаимодействия различных ДНК-структур с ДНК-связывающими белками методом фотоаффинной модификации. Предлагаемый способ введения фотореакционноспособных групп в двуцепочечные участки

Сокращения: FAV-dUTP – 5-[*N*-(2,3,5,6-тетрафтор-4-азидобензоил)-*транс*-3-аминопропенил-1]-2'-деоксиуридин-5'-трифосфат; FAP-dUTP – 5-{*N*-[*N*-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиримидин-6-ил)-3-аминопропионил]-*транс*-3-аминопропенил-1}-2'-деоксиуридин-5'-трифосфат; Pol β – ДНК-полимераза β ; hRPA – репликативный белок A человека.

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

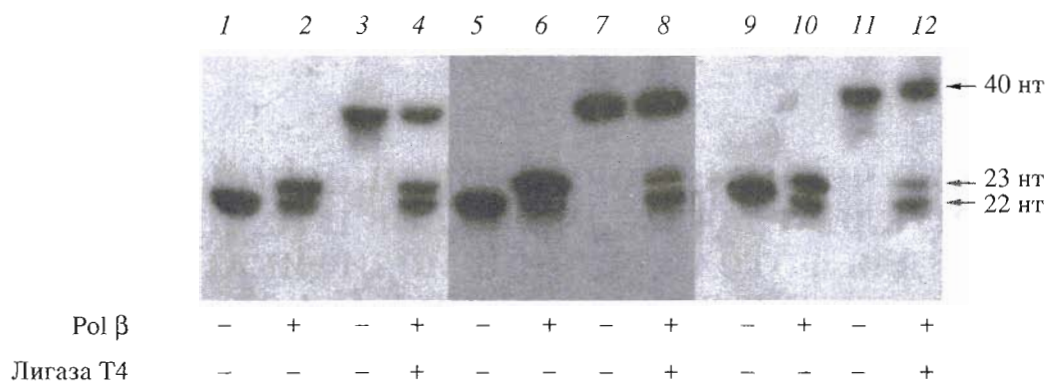


Рис. 1. Радиоавтограф электрофореза в 20% ПААГ продуктов удлинения праймера в мононуклеотидной брешу дуплекса (I) и лигирования образовавшегося ника: 1, 5, 9 – исходный 5'-³²P-меченый 22-мерный праймер; 2, 6, 10 – продукты удлинения праймера на один шаг с помощью Pol β в присутствии dTTP, FAP-dUTP, FAB-dUTP, соответственно; 3, 7, 11 – 5'-³²P-меченая 42-мерная матрица; 4, 8, 12 – продукты лигазной сшивки ника, образовавшегося после включения dTMP, FAP-dUMP, FAB-dUMP, соответственно. Стрелками показано положение маркеров.

ДНК, имеющие мононуклеотидную брешь, основан на способности ДНК-полимеразы β включать фотореакционноспособные остатки dNMP в 3'-конец этой брешы и способности ДНК-лигазы фага T4 катализировать образование фосфодиэфирной связи в нике, 3'-конец которого представлен замещенным по основанию остатком dNMP. Полученная таким способом фотореакционноспособная двуцепочечная ДНК была использована для фотоаффинной модификации Pol β и hRPA.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура олигонуклеотидного дуплекса (I), содержащего мононуклеотидную брешь (схема), моделирует субстрат, возникающий после выщепления нуклеотида, в процессе репарации ДНК с участием Pol β, которая катализирует включение

недостающего нуклеотидного остатка [3]. Мы использовали способность Pol β заполнять мононуклеотидную брешь для получения фотореакционноспособных ДНК, несущих фотоактивную группу на 3'-конце ника. В соответствии со структурой матрицы для заполнения брешы с помощью Pol β в качестве субстрата использовали dTTP, а также его аналоги: FAB-dUTP и FAP-dUTP. Ранее было показано, что эти аналоги являются субстратами ДНК-полимераз для дуплексов с выступающим 5'-концом матрицы [1, 2].

Как видно из рис. 1, удлинение 5'-³²P-меченого праймера в составе дуплекса (I) на один шаг с помощью Pol β наблюдается в присутствии как dTTP (2), так и обоих аналогов (6, 10). Таким образом, Pol β способна вводить замещенные по основанию аналоги dNTP в мононуклеотидную брешь с

