



УДК 577.152.277*7'136

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА ЭУКАРИОТ И ПРОКАРИОТ II. РОЛЬ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ ФОСФАТНЫХ ГРУПП МАТРИЦЫ В ЕЕ СВЯЗЫВАНИИ С ФЕРМЕНТОМ

Невинский Г. А., Левина А. С., Подуст В. Н.,
Лаврик О. И.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Из зависимостей скоростей инаktivации ДНК-полимеразы α плаценты человека аффинным реагентом $d(pT)_2pC[Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$ от концентрации использованных в качестве матриц олиготимидилатов различной длины следует, что минимальными участками связывания матрицы являются триэтилфосфат (K_d 600 мкМ) и ортофосфат (K_d 53 мкМ). При переходе от ортофосфата к $d(pT)$ и затем к олиготимидилатам $d(Tr)_nT$, где n изменяется от 1 до 14, средство лигандов при увеличении длины на одну мономерную единицу возрастает в 1.71 раза. Частичное этилирование межнуклеотидных фосфатных групп не изменяет эффективность связывания олиготимидилатов с ферментом. При полном этилировании межнуклеотидных фосфатных групп наблюдается уменьшение срoдства фермента к олиготимидилатам в 7–9 раз, что сравнимо с изменением срoдства аффинного Pt^{2+} -реагента к ферменту в присутствии и в отсутствие ионов Mn^{2+} .

Предполагается, что одна из межнуклеотидных фосфатных групп матрицы образует с ферментом Me^{2+} -зависимый электростатический мостик (его образование соответствует изменению свободной энергии Гиббса $\Delta G = -1,1 \dots -1,4$ ккал/моль) и водородную связь с атомом кислорода Р=О-группы этого фосфатного остатка ($\Delta G = -4,4 \dots -4,5$ ккал/моль). Остальные межнуклеотидные фосфатные группы, а также, по-видимому, все основания матрицы ни водородных связей, ни электростатических контактов с ферментом не образуют.

Сравнение величин K_m для олиготимидилатов и их частично или полностью этилированных аналогов в качестве матриц в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразой α из плаценты человека и клеповским фрагментом ДНК-полимеразы I из *E. coli*, свидетельствует о близких закономерностях узнавания матриц этими ферментами.

В настоящее время в литературе практически отсутствуют данные о природе взаимодействия, т. е. типе связей, между ДНК-полимеразами (дезоксинуклеозидтрифосфат: ДНК дезоксинуклеотидилтрансфераза; ДНК-нуклеотидилтрансфераза, КФ 2.7.7.7) и матрицей, а также о минимальном участке матрицы, входящем в комплекс с ферментом. Для оценки срoдства олигонуклеотидов к ДНК-полимеразам недавно нами [1] был предложен аффинный реагент $d(pT)_2pC[Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$, который необратимо модифицирует на ферменте участок связывания матрицы, не затрагивая связывающий затравку участок белка. При помощи этого реагента найдены величины K_d различных олиготимидилатных матриц в присутствии и в отсутствие олигоаденилатных праймеров, а также величины K_d для затравок. Показано, что величины K_d для матриц при добавлении комплементарных им затравок заметным образом уменьшаются (возрастание срoдства матрицы к ферменту зависит от длины праймера). Однако соотношение между величинами K_d для двух матриц различной длины

Сокращения: Pt^{2+} -реагент — $d(pT)_2pC[Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$, производное *цис*-дихлордиаммиоплатины. Обозначения p' и p'' соответствуют тетраэдрическому атому фосфора, входящим в состав триэфирных производных и имеющих энантиомерную конфигурацию. Так как абсолютная конфигурация групп при атомах фосфора неизвестна, исходные изомеры (Tr)Tr(Et)T(Lev) обозначены в порядке эволюции с силикагеля (p' , а затем p'') [1, 2]. Эти обозначения сохранены для более длинных производных олиготимидилатов, полученных на основе индивидуальных диастереомеров динуклеотидов.

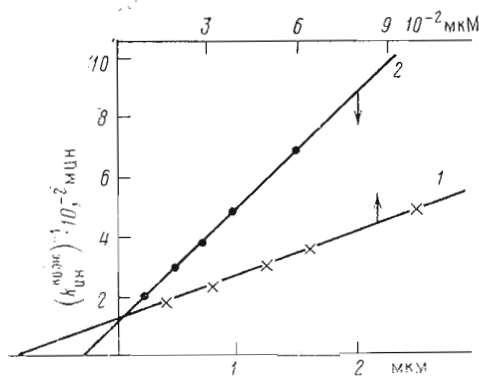


Рис. 1

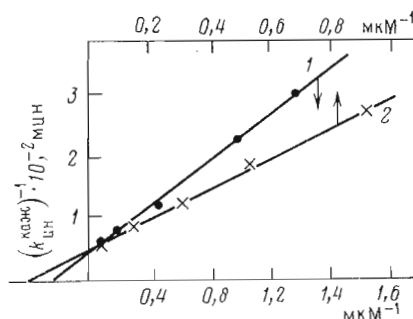


Рис. 2

Рис. 1. Зависимости обратных величин $k_{\text{ин}}^{\text{каж}}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы α от концентрации $d(\text{Tr})_{14}\text{T}$ (1) и $d[\text{Tr}(\text{Et})]_{14}\text{T}$ (2) при фиксированной концентрации $d(\text{pT})_{2}\text{pC}(\text{Pt}^{2+})(\text{pT})_7$ (Pt^{2+} -реагента) 1 мкМ

