

На правах рукописи

КУДРЯШОВА НАТАЛЬЯ ВАСИЛЬЕВНА

**Взаимодействие фотоактивируемых и
фосфорилирующих 5'-амидофосфатов мононуклеотидов
с ферментами матричного синтеза нуклеиновых кислот**

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Новосибирск, 2005

Работа выполнена в Институте химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Научные руководители:

д.х.н. академик РАН Кнорре Дмитрий Георгиевич
к.х.н. Годовикова Татьяна Сергеевна

Официальные оппоненты:

д.х.н., профессор Лаврик Ольга Ивановна
к.х.н. Халимская Людмила Михайловна

Ведущая организация: Институт цитологии и генетики СО РАН

Защита состоится «2» декабря 2005 г. в 10⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО
РАН
по адресу: 630090, г. Новосибирск-90, просп. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан «28» октября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.х.н. Федорова О.С.



2006-4
22884

2219831

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследование деталей функционирования комплексов матрично-зависимого синтеза нуклеиновых кислот является одной из важнейших фундаментальных задач современной молекулярной биологии. Для решения этой сложной задачи используются многочисленные физические, химические и генно-инженерные методы. Подходом, перспективным в плане определения контактов между компонентами репликативных и транскрипционных комплексов при сборке, а также на разных стадиях синтеза ДНК или РНК, выступает метод аффинной модификации.

Одними из участников процессов репликации и транскрипции являются нуклеозид-5'-трифосфаты. Хотя разнообразие изученных активных аналогов таких низкомолекулярных субстратов велико, однако к началу настоящей работы значительная часть экспериментов с их использованием была выполнена либо в отсутствие матрицы, либо, в случае РНК-полимераз, в присутствии неспецифических матриц. Поэтому результаты этих исследований зачастую противоречивы. Необходимость проведения аффинной модификации в присутствии матриц, содержащих промотор, вытекает из того факта, что в формировании полноценных участков связывания, способных отбирать определенные нуклеозид-5'-трифосфаты, матрица играет решающую роль.

Использование арилазидов в качестве реакционноспособных групп для аффинных реагентов обеспечивает возможность включения процесса модификации в определенное время, что позволяет изучать взаимодействия между различными компонентами систем матричного синтеза нуклеиновых кислот на разных стадиях их функционирования. Для изучения топографии нуклеотид-связывающих центров ДНК- и РНК-полимераз перспективно использовать производные 5'-мононуклеотидов, несущие реакционноспособные группы с «нулевой» длиной спейсера. Это существенно повышает вероятность того, что произойдет модификация именно тех аминокислотных остатков, которые непосредственно контактируют с функциональной группой аналога субстрата. К таким типам реагентов относятся фосфорилирующие производные нуклеиновых кислот. Их достоинством является также образование ковалентных аддуктов, стабильность которых определяется природой модифицированного аминокислотного остатка. Это открывает возможность определения точки модификации



на белке путем проведения реакции демодификации в разных условиях. До начала настоящей работы в качестве фосфорилирующих реагентов наиболее часто использовали имидазолиды мононуклеотидов. Однако известно, что к эффективной атаке нуклеофильными группами аминокислотных остатков восприимчив только протонированный имидазол нуклеотида. В то же время показано, что замена имидазолида на амидофосфат с цвиттер-ионной группой на 5'-конце позволит избежать этого затруднения. Так, например, эффективность модификации РНК-полимеразы *E. coli* *N*-метилимидазолидами олигонуклеотидов при физиологических значениях pH была намного выше по сравнению с имидазолидами олигонуклеотидов.

Цель и задачи работы. Диссертация посвящена исследованию взаимодействия ферментов матричного синтеза нуклеиновых кислот – ДНК-полимеразы I и РНК-полимеразы II – с арилазидными производными γ -амидофосфатов NTP, а в случае РНК-полимеразы также с амидофосфатом AMP с цвиттер-ионной группой в условиях функционирования репликативного комплекса прокариот и транскрипционного комплекса эукариот. В процессе выполнения поставленной цели решались следующие задачи: а) синтез и изучение субстратных свойств амидофосфатов NTP в системах ферментов матричного синтеза нуклеиновых кислот; б) исследование химических и фотохимических реакций производных мононуклеотидов в вышеназванных ферментативных системах.

