

18. Byars N., Kidson C. DNA chain termination by 2',3'-dideoxythymidine in replicating mammalian cells.— *Biochemistry*, 1975, 14, № 14, p. 3159—3164.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва  
Ленинград. ин-т ядерной физики им. Б. П. Константинова  
АН СССР, Гатчина

Получено 16.07.84

УДК 577.123

## ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ 3'-ДЕЗОКСИ-3'-АМИНОТИМИДИНА В КЛЕТКАХ МИЕЛОМЫ МЫШИ $p_38Ag653$ В КУЛЬТУРЕ И ВКЛЮЧЕНИЕ ЕГО В ДНК

С. В. Кочеткова, М. К. Куханова, А. А. Краевский

**Введение.** 2',3'-Дидезокси-3'-аминонуклеозиды, в отличие от своих рибоаналогов, изучены в клеточных системах очень мало [1]. Показано, что даТ эффективно ингибировал рост ряда клеток млекопитающих в культуре, а именно: саркомы мышей 180 и лейкемии мышей L1210, а также клеток, зараженных вирусом герпеса 1 [2]. Высокой цитотоксичностью по отношению к ряду культур клеток (мышь L1210, человека D-98) обладали даС и даТ [3, 4]. Включение [ $^3H$ ] тимидина в ДНК в клетках мыши L1210 ингибировал даС [4], в растущих эмбрионах морских ежей — даТ и даА [5]. Все эти данные косвенно показывают, что даN ингибируют биосинтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразами, однако строгих доказательств получено не было.

В то же время даNTP в системах *in vitro* эффективно ингибировали синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразами I из *E. coli* ( $\alpha$  — из тимуса теленка и  $\beta$  — из печени крыс) [6]. Эти соединения реагировали с 3'-концом растущей цепи, причем остаток даNMP включался в цепь, прерывал дальнейшую полимеризацию и выступал таким образом в качестве терминатора.

Кроме того, было найдено, что даNTP являются мощными ингибиторами репликации в ядрах эмбрионов морских ежей *in vitro* [7] и репарации в  $\gamma$ -облученном хроматине из печени крыс *in vitro* [8].

В этой работе показано, что [ $^3H$ ]даТ проникает в клетки миеломы мышей  $p_38Ag653$  в культуре, подвергается фосфорилированию, трифосфорилированию и, включаясь в ДНК, терминирует элонгацию цепей.

**Материалы и методы.** [ $^3H$ ]тимидин фирмы «Изотоп», СССР, удельная радиоактивность 26,8 Ки/ммоль; [ $^3H$ ]даТ был получен из даТ в Ин-те химической физики АН СССР В. А. Шишковым с сотр., удельная радиоактивность 0,071 Ки/ммоль. Свидетели даТ, даTMP и даTTP, а также их флюорескаминные производные получены по [9, 10]. Клетки миеломы мыши  $p_38Ag653$  были предоставлены Г. Т. Богачевой, ВКНЦ АМН СССР. Фильтры GF/C и бумага DE-81 фирмы «Whatman», Англия.

Включение [ $^3H$ ]тимидина, или [ $^3H$ ]даТ, в ДНК определяли, согласно [11]. После остановки реакции охлаждением в бане со льдом клетки отмывали изотоническим раствором, лизировали водой, лизат наносили на фильтры GF/C, промывали фильтры холодной 5 %-ной ТХУ с 1 % пиродифосфата натрия, затем этанолом, высушивали и просчитывали радиоактивность в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 («Intertechique», Франция).

Анализ продуктов фосфорилирования [ $^3H$ ]даТ в клетках. Суспензию клеток (500—700 тыс. клеток в 100 мкл) инкубировали с [ $^3H$ ]даТ при 37 °С 2 ч, клетки обрабатывали, как описано выше. 0,05 мл лизата клеток центрифугировали

Сокращения: 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозиды (даN) с основаниями тимин (даТ), цитозин (даС), аденин (даА) и гуанин (даG); соответственно даNMP, даNDP и даNTP — 5'-моно-, 5'-ди- и 5'-трифосфаты 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозидов с теми же основаниями.

при 15000 об/мин, супернатант наносили на бумагу DE-81 и хроматографировали в 0,6 М формиате аммония (рН 3,4). Определяли радиоактивность хроматографических фракций, просчитывая полоски по 0,6—0,7 см.