Рис. 2. Выраженные в двойных обратных координатах зависимости величин $k_{\text{ин}}^{\text{каж}}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы α от концентрации Pt^{2+} -реагента в отсутствие (1) и в присутствии (2) 0,12 мМ MnCl_2

соответственно в присутствии и в отсутствие одного и того же праймера является величиной постоянной. Величины K_m для матриц в реакции полимеризации и величины K_d для них, найденные при помощи аффинного реагента (при использовании в обоих случаях одного и того же комплементарного праймера), различаются лишь в 1,5–2 раза [1].

В работах [2, 3] для исследования роли межнуклеотидных фосфатных групп в связывании праймеров с ДНК-полимеразой I из *E. coli* и ДНК-полимеразой α из плаценты человека были использованы индивидуальные диастереомеры этиловых эфиров олиготимидилатов и олигонуклеотиды, полностью этилированные по межнуклеотидным фосфатным группам. В данной работе этилированные аналоги олиготимидилатов использованы для исследования возможных электростатических взаимодействий межнуклеотидных фосфатных групп матриц с участками их связывания на ДНК-полимеразе. Если такие взаимодействия определяют связывание фермента с матрицами, то модификация межнуклеотидных фосфатных групп олиготимидилатов должна приводить к уменьшению их сродства к ферменту по сравнению с немодифицированными матрицами.

Из зависимостей обратных величин $k_{\text{ин}}^{\text{каж}}$ инактивации ДНК-полимеразы α от концентрации $d(\text{Tr})_{14}\text{T}$ и $d[\text{Tr}(\text{Et})]_{14}\text{T}$ при фиксированной концентрации Pt^{2+} -реагента (рис. 1) и из аналогичных зависимостей для других тимидилатов были рассчитаны величины K_d комплексов фермента с олиготимидилатами $d(\text{Tr})_7\text{T}$, $d(\text{Tr})_9\text{T}$, $d(\text{Tr})_{14}\text{T}$, а также с их полностью или частично этилированными аналогами (табл. 1). Видно, что величины K_d для полностью этилированных $d[\text{Tr}(\text{Et})]_7\text{T}$ и $d[\text{Tr}(\text{Et})]_{14}\text{T}$ в 7–9 раз больше, чем K_d для соответствующих им немодифицированных олиготимидилатов — $d(\text{Tr})_7\text{T}$ и $d(\text{Tr})_{14}\text{T}$. Очевидно, что модифицированные межнуклеотидные фосфатные группы олиготимидилатов не могут образовывать электростатические контакты с белком, что, вероятно, приводит к снижению его сродства к модифицированным матрицам.

Как видно из табл. 1, этилирование одной межнуклеотидной фосфатной группы в диастереомерах $d(\text{Tr})_8\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ и $d(\text{Tr})_8\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$, а также этилирование четырех из семи межнуклеотидных фосфатных групп в изомерах $d[\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ и $d[\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ не уменьшает сродство этих этилированных олиготимидилатов к ферменту по сравнению с немодифицированными матрицами той же длины. Величины K_d для частично этилированных октатимидилатов почти такие же, как K_d для $d(\text{Tr})_7\text{T}$. Отсутствие уменьшения сродства образования комплексов фермента с частично этилированными матрицами по сравнению с их немодифицированными аналогами может указывать на то, что не все меж-

Величины констант диссоциации K_d комплексов ДНК-полимеразы α из плаценты человека с различными лигандами *

Лиганд	K_d , мкМ	Лиганд	K_d , мкМ
$(C_2H_5O)_3PO$	600	$d[Tr'(Et)Tr]_3Tr'(Et)T$	0,33
KH_2PO_4	53	$d[Tr''(Et)Tr]_3Tr''(Et)T$	0,39
$d(Tr)$	25	$d[Tr(Et)]_7T$	2,8
$d(pT)$	15	$d(Tr)_9T^{**}$	0,15
$d(pT)_2$	8,3	$d(Tr)_8Tr'(Et)T$	0,12
$d(pT)_3$	5,3 **	$d(Tr)_8Tr''(Et)T$	0,13
$d(pT)_5$	2,2	$d(Tr)_{10}T^{**}$	0,077
$d(pT)_7$	0,73 **	$d(Tr)_{14}T^{**}$	0,0091
$d(Tr)_7T$	0,40 **	$d[Tr(Et)]_{14}T$	0,081

* Ошибка в расчете констант не превышает 20%.

** Данные работы [1].

нуклеотидные фосфатные группы матриц необходимы для электростатических взаимодействий с ферментом.

Следует отметить, что для комплексообразования фермента с затравками и их этилированными аналогами наблюдается другая закономерность. Этилирование единственного, первого с 3'-конца межнуклеотидного фосфатного остатка затравки уменьшает сродство к ней фермента в 7–8 раз [2, 3], т. е. на величину, сопоставимую с наблюдаемой лишь для полностью этилированных матриц.