Научная новизна работы. С помощью производных NTP с фотоактивируемой группой на 5'-конце впервые исследована фотоаффинная модификация ДНК-полимеразы I *E. coli* и в условиях специфической инициации транскрипции эукариотической РНК-полимеразы II. Для реагентов на основе *n*-азидоанилина предложена схема взаимодействия фотоактивируемых аналогов с ферментами матричного синтеза нуклеиновых кислот, применяемая и для других белков, модифицируемых подобными фотопроизводными. При модификации РНК-полимеразы II фосфорилирующим аналогом мононуклеотида выявлен полипептид с молекулярной массой 45 kDa, участвующий в формировании активного центра транскрипционного комплекса.

Практическая ценность работы. С учетом полученных в работе данных о свойствах арилазидных реагентов можно более целенаправленно осуществлять выбор, с одной стороны, ароматического азида для будущего фотоаффинного реагента, с другой стороны, условий проведения фотоаффинной модификации. При

конструировании амидофосфатов необходимо учитывать зависимость стабильности фосфамидной связи от строения ароматического азида и от природы гетероциклического основания. При проведении исследований в системах с тиолсодержащими соединениями также необходимо принимать во внимание влияние заместителей в арилазиде на устойчивость азидной группы.

Объем работы. Диссертация изложена на 162 стр., включая 29 рисунков и 5 таблиц. Список цитированной литературы включает 299 статей. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов работы, их обсуждения, выводов, списка цитированной литературы.

Публикация и апробация работы. Материалы диссертации опубликованы в 3 печатных работах и 8 тезисах докладов. Результаты работы докладывались на 27 Meeting of Federation of European Biochemical Societies (Lisbon, 2001), FEBS Forum of Young Scientists "Protein Structure-Function, Trafficking and Signalling" (Portugal, 2001), International Conference "RNA as Therapeutic and Genomics Target" (Novosibirsk, 2001), International Conference "Targeting RNA: Artificial Ribonucleases, Conformational Traps and RNA interference" (Novosibirsk, 2003), International Conference "Chemical and Biological Problems of Proteomics" (Novosibirsk, 2004).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

1. Синтез и свойства фотоактивируемых аналогов NTP.

γ -*n*-Азидоанилид dTTP синтезировали описанным в литературе способом через взаимодействие *n*-азидоанилина с циклическим тимидин-5'-триметафосфатом, для получения которого использовали водорастворимый карбодиимид. В водных растворах при активации нуклеотидов карбодиимидами или с использованием окислительно-восстановительной пары $\text{PhP}_3/(\text{PyS})_2$ выход амидофосфатов зависит от основности амина и для основных аминов чрезвычайно низок. Для решения этой проблемы, а также для того, чтобы предотвратить восстановление азидогруппы в присутствии PhP_3 , мы разделили во времени стадии активации и аминотиза. С помощью такого усовершенствованного метода нам удалось осуществить в водно-органической среде синтез арилазидных производных γ -амидофосфатов NTP, структуры которых представлены на рис. 1, с выходами 80–95 %. Синтезированные фотоактивируемые производные NTP были

охарактеризованы методами ИОХ, ОФХ, ^{31}P -, ^{19}F -, ^1H -ЯМР- и ИК-спектроскопии.

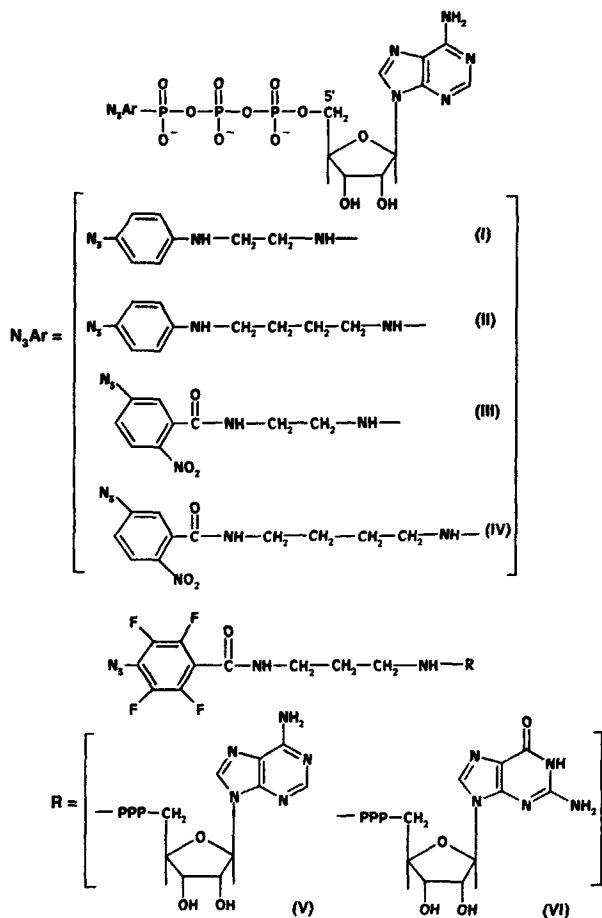


Рис. 1. Структура γ -амидофосфатов НТР.