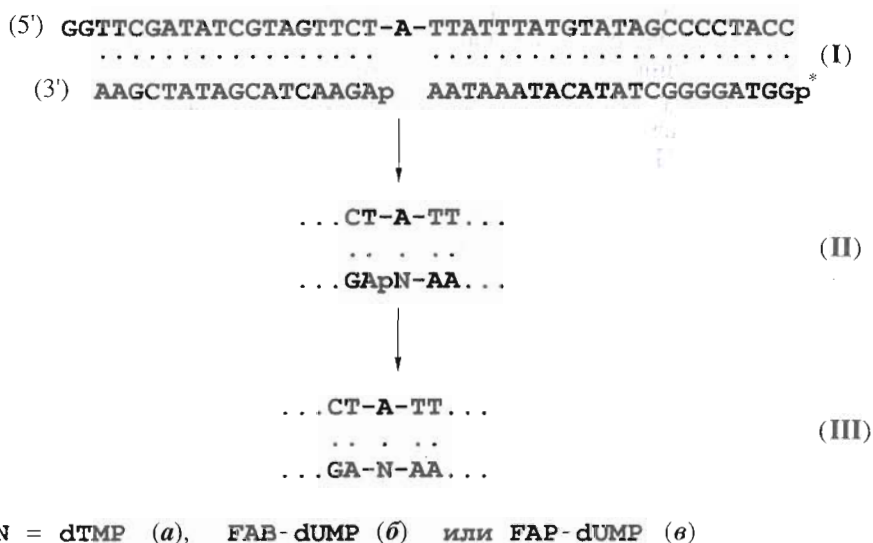


Схема.

образованием дуплекса (II) (см. схему) с одноцепочечным разрывом, имеющим фотореакционноспособную группу на 3'-конце ника. Такие структуры (II б, в) могут служить субстратами для Т4-ДНК-лигазы (8, 12) так же, как и дуплекс (II а) с природным основанием на 3'-конце ника (4), причем замена природного нуклеотида модифицированным по основанию аналогом практически не влияет на эффективность лигирования.

В данной работе мы применили полученные фотореакционноспособные ДНК-дуплексы (II) и (III) для изучения взаимодействия двуцепочечной ДНК с Pol β и hRPA.

Репликативный белок А участвует в процессах репликации, репарации и рекомбинации ДНК, его главная функция заключается в связывании одноцепочечных участков ДНК. hRPA состоит из трех субъединиц с молекулярными массами 70 (p70), 32 (p32) и 14 (p14) кДа [6]. Ранее было показано, что взаимодействие hRPA с ДНК-дуплексами, имеющими разную длину выступающих 5'-концов матрицы и содержащими фотореакционноспособную группу на 3'-конце праймера, приводит к мечению либо p70-, либо p32-субъединицы репликативного фактора, причем направленность мечения субъединиц hRPA зависит как от длины 5'-выступающего участка матрицы, так и от концентрации белка [4, 5]. Представляет интерес исследование взаимодействия этого белка с ДНК-структурами, имеющими одноцепочечный разрыв (типа дуплекса II), а также с полностью двуцепочечными ДНК (типа III). Такие ДНК-субстраты возникают в процессах репликации и репарации ДНК, в которых предполагается участие hRPA [6].

На рис. 2 представлены данные по модификации Pol β и hRPA олигонуклеотидом, 3'-конец которого, содержащий остаток FAP-dUMP, расположен в нике дуплекса (II) (1, 3–5), а также олигонуклеотидом в составе дуплекса (III), образовавшимся после сшивания одноцепочечного разрыва (2, 6–8). Видно, что лигирование ника приводит к появлению продуктов модификации Pol β и субъединиц p32 и p70 hRPA с меньшей подвижностью, что соответствует образованию ковалентного аддукта между фотореакционноспособным 40-мерным олигонуклеотидом (продуктом лигирования) и соответствующим полипептидом. Необходимо заметить, что в данных условиях эксперимента мечения ДНК-лигазы практически не наблюдается, хотя увеличение концентрации ДНК-лигазы приводит к появлению продукта мечения этого белка (данные не приведены).

Из рис. 2 также видно, что после лигирования ника происходит снижение эффективности индуцированной УФ-светом пришивки 5'-³²P-меченого олигонуклеотида к Pol β и субъединицам p32 и p70 hRPA, причем в случае двуцепочечной ДНК преобладает продукт мечения p70-субъединицы.