Известно, что реакции полимеризации, катализируемые ДНК-полимеразой из всех источников, не протекают в отсутствие ионов двухвалентных металлов — Mn^{2+} или Mg^{2+} . В работе [4] показано, что ДНК-полимераза I из *E. coli* обладает 4 или 5 центрами связывания Me^{2+} . Эти данные указывают на возможность электростатических взаимодействий между ферментом и матрицами при помощи мостиков из ионов двухвалентных металлов. Для проверки этого предположения мы сравнили сродство Pt^{2+} -аффинного реагента к ДНК-полимеразе α в отсутствие и в присутствии Mn^{2+} . Как видно из рис. 2, сродство реагента к ферменту в присутствии марганца ($K_d=0,5$ мкМ) в 8 раз выше, чем в его отсутствие ($K_d=4$ мкМ). Таким образом, снижение сродства, вызванное отсутствием Mn^{2+} и этилированием межнуклеотидных фосфатных групп, сравнимо. Это, возможно, свидетельствует в пользу того, что электростатические взаимодействия фермента с матрицей осуществляются при участии кофакторов — Mg^{2+} или Mn^{2+} . Из разницы в величинах K_d (7–9 раз) можно оценить изменение свободной энергии Гиббса $\Delta G=-1,1-1,2$ ккал/моль и величину $K_d=0,11-0,12$ М, характеризующие сродство ДНК-полимеразы к матрице за счет электростатических взаимодействий.

Ранее в работе [1] были рассчитаны величины K_d для комплексов ДНК-полимеразы α из плаценты человека с олиготимидилатами, содержащими от 3 до 15 мононуклеотидных звеньев. В данной работе сделана оценка сродства фермента к участку связывания дитимидилата $d(pT)_2$, тимидилатов $d(pT)$ и $d(Tr)$, а также фосфата (см. рис. 3).

Величины K_d комплексов фермента со всеми исследованными лигандами (найденные ранее [1] и в данной работе) приведены в табл. 1 и представлены на рис. 4 в виде зависимости $\lg K_d$ от длины олигонуклеотида. Видно, что эта зависимость линейна. Величина K_d , полученная для нуклеозидмонофосфата экстраполяцией кривой до значения $n=1$, на оси абсцисс равна 15 мкМ, что хорошо коррелирует с экспериментально найденным значением K_d (15 мкМ) для $d(pT)$ и несколько хуже с величиной K_d (25 мкМ) для $d(Tr)$. Величина K_d , полученная экстраполяцией до пересечения с осью ординат ($n=0$), соответствует экспериментально найденной величине K_d для комплекса фермента с неорганическим фосфатом. При переходе от него к $d(pT)$ и далее от $d(pT)$ к олигонуклеотидам, содержащим от 2 до 15 мононуклеотидных звеньев, при увеличении длины

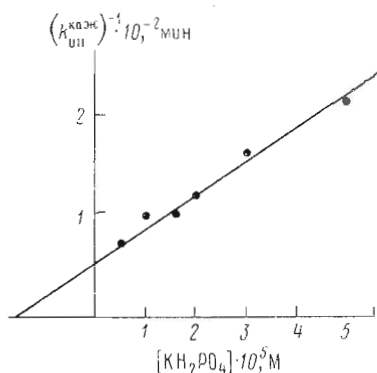


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость обратных величин $k_{ин}^{каж}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы α от концентрации KH_2PO_4 при фиксированной концентрации $d(pT)_2pC(Pt^{2+})(pT)_7$ 1 мкМ

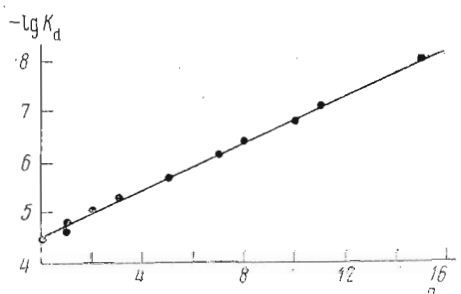


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость величин $\lg K_d$ комплексов ДНК-полимеразы α с олиготимидилатами и другими лигандами от числа (n) мононуклеотидных звеньев в олигонуклеотиде. При значении $n=0$ величина K_d соответствует KH_2PO_4 , при $n=1 - d(pT)$ и $d(Tp)$

на одно мономерное звено наблюдается возрастание сродства к ферменту почти в 1,7 раза. Линейное изменение величины $\lg K_d$ от n (от фосфата до пентадекатимидилата $d(Tp)_{14}T$) свидетельствует в пользу образования только одного Me^{2+} -зависимого мостика между ферментом и матрицей.