Нами было обнаружено, что устойчивость фосфамидной связи в синтезированных γ -амидофосфатах НТР определяется как природой гетероциклического основания, так и структурой фотоактивируемой группы. В водной среде (рН 6.5) фосфамидная связь в соединении (V) подвергается гидролизу с $\tau_{1/2} = 120$ ч, в других производных АТР (I–IV)

и в фотоаналоге GTP (VI) она устойчива в условиях проведения эксперимента.

Сравнение рассчитанных методом молекулярного моделирования расстояний между фосфамидным атомом азота и протонированными атомами азота N1 и N3 гетероцикла в структурах аналогов NTP показало, что только для соединения (V) в одной из конформаций, соответствующей минимуму энергии, возможна передача протона с гетероцикла на фосфамидный атом азота. Возможно, это приводит к его протонированию, что способствует гидролизу фосфамидной связи. Для других производных NTP эти расстояния гораздо больше, чем, вероятно, и обеспечивается большая устойчивость этих соединений. На основе полученных результатов об устойчивости фосфамидной связи в аналогах NTP и данных по компьютерному моделированию их структур предложена схема реакции гидролиза азидотетрафторбензоильного производного ATP (V) (рис. 2).

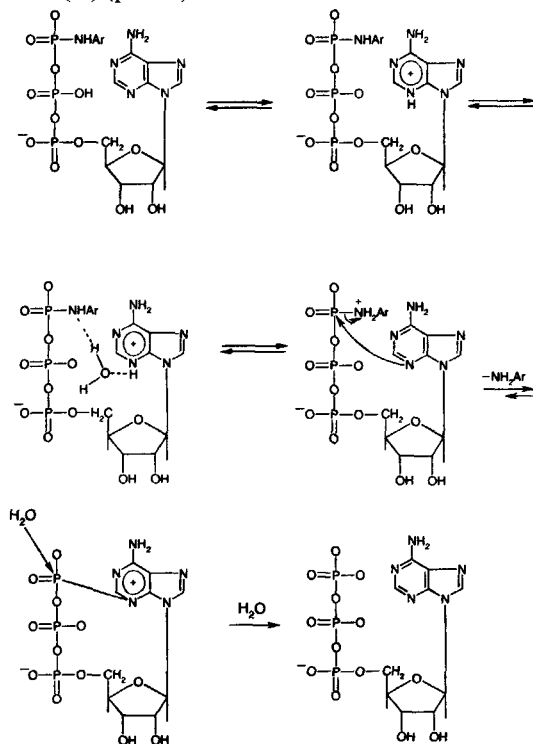


Рис. 2. Схема гидролиза производного ATP (V).

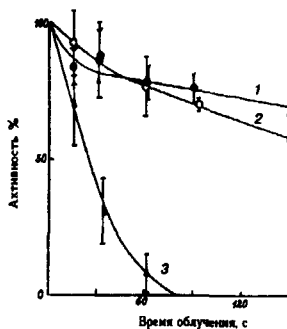
Нами было установлено, что *n*-азидотетрафторбензойная кислота – функциональная группа реагентов – в присутствии дитиотреита, добавляемого часто в реакционные смеси для сохранения активности ферментов, восстанавливается с образованием аминоксоединения с $t_{1/2} = 20$ мин. В тоже время, 5-азидо-2-нитробензойная кислота и *N*-(4-азидофенил)-1,4-диаминобутан инертны к действию дитиотреита в течение эксперимента. На основании полученных данных и литературных источников нами построен следующий ряд увеличения устойчивости различных арилазидов по отношению к действию восстановителей, а именно дитиотреиту: фенилазид < *N*-(4-азидо-2-нитрофенил)-1,2-диаминоэтан < *n*-азидобензойная кислота < *n*-азидотетрафторбензойная кислота << *N*-(4-азидофенил)-1,4-диаминобутан, 5-азидо-2-нитробензойная кислота.

2. Взаимодействие ДНК-полимеразы I *E. coli* и ее большого фрагмента с γ -*n*-азидоанилидом dTTP.

Нами установлено, что γ -*n*-азидоанилид dTTP (VII, AzdTTP) не является субстратом ДНК-полимеразы I *E. coli* и фрагмента Кленова, а выступает в качестве ингибитора смешанного типа реакции синтеза ДНК, катализируемой этими ферментами.