**Результаты и обсуждение.** Фосфорилирование и трифосфорилирование  $[^3\text{H}]d\text{T}$ . Результаты анализа хроматограмм показаны на рис. 1, откуда видно, что пик 1 соответствует  $da\text{TMP}$ , пик 2 и последующий подъем в области стартовой зоны отвечают, по-видимому,  $da\text{TDP}$  и  $da\text{TTP}$ , а также растворимой фракции ДНК. Окраши-

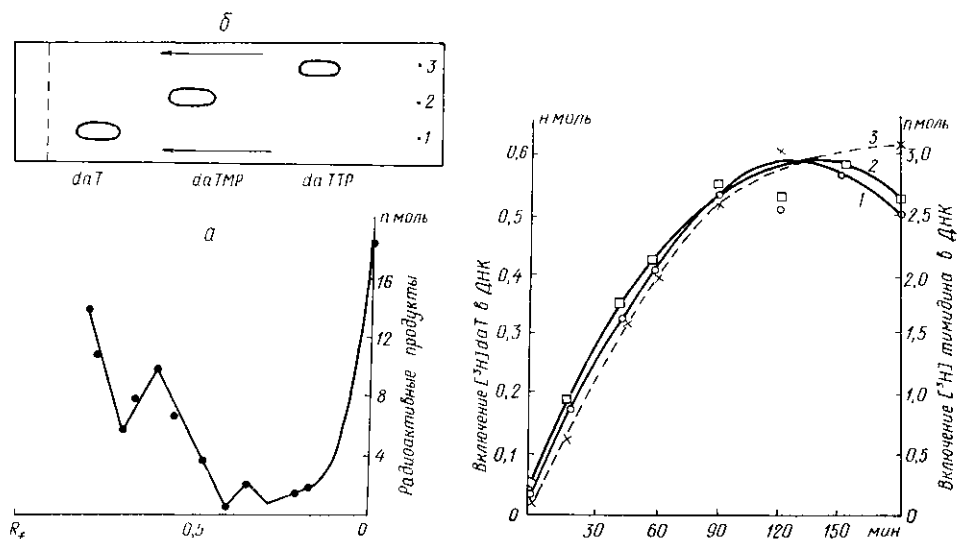


Рис. 1. Хроматограмма радиоактивных продуктов инкубации клеток с  $[^3\text{H}]d\text{T}$  (а); б — положение свидетелей  $da\text{T}$  (1),  $da\text{TMP}$  (2) и  $da\text{TTP}$  (3).

Fig 1. Paper chromatography of incubation products of the mouse myeloma cells with  $[^3\text{H}]d\text{T}$  (а); б — controls  $da\text{T}$  (1),  $da\text{TMP}$  (2) and  $da\text{TTP}$  (3).

Рис. 2. Зависимость включения радиоактивной метки в ДНК от времени инкубации клеток  $[^3\text{H}]d\text{T}$  (1) и то же в присутствии тимина (2); 3 — контрольное включение  $[^3\text{H}]$  тимидина в ДНК.

Fig. 2. Time dependence of  $[^3\text{H}]d\text{T}$  (1) incorporation into DNA and the same in the presence of thymidine (2); 3 —  $[^3\text{H}]$  thymidine incorporation into DNA (control).

вание флюорескаминоном применено нами для того, чтобы выявить в продуктах фосфорилирования аминогруппу в дезоксирибозном остатке, способную окрашиваться [10]. И действительно, в лизате клеток, обработанном 5 мкл 10 %-ного раствора флюорескамина в диоксане при рН 8—9, значительное количество радиоактивности (30—50 %) изменило свое положение на хроматограммах и там же найдены на уровне свидетелей  $da\text{T}$ -флюорескаминил,  $da\text{TMP}$ -флюорескаминил и т. д. (данные не приводятся).

Показанная на рис. 1 картина повторялась в общих чертах и в опытах с более коротким временем инкубации  $[^3\text{H}]d\text{T}$  с клетками. При рассмотрении рис. 1 хорошо видно образование  $da\text{TMP}$  и значительно менее выражены  $da\text{TDP} + da\text{TTP}$ . Это можно объяснить тем, что скорость лимитирующей стадией синтеза  $da\text{TTP}$  является введение второго фосфатного остатка в  $da\text{T}$ .

Включение  $[^3\text{H}]d\text{T}$  в ДНК. На рис. 2 показана кривая (1) нарастания радиоактивности в суммарной ДНК, осажденной после лизиса клеток 5 %-ным раствором ТХУ. Видно, что оптимум включения соответствует 2—2,5 ч. В других опытах оптимум времени колеблется от 1,5 ч до 2 ч, что, по-видимому, зависит от жизнеспособности клеток. Для сравнения приведена кривая (3) включения  $[^3\text{H}]$  тимидина.