В работе [1] уже обсуждался тот факт, что изменение в 1,7 раза сродства фермента к матрице при удлинении ее цепи на одно мономерное звено соответствует изменению свободной энергии Гиббса на $-0,32$ ккал/моль. Поскольку это изменение существенно меньше, чем обычно наблюдаемое при появлении электростатических взаимодействий или водородных связей между ферментами и их лигандами [5], разумно предположить, что 14 из 15 мононуклеотидных звеньев $d(Tp)_{14}T$ не участвуют в электростатических взаимодействиях и не образуют водородные связи. Изменение свободной энергии Гиббса ΔG на $-0,32$ ккал/моль сравнимо с соответствующими величинами для слабых гидрофобных взаимодействий ферментов с лигандами [5] и для переноса тимины из воды в 6 М водный метанол ($-0,43$ ккал/моль [6]). Рассмотренные данные не позволяют полностью исключить возможность установления между ферментом и матрицей взаимодействий других типов. Однако, как нам кажется, величина $\Delta G = -0,32$ ккал/моль отражает выигрыш в энергии при переносе одного нуклеотидного звена олиготимидилатных матриц из водного окружения в гидрофобную полость фермента.

Следует сопоставить величину $K_d = 53$ мкМ для комплекса фермента с ортофосфатом с уменьшением сродства фермента к полностью этилированным олиготимидилатам (в 7–9) и с того же порядка (в 8 раз) увеличением сродства к Pt^{2+} -реагенту в присутствии Mn^{2+} . Если бы сродство фермента к фосфату определялось только образованием Me^{2+} -мостика, то при блокировании всех межнуклеотидных фосфатных групп сродство полимеразы к олиготимидилатам, как следует из величины K_d для фосфата, равной 53 мкМ, должно было уменьшиться на 4–4,5 порядка, а не в 7–9 раз, как это наблюдается в эксперименте. Следовательно, можно предположить возможность образования наряду с Me^{2+} -зависимым электростатическим взаимодействием водородной связи между кислородом $P=O$ -группы и ферментом. Для проверки этого предположения было проведено сравнение сродства фермента к ортофосфату и триэтилфосфату. Комплекс полимеразы с триэтилфосфатом имел $K_d = 600$ мкМ (табл. 1), что в 11,3 раза больше величины K_d для ортофосфата. Следовательно, этилирование межнуклеотидных фосфатных групп или собственно самого фосфата приводит к сопоставимому изменению величины K_d (7–9 и 11,3 раза). Из сравнения величин K_d для неэтилированных, частично или

полностью этилированных олиготимидилатов видно, что алкильные группы, связанные с межнуклеотидной фосфатной группой матрицы (за исключением одной из них, блокирующей отрицательный заряд атома кислорода межнуклеотидного фосфата, образующего с ферментом Me^{2+} -зависимый электростатический мостик), существенного вклада в сродство матрицы к ферменту не вносят. В связи с этим эффективное связывание триэтилфосфата с ДНК-полимеразой может происходить, вероятно, только за счет образования связи между белком и атомом кислорода $P=O$ -группы триэтилфосфата. Атом кислорода этой группы способен образовывать с белком водородную связь. Величину ΔG образования такой связи между межнуклеотидной фосфатной группой и ферментом можно оценить равной $-4,4 \dots -4,5$ ккал/моль. Эта величина сопоставима с величинами ΔG для образования водородных связей между белками и лигандами [5].

Из совокупности полученных данных можно сделать вывод, что одна из межнуклеотидных фосфатных групп образует с ферментом водородную связь, а также взаимодействует электростатическим способом. Действительно, если молекула лиганда взаимодействует с биополимером несколькими типами связей, то величина K_a , отражающая общее сродство лиганда к полимеру, может быть получена путем перемножения величин K_a , характеризующих отдельные типы взаимодействий. Величина ΔG образования комплекса белка с лигандом в этом случае равна сумме величин ΔG , относящихся к отдельным типам связей. Именно такая ситуация наблюдается при взаимодействии ДНК-полимеразы с ортофосфатом. Величина K_a для фосфата равна произведению величин K_a для триэтилфосфата (характеризует образование водородной связи) и K_a , относящейся к образованию Me^{2+} -зависимого электростатического контакта ($0,11-0,12$ M). В альтернативном случае взаимодействие фермента с ортофосфатом и $d(pT)$ характеризовалось бы двумя величинами K_a , близкими к 600 мкM и $0,11-0,12$ M. В пользу образования водородной связи и установления электростатического взаимодействия фермента только с одной из межнуклеотидных фосфатных групп свидетельствует монотонное возрастание сродства при увеличении длины матрицы. Иначе говоря, один из межнуклеотидных фосфатных остатков «закрепляется» на ферменте двумя типами связей: электростатической и водородной.

В связи с этим следует отметить, что для ряда других ферментов, взаимодействующих с лигандами, содержащими фосфатные группы, фермент также образует с ними водородные связи и электростатические контакты. Например, связывание такого рода характерно для системы NAD с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой [5] и для олигонуклеотидов с рибонуклеазой [7].