В связи с тем, что в составе белковых молекул присутствуют аминокислотные остатки, способные поглощать световое излучение, мы исследовали непосредственное воздействие света с $\lambda > 300$ нм на активность ДНК-синтезирующих ферментов (см. рис. 3 и рис. 4).

Рис. 3. Зависимость остаточной активности большого фрагмента ДНК-полимеразы I от времени облучения в присутствии поли(dA)• олиго(dT)₇₋₁₂ (1 и 2), 10^{-4} М AzdTTP (1) и 10^{-5} М dTTP (3).



Обнаружено, что облучение (интенсивность света 1.2×10^{15} квант·с⁻¹·см⁻²) в отсутствие субстратов ведет к быстрой инактивации ДНК-полимеразы I *E. coli* и фрагмента Кленова.

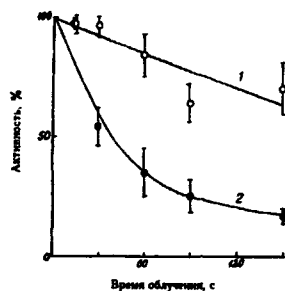


Рис. 4. Зависимость остаточной активности ДНК-полимеразы I от времени облучения в присутствии 10^{-5} М dTTP (1), 10^{-5} М dTTP, 10^{-4} М AzTTP (2).

Присутствие в реакционной смеси одного dTTP приводит к относительной стабилизации ферментов, причем ДНК-полимеразы I в большей степени, чем фрагмента Кленова (сравн. рис. 4, кривая 1 и рис. 3, кривая 3).

Таблица 1

Влияние присутствия AzTTP на изменение активности ДНК-полимеразы I в зависимости от времени облучения.

ДНК-полимераза I + поли(dA)•олиго(dT) ₇₋₁₂	Активность, %			
	15 с	30 с	60 с	90 с
1 без AzTTP*	90 ± 10	81 ± 11	87 ± 13	79 ± 7
2 без AzTTP	120 ± 30	190 ± 60	140 ± 14	130 ± 50
3 + 10^{-5} М AzTTP	280 ± 16	180 ± 14	130 ± 50	100 ± 19
4 + 10^{-4} М AzTTP	91 ± 6	84 ± 6	77 ± 4	72 ± 5
5 + 4×10^{-4} М AzTTP	89 ± 7	80 ± 10	—	78 ± 6
6 + 10^{-4} М AzTTP + 10^{-5} М dTTP;	103 ± 6	104 ± 5	93 ± 7	96 ± 3
7 + 10^{-4} М AzTTP + 10^{-5} М dCTP	100 ± 3	93 ± 5	75 ± 14	76 ± 8
8 **	—	80 ± 6	—	73 ± 10

* — буфер трис-HCl pH 7.4, в остальных опытах калий-бикарбонатный буфер pH 8.3. ** — к ферменту и поли(dA)•олиго(dT)₇₋₁₂ добавлен предварительно облученный 2×10^{-4} М AzTTP.

Присутствие праймер-матричного комплекса поли(dA)•олиго(dT)₇₋₁₂ в значительной степени стабилизирует фрагмент Кленова (рис. 3), а в

случае ДНК-полимеразы I вызывает в первые секунды облучения активацию в 2 раза (табл. 1) с последующим восстановлением активности до исходного уровня.

Как видно из таблицы 1, с увеличением концентрации фотореагента возрастает степень инактивации ДНК-полимеразы I (см. эксперименты 3–5). Некомплементарный матрице субстрат (dCTP), добавленный в реакционную смесь в концентрации порядка K_m , не предохраняет фермент от инактивации (эксперимент 7), а комплементарный – dTTP защищает от инактивации (эксперимент 6). При добавлении к ферменту и праймер-матричному комплексу продуктов фотоллиза AzTTP наблюдается такая же потеря активности, что и при непосредственном облучении смеси фермента и фотопроизводного TTP (сравните эксперименты 8 и 4, 5). Наличие инактивации при взаимодействии ДНК-полимеразы с предоблученным реагентом свидетельствует о протекании темновой стадии модификации.

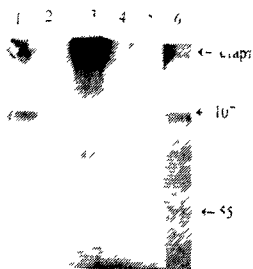


Рис. 5. Радиоавтограф геля после электрофореза продуктов модификации ДНК-полимеразы I (дорожки 1–4, 6) и ее большого фрагмента (дорожка 5) при облучении в присутствии 10^{-4} М γ -*n*-азидоанилида [α - 32 P]dTTP и поли(dA)•олиго(dT) $_{7-12}$ (кроме дорожки 2): дорожки 2 и 3 – 10^{-5} М dTTP; дорожка 4 – 10^{-5} М dCTP. Удельная радиоактивность γ -*n*-азидоанилида [α - 32 P]dTTP – 0.6 (дорожки 1–5) и 2.4 ТБк/моль (дорожка 6). Справа – молекулярная масса белков в kDa.