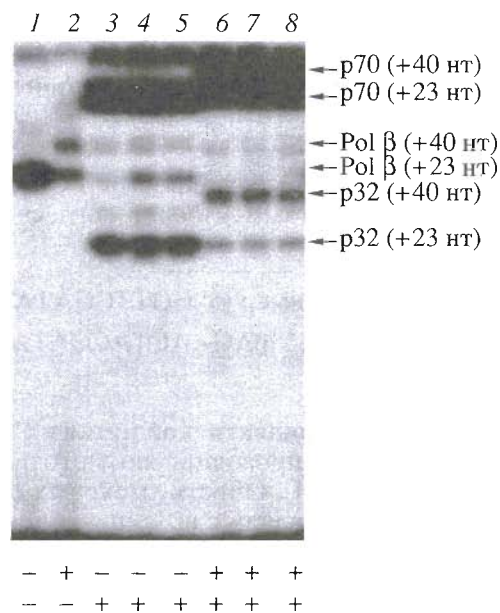


Рис. 2. Фотоаффинная модификация Pol β и hRPA 23-мерным фотоактивным 5'-меченым олигонуклеотидом, содержащим остаток FAP-dUMP, в составе дуплекса (II) (1, 3–5) и 40-мерным фотоактивным 5'-меченым олигонуклеотидом, образовавшимся после лигирования ника, в составе дуплекса (III) (2, 6–8). Концентрация Pol β 0.5 мкМ, hRPA 0 (1, 2), 8 (3, 6), 6 (4, 7) и 4 мкМ (5, 8). Справа стрелками показано положение соответствующих белков, содержащих ковалентно связанные ³²P-меченые олигонуклеотиды.

Эти результаты подтверждают известные данные о том, что hRPA и Pol β имеют низкое сродство к двуцепочечным ДНК [6, 7]. Кроме того, последние литературные данные свидетельствуют, что взаимодействие hRPA с двуцепочечными ДНК, по-видимому, является проявлением его "расплетающей" активности и последующего взаимодействия с образовавшимися одноцепочечными участками [8, 9]. Показано, что основная роль в проявлении ДНК-связывающей активности hRPA принадлежит субъединице p70 [8, 9]; именно большая субъединица hRPA подвергается мечению при взаимодействии с ДНК-дуплексом, содержащим в одной цепи 1,3-d(GTG)-цис-платину и 5-йоддезоксисуридин в качестве фотореагента [10]. Полученные нами результаты также демонстрируют преимущественное взаимодействие двуцепочечной ДНК с субъединицей p70, что отражает определяющую роль именно этого полипептида во взаимодействии фактора репликации А с двуцепочечной ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали [γ -³²P]АТФ (Биосан, Россия), полинуклеотидкиназу и ДНК-лигазу фага Т4 (Сибэнзим, Россия), АТФ, dГТФ, маркеры

молекулярной массы Sigmarker High Range, реактивы для электрофорезов и основные компоненты буферов (Sigma, США); остальные реагенты отечественного производства квалификации "ос. ч." или "х. ч."

Рекомбинантные белки – Pol β крысы и hRPA – выделяли из штаммов *E. coli* согласно стандарт-

ным протоколам [11] и [12] соответственно, с некоторыми модификациями.

Синтез и фотохимические свойства аналогов FAP-dUTP [2] и FAB-dUTP [13] описаны ранее.

Олигонуклеотидный дуплекс (I) с мононуклеотидной брешью получали, используя олигонуклеотиды (Genset, США):

42-мер (5')GGTTCGATATCGTAGTTCTATTATTTATGTATAGCCSSTACC,
17-мер (5')pAGAACTACGATATCGAA и 22-мер (5')GGTAGGGGCTATACATAAATAA.

Введение радиоактивной метки в 5'-конец олигонуклеотидов проводили по методике, описанной в работе [14]. Очистку меченых олигонуклеотидов осуществляли с помощью электрофореза в ПААГ с последующей элюцией [15].

Элонгацию радиоактивно меченного 22-мерного праймера в составе дуплекса (I) с мононуклеотидной брешью проводили с помощью Pol β в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0 (при 25°C), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ (буфер А), 0.1 мкМ дуплекс (I), 0.5 мкМ Pol β , 1 мкМ dTTP (или его аналог: FAB-dUTP или FAP-dUTP). Смеси инкубировали в течение 20 мин при 37°C.

Лигирование осуществляли, добавляя к половине реакционной смеси 5 ед. акт. T4-ДНК-лигазы (за 1 ед. акт. принимали количество фермента, необходимое для 50%-ной сшивки HindIII-фрагментов ДНК фага λ за 30 мин при 16°C в 20 мкл реакционной смеси при концентрации ДНК 300 мкг/мл) и АТФ до концентрации 1 мкМ. Смеси инкубировали в течение 2 ч при 16°C.

Реакцию останавливали добавлением 5 мкл раствора 90% формамида, содержащего 0.1% бромфенолового синего и 50 мМ EDTA. Пробы прогревали в течение 5 мин при 90°C. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% ПААГ (акриламид-бисакриламид, 20 : 1) с 7 М мочевиной, толщина гелей 0.4 мм, длина 300 мм. Электрофорез проводили в 100 мМ Трис-боратном буфере, pH 8.3, при напряжении 1500 В.