Представлялось целесообразным сравнить узнавание матрицы ДНК-полимеразой из эукариот и прокариот. Однако ДНК-полимераза I из *E. coli* обладает двумя выраженными дополнительными $3':5'$ - и $5':3'$ -экзонуклеазными активностями, что затрудняет исследование этого фермента с использованием Pt^{2+} -реагента. В то же время нуклеазные активности этого фермента не проявляются заметным образом при определении его активности по скорости реакции полимеризации [2]. В связи с этим мы провели сравнение матричных свойств этилированных и неэтилированных олиготимидилатов для ДНК-полимеразы α из плаценты человека и кленового фрагмента ДНК-полимеразы I из *E. coli* путем определения характерных для них величин K_m . Такое сравнение было оправданным, поскольку ранее нами в работе [1] было показано, что отношение величин K_m/K_a в присутствии затравки для матриц любой длины является величиной постоянной и равной $1,5-2,0$. На рис. 5 приведена зависимость скорости включения $[^3H]dAMP$ в затравку $(pA)_7$ от концентрации $d[Tr(Et)]_{14}T$ в координатах Эйзенштейна — Корнш-Боуден [8]. Рассчитанные для разных тимидилатов величины K_m и V даны в табл. 2. Соотношения между некоторыми величинами K_m приведены в табл. 3.

Видно, что при переходе от декатимидилата $d(Tr)_9T$ к $d(Tr)_{14}T$ изменение сродства олигонуклеотидов для ДНК-полимеразы α и кленового фрагмента совпадает (16,6 и 16,7 раза). Близкое изменение в величинах

Величины K_m для олиготимидилатов в качестве матрицы в присутствии $(pA)_7$ в качестве праймера для ДНК-полимеразы эукариот и прокариот *

Олиготимидилат	Фермент			
	кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I <i>E. coli</i>		ДНК-полимераза α плаценты человека	
	K_m , нМ	относительная V, %	K_m , нМ	относительная V, %
$d(Tp)_9T$	40	100	28	100
$d(Tp)_8Tp'(Et)T$	110	110	44	108
$d(Tp)_8Tp''(Et)T$	80	100	56	100
$d(Tp)_{14}T$	2,4	130	1,7	150
$d[Tp(Et)]_{14}T$	12	104	11	225

* Ошибка в расчете величин K_m не превышает 20%.

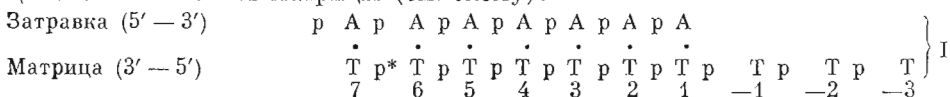
Таблица 3

Отношения величин K_m для некоторых олиготимидилатов, использованных в качестве матриц для ДНК-полимераз
Исходные величины K_m приведены в табл. 2

Отношение величин K_m для	Кленовский фрагмент ДНК-полимеразы I из <i>E. coli</i>	ДНК-полимераза α плаценты человека
$\frac{d[Tp(Et)]_{14}T}{d(Tp)_{14}T}$	5,0	6,5
$\frac{d(Tp)_8Tp'(Et)T}{d(Tp)_9T}$	2,8	1,6
$\frac{d(Tp)_8Tp''(Et)T}{d(Tp)_9T}$	2,0	2,0
$\frac{d(Tp)_9T}{d(Tp)_{14}T}$	16,7	16,5

K_m (5—6,5 раза) наблюдается для $d(Tp)_{14}T$ и ее полностью этилированного аналога $d[Tp(Et)]_{14}T$.

Как было показано выше, величины K_d комплексов ДНК-полимеразы с $d(Tp)_8Tp'(Et)T$ и $d(Tp)_8Tp''(Et)T$ почти такие же, как для комплекса с $d(Tp)_9T$, а величины K_m для этих диастереомеров декатимидилатов в присутствии затравки $(pA)_7$ всего лишь в 1,6—2,8 раза больше величины K_m для $d(Tp)_9T$. Однако, учитывая ошибку в определении K_m , которая в нашем случае не превышала 20%, и практически одинаковый характер изменения величины K_m при переходе от моноэтилированных декатимидилатов к $d(Tp)_9T$ в случае ДНК-полимеразы α и кленовского фрагмента, можно предполагать, что эта разница достоверна. Такая разница в величинах K_m могла наблюдаться лишь при строго определенном расположении участка связывания межнуклеотидной фосфатной группы матрицы на ферменте. Пронумеруем отдельные «микроучастки» полимеразы, контактирующие с мононуклеотидными единицами затравки и матрицы. Первый номер присвоим тому из них, с которым связывается первый с 3'-конца нуклеотид затравки, связанный в свою очередь уотсон-криковскими связями с соответствующим нуклеотидом матрицы. Включение [3H]dAMP в затравку $(pA)_7$ на матрице $d(Tp)_9T$ и ее аналогах возможно лишь в том случае, если на 5'-конце $d(Tp)_9T$ (связанном с зоной матричного участка, «микроучастки» которой обозначены цифрами с отрицательным знаком) в дуплексе $(pA)_7 \cdot d(Tp)_9T$ будет содержаться от 1 до 3 одноцепочечных звеньев матрицы (см. схему).