Электрофоретический анализ продуктов модификации ДНК-полимераз показал, что при облучении праймер-матричного комплекса, ДНК-полимеразы I и γ -*n*-азидоанилида [α - 32 P]dTTP выявляется меченый полипептид, соответствующий по подвижности белку с $M_r \sim 107$ kDa (рис. 5, дорожка 1). Применение при модификации ДНК-полимеразы препарата аналога с более высокой удельной радиоактивностью позволило выявить дополнительный модифицированный полипептид с $M_r \sim 55$ kDa (рис. 5, дорожка 6). В отличие от полного фермента инактивация фрагмента Кленова с помощью AzTTP в присутствии

праймер-матричного комплекса не сопровождается образованием ковалентных белково-нуклеиновых аддуктов (рис. 5, дорожка 5).

Отсутствие полосы меченого полипептида при облучении реакционной смеси в присутствии комплементарной матрицы dTTP (рис. 5, дорожка 3) и сохранение ферментативной активности в экспериментах по защите с помощью dTTP свидетельствует о том, что модифицируемый аминокислотный остаток локализован в активном центре фермента.

Полученные результаты в совокупности с литературными данными указывают на то, что на ферменте существует несколько неравноценных по функциональному значению и структуре мест связывания аналога, из которых модифицируются лишь те, у которых стерически сближены нуклеофильные остатки аминокислот и реакционноспособная группа AzTTP. Это может привести к образованию в ходе модификации разных по структуре продуктов.

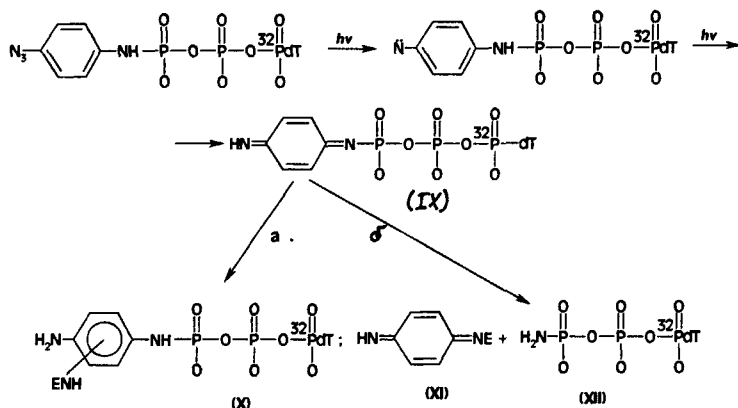


Рис. 6. Схема фотовзаимодействия ДНК-полимеразы (Е) с γ -*n*-азидоанилидом dTTP.

Известно, что при облучении AzTTP образуется реакционноспособное в отношении нуклеофильных аминокислот производное *n*-бензохинондиимина (IX). Дальнейшее его взаимодействие с ферментом может протекать по двум направлениям (рис. 6). В случае 1,4-присоединения производного (IX) к нуклеофильной группе белка (путь а), который, по нашему мнению, реализуется для ДНК-полимеразы I, в результате последующей ароматизации образуется замещенное по ядру производное *n*-фенилендиамина (X). Белково-нуклеотидный комплекс, выявляемый

при электрофоретическом анализе, очевидно, и является продуктом такого взаимодействия. В случае фрагмента Кленова при 1,2-присоединении (путь б) к фосфорилиминогруппе с последующим отщеплением фосамида dTTP (XII) образуется модифицированный белок типа (XI), в структуре которого отсутствует [^{32}P]-фосфат. Этим, очевидно, и обусловлено отсутствие белково-нуклеотидного аддукта при электрофоретическом анализе. Место атаки реагентом аминокислотного остатка в полипептидной цепи определяется конформацией фермента в данный момент времени.

3. Взаимодействие РНК-полимеразы II с аналогами NTP.

Поскольку при модификации белков с помощью γ -*n*-азидоанилидов NTP возникают определенные трудности с идентификацией фотопродуктов, обусловленные отщеплением функциональной группы от радиоактивно меченного адреса, мы сконструировали и использовали для модификации эукариотической РНК-полимеразы II фотоактивируемые производные АТР (I–IV), различающиеся как природой фотоактивируемой группы, так и длиной спейсера, соединяющего реакционноспособный остаток с аффинным фрагментом.