Фотоаффинную модификацию Pol β и hRPA фотоактивными олигонуклеотидами, синтезированными *in situ*, проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 0.5 мкМ Pol β , 0.1 мкМ дуплекс (I) и 1 мкМ FAP-dUTP в буфере А. Присоединение фотореакционноспособного остатка FAP-dUMP к 3'-концу 5'-³²P-меченного 22-праймера в составе дуплекса и лигирование ника проводили как описано выше. К полученным смесям добавляли hRPA до конечной концентрации 4, 6 и 8 мкМ и облучали УФ-светом.

УФ-облучение проводили в свете ртутной лампы высокого давления ДРК-120: осветитель ВИО-1 (Ломо, Санкт-Петербург), расстояние 110 мм, в

области >280 нм через светофильтр WG-280; $I = 1.2 \times 10^{15}$ квант $\text{с}^{-1} \text{см}^{-2}$.

Продукты модификации анализировали электрофорезом в 12% SDS-ПААГ [16] с последующей радиоавтографией.

Работа поддержана грантом INTAS (№ 96-1778), Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 98-04-49718, № 99-04-04016 и № 00-04-22002) и Программой Минобразования РФ "Фундаментальные исследования высшей школы в области естественных и гуманитарных наук. Университеты России" (грант № ЗН-346-00).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kolpashchikov D.M., Rechkunova N.I., Dobrikov M.I., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1999. V. 448. P. 141–144.
2. Колпащиков Д.М., Захаренко А.Л., Дежуров С.В., Речкунова Н.И., Ходырева С.Н., Дегтярев С.Х., Лутвак В.В., Лаврик О.И. // Биоорг. химия. 1999. Т. 25. С. 129–136.
3. Sobol R.W., Horton J.K., Kuhn R., Gu H., Singhal R.K., Prasad R., Rajewsky K., Wilson S.H. // Nature. 1996. V. 379. P. 183–186.
4. Lavrik O.I., Kolpashchikov D.M., Nasheuer H.-P., Weisshart K., Favre A. // FEBS Lett. 1998. V. 441. P. 186–190.
5. 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.
6. Wold M.S. // Annu. Rev. Biochem. 1997. V. 66. P. 61–92.
7. Wang T.S.-F. // DNA Replication in Eukaryotic Cells / Ed. M.L. DePamphilis. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. P. 461–493.
8. Lao Y., Lee C.G., Wold M.S. // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 3974–3984.
9. Lao Y., Gomes X.V., Ren Y., Taylor J.-S., Wold M.S. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 850–859.
10. Schweizer U., Hey T., Lipps G., Krauss G. // Nucl. Acids Res. 1999. V. 27. P. 3183–3189.
11. Beard W.A., Wilson S.H. // Methods Enzymol. 1995. V. 262. P. 98–107.
12. Henriksen L.A., Umbricht C.B., Wold M.S. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 11121–11132.
13. Godovikova T.S., Kolpashchikov D.M., Orlova T.N., Richter V.A. // FASEB J. 1997. V. 11. P. 1367.

14. 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.
15. Ямщиков В.Ф. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии / Ред. Р.И. Салганик. Новосибирск: Наука, 1990. С. 145–154.
16. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

Preparation of Photoreactive Oligonucleotide Duplexes and Their Application to Photoaffinity Modification of DNA-Binding Proteins

D. Yu. Khlimankov*, I. O. Petrusheva*, N. I. Rechkunova*, E. A. Belousova**,
D. M. Kolpashchikov*, S. N. Khodyreva*, and O. I. Lavrik*

e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru.

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

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

To introduce photoreactive dNTP residues to the 3'-end of a mononucleotide gap, base-substituted photoreactive deoxynucleoside triphosphate derivatives, (5-[N-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-azidobenzoyl)-trans-3-aminopropenyl-1]- and 5-{N-[N-(4-azido-2,5-difluoro-3-chloropyridine-6-yl)-3-aminopropionyl]-trans-3-aminopropenyl-1}-2'-deoxyuridine 5'-triphosphates, were used as substrates in the DNA polymerase β -catalyzed reaction. The resulting nick, containing a modified base at the 3'-end, was sealed by T4 phage DNA ligase. This approach enables the preparation of DNA duplexes bearing photoreactive groups at predetermined position(s) of the nucleotide chain. Using the generated photoreactive DNA duplexes, the photoaffinity modifications of DNA polymerase β and human replicative protein A (hRPA) were carried out. It was shown that DNA polymerase β and hRPA subunits were modified with the photoreactive double-stranded DNA considerably less effectively than by the nicked DNA. In the case of double-stranded DNA, the hRPA p70 subunit was preferentially labeled, implying a crucial role of this subunit in the protein–DNA interaction. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: DNA polymerase β , photoaffinity modification, photoreactive oligonucleotide, replicative protein, T4 phage DNA ligase