может быть связано как с различными условиями определения их активности, так и с исходной разницей в ферментах. Известно, что ДНК-полимеразы прокариот по сравнению с ДНК-полимеразами эукариот считают матрицы с большей скоростью. Однако совокупность данных, приведенных в табл. 2 и 3, свидетельствует о близких закономерностях узнавания матриц в этих системах. Ферменты из обоих источников проявляют близкое сродство к матрицам одинаковой длины. Увеличение сродства матрицы при ее удлинении совпадает для ДНК-полимеразы α с таковым для ДНК-полимеразы I. Полное или частичное этилирование межнуклеотидных фосфатных групп матриц приводит к одинаковому снижению их сродства по сравнению с неэтилированными олиготимидилатами как в первом, так и во втором случае, что указывает на одинаковую роль межнуклеотидных фосфатных групп в их связывании. Аналогичный вывод был сделан в работе [3] относительно механизма связывания и превращения праймеров ДНК-полимеразой α из плаценты человека и ДНК-полимеразой I из *E. coli*.

Совокупность результатов, полученных ранее [1–3] и в данной работе, указывает на то, что между ферментом и олигонуклеотидами как в участке связывания матрицы, так и в участке связывания «затравки» устанавливается по одному электростатическому контакту. Кроме Me^{2+} -зависимого мостика межнуклеотидная фосфатная группа матрицы образует с ферментом также водородную связь. Одним из минимальных участков связывания матрицы является нуклеозид-5'-монофосфат. Аналогичный вывод относительно участка связывания праймера сделан в работе [3]. Эффективность взаимодействия dTMP с рассматриваемыми участками ДНК-полимеразы α вполне сравнима ($K_a=25$ мкМ, $K_m=45$ мкМ соответственно). Между ферментом и матрицей кроме Me^{2+} -зависимого мостика и водородной связи наблюдаются дополнительные, вероятно гидрофобные, взаимодействия. При увеличении длины матрицы на одно звено сродство олигонуклеотида к ферменту увеличивается в 1,71 раза. Мононуклеотидные единицы праймера, согласно данным работы [3], кроме электростатического контакта первого с 3'-конца межнуклеотидного фосфата (и, возможно, водородной связи первого с 3'-конца нуклеотидного звена) не образует дополнительных связей с ферментом. Образование уотсон-криковских связей между затравкой и матрицей на ферменте приводит к возрастанию сродства олиготимидилатной затравки при увеличении ее длины на одно мономерное звено приблизительно в 1,8 раза [3], что соответствует изменению свободной энергии Гиббса при образовании одной А·Т-пары на $\Delta G=-0,35$ ккал/моль.

Экспериментальная часть

Препараты кленового фрагмента ДНК-полимеразы I из *E. coli* были любезно предоставлены С. Х. Дегтяревым (ВНИИМБ, Кольцово) и С. В. Мамаевым (НИБХ СО АН СССР, Новосибирск). Фермент был выделен из суперпродуцентного полученного генно-инженерным способом штамма *E. coli* и не содержал 5':3'-экзонуклеазную активность, характерную для ДНК-полимеразы I, а также примеси других нуклеаз. Удельная активность фермента составляла $3 \cdot 10^3$ ед/мг белка.

Препараты ДНК-полимеразы α из плаценты человека получали согласно работе [1]. Фермент был очищен в 1400 раз, но его удельная активность составляла лишь 610 ед./мг белка.

Во всех случаях за единицу полимеризующей активности принимали количество фермента, катализирующее включение 1 нмоль dNMP в кислотонерастворимый продукт за 1 ч при 37°С. В качестве матрично-затравочного комплекса использовали активированную на 25–30%, согласно [9], ДНК.

В работе использовали dATP, dTTP, dCTP, dGTP, poly(dA), ДНК из спермы лосося (НИКТИ БАН, Бердск), бычий сывороточный альбумин (Koch-Light, Англия), $MgCl_2$ и $MnCl_2$ (Merck, ФРГ), [3H]dTTP, [3H]dATP с удельными радиоактивностями 836 и 1400 ТБк/моль соответственно (Изотоп, СССР), остальные реактивы квалификации ос. ч. отечественного производства.

Препарат d(pT)₂ любезно предоставлен В. Н. Бунсвой, а (pA)₇ — А. Г. Вельяминовой (НИБХ СО АН СССР, Новосибирск). Синтез, доказательство структуры и определение коэффициентов молярного поглощения всех остальных использованных в работе олигонуклеотидов описаны в работах [1–3]. Получение и характеристики аффинного Pt^{2+} -реагента d(pT)₂pC(Pt^{2+})(pT) также описаны ранее в работе [1]. Все использованные олиготимидилаты были гомогенными, судя по данным ионо-

обменной и обращенно-фазовой хроматографии, проведенной при помощи хроматографа «Милхром» согласно описанным в работе [2] методикам.

Активность ДНК-полимеразы α в экспериментах по ее инактивации определяли следующим образом. Реакционная смесь объемом 50–70 мкл содержала: 50 мкМ трис-НСI-буфер (рН 8,0), 2 мМ $MgCl_2$, 0,3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 2 ОЕ₂₆₀/мл активированной на 30% ДНК (активацию осуществляли панкреатической ДНКазой согласно [9], 20 мМ dNTP (причем один из них — dATP или dTTP — содержал ³H и имел удельную активность 5–20 ТБк/моль). Все измерения проводили на линейных участках зависимостей накопления продуктов от времени (т. е. по начальным скоростям) и от концентрации фермента. Реакцию начинали добавлением 0,5–1,5 ед. акт. фермента и через 0,5–1,5 мин из реакционной смеси отбирали аликвоты, которые наносили на диски из бумаги FN-16. Предварительную и последующую обработку дисков проводили согласно работам [2, 3].