Возможность включения фотоаналогов АТР (I–IV) в транскрипцию была исследована нами в системе РНК-полимеразы II и базальных факторов транскрипции из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Используемый ранее в экспериментах по модификации РНК-полимеразы II транскрибируемый участок ДНК не находился под контролем промотора. Одно из отличий нашей работы и заключается в том, что в нашем эксперименте, наиболее приближенном к природным условиям, мы в качестве матрицы использовали суперскрученную ДНК, содержащую поздний промотор аденовируса (AdML). Реакцию транскрипции мы начинали с образования промоторного комплекса. Затем в реакционную смесь добавляли три природных субстраты (UTP, GTP и [α - ^{32}P]CTP), а вместо АТР одно из синтезированных нуклеотидных производных (I–IV). Для инициации специфической транскрипции на ДНК достаточно присутствия минимального набора базальных факторов транскрипции (TBP, TFIIB, TFIIF). Но, согласно используемому нами методу выделения, в системе присутствовали также базальные факторы транскрипции TFIIE и TFIIH.

Выделение транскриптов фенол-хлороформной экстракцией и анализ электрофорезом в 20 % ПААГ в денатурирующих условиях показали, что производное АТР (II) включается в состав РНК-продукта (рис. 7, дорожки 2 и 3). Уменьшение подвижности транскрипта в геле

по сравнению с транскриптом, полученным в системе синтеза РНК с природным иницирующим субстратом, может свидетельствовать о наличии арилизидного остатка в составе РНК-продукта. Аналогичное появление транскрипта мы наблюдали при добавлении в реакционную смесь с транскрипционно активным комплексом и других фотоактивируемых производных АТР (I, III и IV). Синтез РНК не наблюдается при исключении из реакционной смеси фотоаналога АТР и при добавлении в реакционную смесь α -аманитина. Совокупность полученных данных указывает на то, что в условиях специфической инициации транскрипции, осуществляемой под контролем позднего промотора аденовируса, соединения (I–IV) являются иницирующими субстратами РНК-полимеразы II.

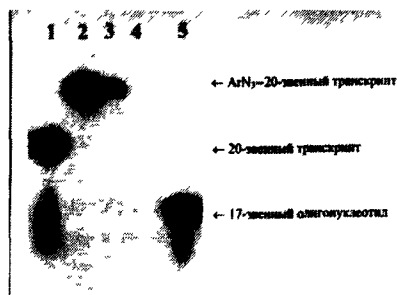
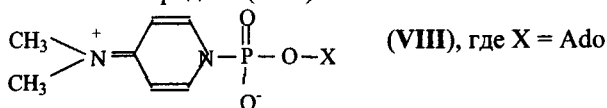


Рис. 7. Электрофоретический анализ (20%-ный SDS-полиакриламидный гель в присутствии 7М мочевины) транскриптов: 1 – транскрипция с NTP и АТР (4×10^{-4} М); 2 и 3 – транскрипция с NTP и фотоактивируемым аналогом АТР (4×10^{-4} М и 10^{-5} М, соответственно); 4 – транскрипция в присутствии α -аманитина; 5 – гетерогенный [32 P]-меченный 17-звенный олигонуклеотид.

При фотоаффинной модификации в условиях компетентного мечения образование ковалентных аддуктов между РНК-полимеразой II и фотореагентами (I–IV) не было зарегистрировано. Отсутствие модификации РНК-полимеразы II фотоактивируемыми аналогами NTP может быть вызвано: а) отсутствием в активном центре РНК-полимеразы II подходящей мишени для атаки образующимся в ходе облучения нитреном; б) взаимодействием арилизидного производного NTP с компонентами реакционной смеси, что приводит к потере фотореагентом модифицирующей способности; в) образованием лабильной связи между белком и производным NTP, что вызывает в ходе модификации отщепление реагента от аффинного фрагмента; г) отщеплением нуклеотидного остатка от продукта после фотореакции арилизидного фрагмента с функциональной группой белка.

Анализируя с помощью ВЭЖХ и УФ-спектроскопии смесь продуктов, полученных при облучении фотоаналога (II), мы зафиксировали образование ADP. Если фотолиз данного фотоаналога АТР (II) в активном центре фермента протекает так же, как и в водном растворе, то не исключен разрыв фосфоангидридной связи в продуктах фотомодификации белка. Изучение продуктов фотолиза соединений (I) и (III), отличающихся длиной спейсера и природой фотоактивируемой группы от соединения (II), показало, что в процессе фотолиза этих соединений ADP не образуется.