Поскольку локализация тритиевых атомов в  $[^3\text{H}]d\text{T}$  неизвестна, (мечеными могут быть как основание, так и модифицированная дезок-

сирибоза), нами проведен контрольный опыт по включению  $[^3\text{H}]\text{daT}$  в ДНК в присутствии 5-кратного избытка холодного тимина. Мы не исключали существования в клетках какой-либо транскриптазной активности и возможности вследствие этого образования радиоактивного тимидина по схеме:  $[^3\text{H}]\text{daT} \rightarrow [^3\text{H}]\text{тимин} \rightarrow [^3\text{H}]\text{тимидин}$ . В этом случае избыток холодного тимина в пять раз понизил бы удельную радиоактивность  $[^3\text{H}]\text{тимидина}$ . Однако, как видно из сравнения кривых 1 и 2, никакого понижения включения радиоактивности в ДНК не

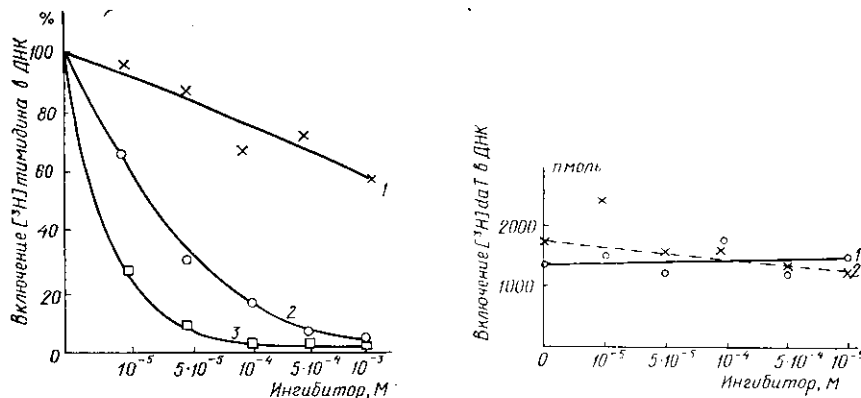


Рис. 3. Зависимость включения  $[^3\text{H}]\text{тимидина}$  в ДНК от концентрации ингибиторов: daT (1), daC (2), araC (3). 100% включения соответствуют  $10-15 \cdot 10^4$  имп/мин.

Fig. 3.  $[^3\text{H}]\text{Thymidine}$  incorporation into DNA in the presence of various concentrations of inhibitors: daT (1), daC (2), araC (3). 100% incorporation corresponds to  $10-15 \cdot 10^4$  cpm.

Рис. 4. Зависимость включения  $[^3\text{H}]\text{daT}$  в ДНК от концентрации araC (1) или daC (2) в инкубационной среде.

Fig. 4.  $[^3\text{H}]\text{daT}$  incorporation into DNA in the presence of araC (1) or daC (2).

наблюдали. Таким образом, остается допустить лишь путь фосфорилирования daT в daTTP и включение его в ДНК.

Ингибирование синтеза ДНК в клетках при действии daT, daC или araC. Как видно из рис. 3, daC и araC весьма эффективно подавляют включение  $[^3\text{H}]\text{тимидина}$  в ДНК; это соответствует полученным нами ранее данным [5]. Ингибирование синтеза ДНК с помощью araC показывает, что  $[^3\text{H}]\text{тимидин}$  включается в ДНК, главным образом, в процессе репликативного синтеза ДНК [12, 13], из чего следует, что daT ингибирует также репликативный синтез. В то же время daT блокировал включение  $[^3\text{H}]\text{тимидина}$  в ДНК значительно слабее, чем daC или araC, что, возможно, связано с конкуренцией daT и тимидина за одни и те же киназы в процессе их превращения в daTTP и TTP соответственно. Это наблюдение немного противоречит данным, полученным в опытах с эмбрионами морских ежей [5], но в целом картины ингибирования синтеза ДНК с помощью daN для клеток миеомы и эмбрионов морских ежей мало различаются.

Ингибирование синтеза ДНК при действии daTTP может проходить по механизму терминирования (как видно из рис. 2, нами показано включение daT в ДНК). Однако нельзя было исключить, что daTTP проявляет слабые субстратные свойства (подобно araCTP) и тем самым ингибирует валовый синтез ДНК. Чтобы выбрать между двумя этими возможностями, мы изучили влияние daC и araC на включение  $[^3\text{H}]\text{daT}$  в ДНК (рис. 4). Если бы daTTP обладал слабыми субстратными свойствами и медленно включался внутрь цепи ДНК, araCTP (образующийся в клетках из araC), а также daCTP (получающийся *in vivo* из daC) должны были бы ингибировать включение  $[^3\text{H}]\text{daTTP}$ .