Модификацию ДНК-полимеразы α Pt^{2+} -реагентом проводили при 30° С согласно работе [1]. Инкубационная смесь объемом 50–100 мкл содержала 50 мМ трис-ацетатный буфер (рН 7,4), 0,12 мМ $MnCl_2$, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 10–15 ед. акт. ДНК-полимеразы α . Реакцию инактивации полимеразы начинали добавлением аффинного реагента, концентрация которого при определении защитных эффектов олиготимидилатов различной длины была равна 0,5 или 1,0 мкМ. Концентрации таких олиготимидилатов или других лигандов варьировали в широком диапазоне. Например, концентрации наиболее короткого d(Tr) и наиболее длинного d(Tr)₁₁T изменяли от 0 до 530 мкМ и от 0 до 0,07 мкМ соответственно. Аликвоты (по 5–10 мкл) инкубационной смеси отбирали через каждые 10–20 мин в течение 60–90 мин и вносили в смеси для определения полимеразной активности фермента (см. выше). По кинетическим кривым включения меченых dNMP в ДНК определяли ингибирование полимеразы. Из зависимостей логарифма остаточной активности фермента от длительности воздействия на него Pt^{2+} -реагента рассчитывали величины кажущихся констант скоростей инактивации ($k_{ин}^{как}$) полимеразы при фиксированных концентрациях олиготимидилатов по методу Кита — Уилсона [10, 11]. Величины K_d комплексов олиготимидилатов с ДНК-полимеразой находили графическим методом из зависимостей обратных величин $k_{ин}^{как}$ от концентрации конкурентных по отношению к этому необратимому ингибитору олиготимидилатов. Согласно работе [11], отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, равен $K_d(X/K_x+1)$, где K_d — константа диссоциации конкурентного по отношению к ингибитору лиганда, X — концентрация конкурентного необратимого ингибитора, а K_x — константа диссоциации комплекса фермента с таким ингибитором. Величина $K_x = 0,5$ мкМ для комплекса ДНК-полимеразы с Pt^{2+} -реагентом в присутствии Mn^{2+} была найдена ранее [1]. В данной работе величину K_d для него определяли при помощи зависимостей $k_{ин}^{как}$ от концентрации реагента в присутствии и в отсутствие Mn^{2+} . Остальные условия эксперимента такие же, как описано выше.

При определении концентраций различных олиготимидилатов дезоксирибозы использовали найденные ранее [1, 2] коэффициенты молярного поглощения при 267 нм: $(pT)_3$ $26,2 \cdot 10^3$, $(pT)_7$ $60,5 \cdot 10^3$, $(Tr)_7T$ $69,0 \cdot 10^3$, $(Tr)_9T$ $87,0 \cdot 10^3$, $(Tr)_{10}T$ $95,7 \cdot 10^3$, $(Tr)_{11}T$ $127,2 \cdot 10^3$, $(Tr)_3Tr'(Et)T$ $89,0 \cdot 10^3$, $(Tr)_3Tr''(Et)T$ $89,0 \cdot 10^3$, Pt^{2+} -реактива $86,0 \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. Коэффициенты молярного поглощения d[Tr(Et)₃T], d[Tr(Et)₇T], и d[Tr'(Et)Tr]₃ · Tr'(Et)T, d[Tr''(Et)Tr]₃Tr''(Et)T принимали равными соответствующим коэффициентам для неэтилированных олиготимидилатов той же длины [2]. Концентрацию d(pT)₃, d(Tr) и d(pT) определяли также спектрофотометрически, используя коэффициенты молярного поглощения при 260 нм, равные $19,5 \cdot 10^3$ и $9,6 \cdot 10^3$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ соответственно, согласно работе [12]. Концентрации KH_2PO_4 и триэтилфосфата определяли весовым методом.

Кинетические параметры реакции ферментативной полимеризации определяли при 30° С согласно работам [1, 3]. Реакционная смесь в случае:

ДНК-полимеразы α объемом 50–100 мкл содержала: 50 мМ трис-HCl-буфер (рН 7,4), 0,12 мМ $MnCl_2$, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 20 мкМ [3H]dATP с удельной радиоактивностью 85–160 ТБк/моль, 100 мкМ (рА) $_7$ в качестве затравки (для (рА) $_7$, $K_m=14$ мкМ). Концентрации олиготимидилатов (матриц) варьировали в широком диапазоне в зависимости от их длины и сродства к ферменту. Реакцию начинали добавлением 0,5–3,0 ед. акт. фермента.

В случае ДНК-полимеразы I из *E. coli* (или кленовского фрагмента) реакционная смесь объемом 50–100 мкл содержала: 50 мМ Hepes-NaOH-буфер (рН 8,0), 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KCl, 25 мкМ EDTA, 0,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 30 мкМ [3H]dATP с удельной радиоактивностью 85–160 ТБк/моль, 200 мкМ (рА) $_7$ ($K_m=53$ мкМ). Концентрации олиготимидилатных матриц варьировали, как и в случае ДНК-полимеразы α . Реакцию полимеризации начинали добавлением 0,4–2 ед. акт. кленовского фрагмента. Из реакционных смесей через каждые 1–1,5 мин (до 10 мин) отбирали аликвоты, которые наносили на диски из бумаги FN-16 (см. выше).