Ранее модификация эукариотической РНК-полимеразы II проводилась или в отсутствие матрицы, или в присутствии синтетического полинуклеотида с использованием аффинных реагентов, содержащих альдегидные группы, селективные в отношении первичных аминогрупп. Особенностью нашей работы являлось исследование аффинного мечения эукариотической РНК-полимеразы II в условиях специфической инициации транскрипции в присутствии ДНК с промотором AdML. В качестве аффинного реагента было опробовано фосфорилирующее производное АМР с цвиттер-ионной 5'-концевой фосфатной группой, содержащей остаток 4-*N,N*-диметиламинопиридина (VIII).



Аффинную модификацию проводили как методом компетентного мечения, так и в классическом варианте с использованием [³²P]-меченного соединения (VIII). При этом, в обоих случаях была обнаружена высокая специфичность мечения (рис. 8).

Так, при добавлении в реакционную смесь [³²P]-меченного производного АМР наблюдалось ковалентное присоединение его к полипептиду с молекулярной массой ~ 45 kDa (рис. 8, дорожка 8). При изучении защиты активного центра фермента "холодным" АТР от мечения по мере увеличения концентрации АТР (1, 10, 20 и 50-кратный молярный избыток по отношению к соединению (VIII)) было выявлено уменьшение интенсивности полосы меченного полипептида (дорожки 7–5), а при 50-кратном избытке АТР исчезновение этой полосы (рис. 8, дорожка 4). Полоса мечения также исчезала, если РНК-полимеразу II предынкубировали с α-аманитином (рис. 8, дорожка 3).

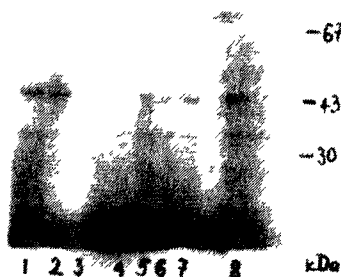


Рис. 8. Электрофоретический анализ (10%-ный ПААГ) продуктов аффинного мечения РНК-полимеразы II с помощью соединения (VIII): 1 – $[^{32}\text{P}]$ -меченое соединение (VIII) + СТР; 2 – соединение (VIII) + $[^{32}\text{P}]$ СТР; 3 – α -аманитин (1 мкг/мл) + $[^{32}\text{P}]$ -меченое соединение (VIII) + СТР; 4–7 предынкубация фермента с 50-, 20-, 10- и 1-кратным избытком АТР и последующая инкубация с $[^{32}\text{P}]$ -меченым соединением (VIII) + СТР; 8 – $[^{32}\text{P}]$ -меченое соединение (VIII). Справа – молекулярные массы белков-маркеров в kDa.

В случае компетентного мечения, когда соединение (VIII) использовали немеченым, а меченым был второй субстрат – $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ СТР, в результате реакции ковалентно метился также полипептид с молекулярной массой ~ 45 kDa (рис. 8, дорожка 2).

Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что модифицированный полипептид, по-видимому, принимает участие в формировании активного центра РНК-полимеразы II.

ВЫВОДЫ

1. Для изучения механизма функционирования ферментов матричного синтеза нуклеиновых кислот (ДНК-полимеразы I *E. coli* и РНК полимеразы II из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) синтезированы и охарактеризованы фотоактивируемые производные NTP, различающиеся природой арилазидного остатка и размером спейсера, соединяющего последний с нуклеотидным фрагментом: $\gamma\{1\text{-}[2\text{-}(n\text{-азидофениламино)этил}]\}$ (I), $\gamma\{1\text{-}[4\text{-}(n\text{-азидофениламино)бутил}]\}$ (II), $\gamma\{1\text{-}[2\text{-}(2\text{-нитро-5-азидобензоил)этил}]\}$ (III), $\gamma\{1\text{-}[2\text{-}(2\text{-нитро-5-азидобензоил)пропил}]\}$ (IV), $\gamma\{1\text{-}[2\text{-}(4\text{-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоил)этил}]\}$ (V) фосфамиды АТР и GTP (VI), $\gamma n\text{-азидоанилид dTTP}$ (VII). Получение соединений (I–VI) осуществлено впервые с выходом 80–95 % в водно-органической среде с использованием на стадии активации окислительно-восстановительной пары трифенилфосфин/2,2'-дипиридилдисульфид. Для предотвращения

взаимодействия азидогруппы с трифенилфосфином стадии активации и аминолиза были разделены.