Однако, как мы видим из рис. 4, ни araC, ни daC совершенно не влияли на включение  $[^3\text{H}]\text{daT}$  даже при концентрации, превышающей

концентрацию даТ в два раза. Это подтверждает объяснение действия даТ как терминатора элонгации цепи. И действительно, поскольку агаС или даС включаются в положение цепи ДНК, кодируемое остатком гуанина, а даТ — кодируемое остатком аденозина матрицы, оба эти соединения не мешают даТ встроиться в 3'-конец цепи ДНК и таким образом терминировать рост цепи ДНК. В равной мере даТ не должен был бы ингибировать включение даС. Каждый из них конкурентов бы в реакции синтеза ДНК только с одноименным по природе основания субстратом, а именно: даТТР с ТТР, даСТР с дСТР. Поэтому эффект двух терминаторов даС+даТ на синтез ДНК должен быть равным эффекту каждого из них в отдельности. Именно эту картину мы наблюдали ранее при ингибировании синтеза ДНК в эмбрионах морских ежей [5], когда даТ+даА ингибировали синтез ДНК в той же степени, что и каждый из них в отдельности.

PHOSPHORYLATION OF 3'-DEOXY-3'-AMINOTHYMININE  
IN THE MOUSE MYELOMA *p3Ag653* CELL CULTURE  
AND ITS INCORPORATION INTO DNA

S. V. Kochetkova, M. K. Kukhanova, A. A. Kravetsky

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The tritium-labelled 3'-deoxy-3'-aminothymidine, an inhibitor of DNA biosynthesis, was shown to penetrate into the mouse myeloma *p3Ag653* cell culture. Later on it is phosphorylated, triphosphorylated and incorporated into DNA, causing the termination of its elongation.

1. *Suhadolnik R. J.* Naturally occurring nucleoside and nucleotide antibiotics.—*Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, 1979, **22**, p. 193—291.
2. *Lin T. S., Prusoff W. H.* Synthesis and biological activity of several amino analogues of thymidine.—*J. Med. Chem.*, 1978, **21**, N 1, p. 109—112.
3. *3'-Amino-2',3'-dideoxyribonucleosides* of some pyrimidines: synthesis and biological activities / T. A. Krenitsky, G. H. Freeman, S. R. Shaver et al.—*J. Med. Chem.*, 1983, **26**, N 6, p. 891—895.
4. *Lin T. S., Mancini W. R.* Synthesis and antineoplastic activity of 3'-azido and 3'-amino analogues of pyrimidine deoxyribonucleoside.—*J. Med. Chem.*, 1983, **26**, N 4, p. 544—548.
5. Ингибирование биосинтеза ДНК в эмбрионах морских ежей с помощью 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозидов / М. К. Куханова, С. В. Кочеткова, А. А. Краевский и др.—*Биохимия*, 1983, **48**, № 10, с. 1747—1751.
6. *2',3'-Deoxy-3'-aminonucleoside-5'-triphosphates* are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases / Z. Chidgevadze, R. Beabealashvili, A. Atrazev et al.—*Nucl. Acids Res.*, 1984, **12**, N 3, p. 1671—1686.
7. Ингибирование репликативного синтеза ДНК в ядрах эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-трифосфатами / М. К. Куханова, А. А. Краевский, Н. А. Терентьева, В. А. Рассказов.—*Биополимеры и клетка*, 1985, **1**, № 2, с. 79—86.
8. 2',3'-Дидезокси-3'-аминонуклеозид-5'-трифосфаты ингибируют репаративный синтез ДНК в хроматине из печени крыс / А. А. Краевский, М. К. Куханова, Л. А. Александрова и др.—*Биополимеры и клетка*, 1985, **1**, № 3, с. 125—131.
9. Аминонуклеозиды и их производные. XI. Синтез 3'-амино-2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов / В. Е. Зайцева, Н. Б. Дяткина, А. А. Краевский и др.—*Биоорганическая химия*, 1984, **10**, № 5, с. 670—680.
10. Аминонуклеозиды и их производные. X. 2'-Дезоксинуклеозидфосфаты и 2'-дезоксинуклеотиды с фосфамидными связями / В. Е. Зайцева, Н. В. Скапцова, А. В. Ажаев, А. А. Краевский.—*Биоорганическая химия*, 1984, **10**, № 3, с. 401—407.
11. *Byars N., Kidson C.* RNA chain termination by 2',3'-dideoxythymidine in replicating mammalian cells.—*Biochemistry*, 1975, **14**, N 14, p. 3159—3164.
12. *Graham F. L., Whitmore G. F.* Studies in mouse L-cells on the incorporation of 1-β-arabinofuranosylcytosine into DNA and inhibition of DNA polymerase by 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate.—*Cancer Res.*, 1970, **30**, N 11, p. 2627—2635.
13. *Cozzarelli N. R.* The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis.—*Ann. Rev. Biochem.*, 1979, **46**, p. 641—668.

Ин-т молекулярной биологии АН СССР, Москва

Получено 16.07.84