Величины K_m и максимальной скорости V превращения рассчитывали графическими методами с использованием координат $[S]/v$ от $[S]$ и прямого линейного графика Эйзенштала и Корншиш-Боуден [8]. Ошибку определения констант оценивали методом наименьших квадратов, а также согласно работе [8]. Она не превышала 20%.

Авторы глубоко признательны М. Ф. Могилевкиной за препарат цис-дихлордиамминоплатины, В. Н. Буневой и А. Г. Веньяминовой за препараты d(рТ) $_3$ и d(рА) $_7$, Е. М. Ивановой за препарат d(Tr) $_4$ T, В. В. Горну за препарат d(Tr) $_5$ T, А. В. Лебедеву и Г. И. Абрамовой за препараты d(рТ) $_3$, d[Tr'(Et)Tr] $_3$ Tr'(Et)T и d[Tr''(Et)Tr] $_3$ Tr''(Et)T, В. Ф. Зарытовой за полезные обсуждения и поддержку данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Невинский Г. А., Подуст В. Н., Левина А. С., Халабуда О. В., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 3, с. 357–386.
2. Левина А. С., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 3, с. 358–369.
3. Невинский Г. А., Фролова Е. И., Левина А. С., Подуст В. Н., Лебедев А. В. Биоорган. химия, 1987, т. 13, № 1, с. 45–57.
4. Slater J. P., Tamir I., Loeb L. A., Mildvan A. S. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 24, p. 6784–6794.
5. Фершг Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, с. 272–291.
6. Биохимическая термодинамика/Ред. Джоунс М. М. М.: Мир, 1982, с. 148.
7. Borzakotti N., Palmer R. A., Maneef I., Moos D. S. J. Mol. Biol., 1983, v. 169, № 1, p. 743–755.
8. Корншиш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1978, с. 48–49, 260–266.
9. Noy G. P., Weissbach A. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 477, № 2, p. 70–83.
10. Kitz R., Wilson I. B. J. Biol. Chem., 1962, v. 273, № 10, p. 3245–3249.
11. Горшкова И. Ш., Чимилова Т. А. В кн.: Аффинная модификация биополимеров/Ред. Кюрре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983, с. 58–65.
12. Tazawa S., Tazawa I., Alfreder J. L., Ts'o P. O. P. Biochemistry, 1972, v. 11, № 9, p. 3544–3558.

Поступила в редакцию
23.VIII.1985
После доработки
15.V.1986

PROCARYOTIC AND EUCLARYOTIC DNA POLYMERASES. II. THE ROLE OF INTERNUCLEOTIDE PHOSPHATES IN THE BINDING PROCESS OF OLIGONUCLEOTIDE TEMPLATE WITH THE ENZYME

NEVINSKY G. A., LEVINA A. S., PODUST V. N., LAVRIK O. I.

Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

The affinity of different ligands (phosphate, nucleoside monophosphates, oligonucleotides) to the template binding site of DNA polymerase α from human placenta was estimated. To this goal, dependences of rate of the enzyme inactivation by the affinity

reagent $d(pT)_2pC[Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$ on the concentration of these ligands as competitive inhibitors were determined. Minimal ligands capable to bind with the template site of DNA polymerase α were shown to be triethylphosphate (K_d 600 μM) and phosphate (K_d 53 μM). Ligand affinity increases by the factor 1,71 per added monomer unit from phosphate to $d(pT)$ and then for oligothymidylates $d(Tp)_nT$ (n 1 to 14). The partial ethylation of phosphodiester groups does not change the efficiency of the oligothymidylate binding with the enzyme. However, the complete ethylation of these groups lowers affinity of the oligothymidylates to the enzyme by 7-9 times. The decrease is comparable with the change of Pt^{2+} -deca-thymidylate affinity to the enzyme caused by Mn^{2+} -ions. The data obtained led to suggestion that an electrostatic contact (most likely, Me^{2+} -dependent) of phosphodiester group with the enzyme takes place. The type of contact is confirmed by Gibbs' energy change 1,1-1,4 kcal/mole. Formation of a hydrogen bond with the oxygen atom of $P=O$ group of the same phosphate is also assumed ($\Delta G = -4,4 \dots -4,5$ kcal/mole). The other internucleotide phosphates and all bases of oligonucleotides form neither hydrogen bonds nor electrostatic contacts with the template binding site. Gibbs' energy changes by 0,32 kcal/mole when the template is lengthened by one unit. We suppose that this value characterizes the energy gain in the transition of oligonucleotide template from aqueous medium to the hydrophobic environment of the enzyme active site. Comparison of K_m values of oligothymidylates and their partially or completely ethylated analogues as templates in the reaction of DNA polymerization catalysed by DNA polymerase α from human placenta and Klenow's fragment of *E. coli* DNA polymerase I suggests a similar mechanism of template recognition by both enzymes.