2. Показано, что

- стабильность фосфамидной связи в γ -амидофосфатах NTP в водных растворах при нейтральных значениях pH определяется природой гетероциклического основания и структурой фотоактивируемой группы: соединение (V) гидролизуетс~~я~~ с регенерацией АТФ и исходного арилазида, а фотоактивируемые производные (I–IV) и (VI) устойчивы. По данным компьютерного моделирования только в соединении (V) одна из конформаций, соответствующая минимуму энергии, обеспечивает достаточное сближение фосфамидной связи с остатком аденина. Предложен механизм гидролиза соединения (V) с участием остатка гетероциклического основания.

- в условиях проведения транскрипции (2.5 мМ дитиотреит, pH 7.0) азидная функция фотоактивируемых γ -амидофосфатов NTP (I–IV) устойчива к восстановлению дитиотреитом, а реагенты на основе *n*-азидотетрафторбензойной кислоты восстанавливаются тиолсодержащим соединением.

3. Впервые в условиях специфической инициации транскрипции, осуществляемой под контролем позднего промотора аденовируса, показано, что соединения (I–IV) обладают свойствами иницирующего субстрата для РНК-полимеразы II. Однако при фотоаффинной модификации в условиях компетентного мечения, образование ковалентных аддуктов между белковыми компонентами транскрипционного комплекса и фотореагентами не регистрируется. В случае реагента (II), одной из причин не обнаружения его в составе конъюгата, может быть расщепление P_{γ} - P_{β} фосфоангидридной связи, что было обнаружено при анализе продуктов фотолиза этого аналога субстрата.

4. Обнаружено, что γ -*n*-азидоанилид dTTP (VII) выступает в качестве ингибитора смешанного типа в реакции матричного синтеза ДНК, катализируемой ДНК-полимеразой I *E. coli* и фрагментом Кленова. При облучении репликативного комплекса в присутствии соединения (VII) или при добавлении к комплексу продуктов его фотолиза наблюдается инактивация ферментов. Наличие инактивации при взаимодействии ДНК-полимеразы с предоблученным реагентом свидетельствует, что частицей, модифицирующей белки, является не нитрен, а продукт взаимодействия его с водой – γ -(*n*-бензохинониминоимид) dTTP. Темновая стадия модификации в случае ДНК-полимеразы I *E. coli* протекает с образованием ковалентного белково-нуклеинового

комплекса в результате 1,4-присоединения нуклеофильной группы белка к производному *n*-бензохинондиимина. Для фрагмента Кленова предложен механизм 1,2-присоединения его к иминогруппе хиноидной структуры, с последующим элиминированием меченого фосфамида dTTP из состава конъюгата.

5. Впервые в условиях специфической инициации транскрипции, осуществляемой под контролем позднего промотора аденовируса, изучена фотоаффинная модификация РНК-полимеразы II фосфорилирующим аналогом иницирующего субстрата с цвиттер-ионной 5'-концевой группой, содержащей остаток 4-*N,N*-диметиламинопиридина (VIII). Обнаружено, что как в условиях сверхселективного аффинного мечения, так и в классическом варианте мечению подвергается полипептид с молекулярной массой 45 kDa. Полученные результаты указывают на то, что этот полипептид локализован в области активного центра белкового комплекса, осуществляющего транскрипцию.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Кудряшова Н.В., Шаманина М.Ю., Годовикова Т.С., Ананько Е.А., Ахмадиева Ф.Ф., Ромащенко А.Г. Особенности взаимодействия ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* и ее большого фрагмента с γ -*n*-азидоанилидом dTTP. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 224–233.
2. Савинкова Л.К., Соколенко А.А., Рау В.А., Аршинова Т.В., Герасимова Ю.В., Кудряшова Н.В., Годовикова Т.С. Аффинное мечение РНК-полимеразы II в транскрипционно активном комплексе фосфорилирующим аналогом иницирующего субстрата. // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 1334–1340.
3. Кнорре Д.Г., Кудряшова Н.В., Попова Т.В., Шакиров М.М., Мальшакова В.С., Шпенев О.Е., Савинкова Л.К., Серебрякова М.В., Годовикова Т.С. Фотоактивируемые аналоги иницирующего субстрата РНК-полимеразы II на основе арилазидных производных γ -амидофосфатов NTP: синтез, химические и фотохимические реакции функциональных групп. // Биоорган. химия. 2005. Т. 31. С. 372–384.

Изд. лиц. ИД № 04060 от 20.02.2001.
Подписано к печати и в свет 20.10.2005.

Формат 60х84/16. Бумага № 1. Гарнитура "Times New Roman".
Печать офсетная. Печ. л. 1,1. Уч.-изд. л. 1,0. Тираж 100. Заказ № 157.

Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
Просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090

№ 21 - 5 .

РНБ Русский фонд

2006-4

22884