



УДК 577.152.277

© 1990 г.

В. Н. Подуст, Т. О. Коробейничева, Г. А. Невинский,
В. А. Рихтер*, Т. И. Абрамова, О. И. Лаврик

**МАТРИЦА-ПРАЙМЕРЗАВИСИМАЯ ИНАКТИВАЦИЯ
ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ α ИЗ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА
2',3'-ЭПОКСИАДЕНОЗИН-5'-ТРИФОСФАТОМ**

Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР;

* Институт ядерной физики АН УзССР, Ташкент

Исследована модификация ДНК-полимеразы α их плаценты человека 2',3'-эпоксиаденозин-5'-трифосфатом (eATP). Показано, что $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{eATP}$ ковалентно присоединяется к белку как в отсутствие, так и в присутствии праймер-матричного комплекса. Однако инактивация фермента eATP достигается только при одновременном присутствии комплементарной реагенту матрицы, праймера и ионов Mg^{2+} . Предполагается, что наряду с аффинной модификацией dNTP-связывающего участка происходит присоединение реагента вне активного центра фермента, которое не влияет на активность ДНК-полимеразы.

Из зависимостей скорости инактивации ДНК-полимеразы от концентрации eATP и конкурентного ему dATP найдены величины K_d комплексов фермента с eATP (90 мкМ) и dATP (1 мкМ). Последняя величина примерно на порядок меньше величины K_m для dATP (13 мкМ), найденной с помощью реакции полимеризации. Скорость и глубина инактивации полимеразы реагентом зависят от концентрации праймера. Найденная с помощью eATP величина K_d комплекса фермента с $d(\text{pA})_{10}$ (0,33 мкМ) практически не отличается от величины K_m (0,43 мкМ) для этого праймера. Сделан вывод о перспективности использования eATP для оценки эффективности комплексообразования различных лигандов с dNTP- и праймерсвязывающими участками ДНК-полимеразы.

Одним из наиболее исследованных ферментов среди ДНК-зависимых ДНК-полимераз (КФ 7.2.2.2) является ДНК-полимераза I из *E. coli*. Рентгеноструктурным анализом достигнуто высокое разрешение комплексов фрагмента Клевова с ДНК и dNMP [1]. Однако опубликованные данные пока не позволяют описать взаимодействие фермента с матрицами, праймерами и dNTP на молекулярном уровне. Тем более такая информация отсутствует для труднодоступных ДНК-полимераз из эукариот. Анализ механизма функционирования ДНК-полимераз на молекулярном уровне требует развития комплекса физико-химических подходов. Например, определенные успехи в выявлении типов контактов матрицы, праймеров и dNTP с ДНК-полимеразами достигнуты с помощью метода аффинной модификации: показано, что количественные характеристики комплексообразования (K_d) ДНК-полимераз с различными лигандами могут быть получены из зависимости скоростей инактивации специфической ферментативной активности от концентрации аффинных реагентов и конкурентных им лигандов [2–6].

Один из наиболее перспективных вариантов аффинной модификации — суцидная модификация, когда фермент катализирует собственную инактивацию. В этом случае удается достичь максимальной специфичности меченя ферментов. Авторы работы [7] предполагали, что eATP инактивирует ДНК-полимеразу I *E. coli* по суцидному механизму: на первой стадии eATP удлиняет цепь праймера на одно звено, а затем, после транслокации праймер-матричного комплекса, происходит алкилирование фермента эпоксигруппой концевой нуклеотида праймера с ковалентным присоединением радиоактивно меченного праймера к белку.

Сокращения: BSA — бычий сывороточный альбумин, SDS — додецилсульфат натрия, TCA — трихлоруксусная кислота.

Авторами работы [7] показано, что кроме ДНК-полимеразы I eATP инактивирует ДНК-полимеразы α и β человека и ДНК-полимеразу вируса птичьего миеобластома. Подробно исследована только модификация ДНК-полимеразы I, однако предполагается, что инактивация других ДНК-полимераз достигается также по суицидному механизму. Дальнейшего развития этот подход не получил. В то же время использование eATP представлялось перспективным как для локализации структурных элементов активных центров, так и для анализа комплексообразования матриц, праймеров и dNTP с ДНК-полимеразами. В данной работе с помощью eATP исследована ДНК-полимераза α из плаценты человека.

Синтез eATP с выходом 0,7% (считая на аденозин) описан в работе [7]. Нам удалось повысить выход до 7%, получив eAdo по методу [8], а затем последовательной обработкой POCl_3 и пиррофосфатом по аналогии с синтезом dNTP из нуклеозидов [9], превратив его в eATP без выделения промежуточного eAMP. Замена пиррофосфата на ортофосфат привела к образованию смеси eAMP, eADP и eATP; eAMP был также синтезирован согласно работе [7]. Структура eAdo и eATP была подтверждена методом ЯМР-спектроскопии (ср. [10]).

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ eATP синтезировали из eADP и $[\text{}^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$ ферментативным путем по аналогии с синтезом $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ [11]. Было показано, что eATP является субстратом для 3-фосфоглицераткиназы.

Для исследования взаимодействия eATP с ДНК-полимеразой использовали два типа препаратов фермента: ДНК-полимеразу α (I), выделенную с помощью четырех хроматографических стадий [12], и ДНК-полимеразу α (II), очищенную с помощью хроматографии на сорбенте с иммобилизованными моноклональными антителами [13]. Первый препарат был достаточно термостабильным при 30–37° С, тогда как второй оказался практически гомогенным по данным электрофореза, но весьма лабильным при 30–37° С. Указанные препараты ДНК-полимераз не различались по кинетическим характеристикам: величинам K_m для ДНК и dNTP, K_m для праймеров, оптимумам концентрации MgCl_2 . Иммуноочищенные препараты фермента в основном использовались в экспериментах по модификации полимеразы $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ eATP и $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{pA})_{10}$.

Необходимым критерием аффинности реагента является его способность инактивировать фермент. Инкубация ДНК-полимеразы α с eATP как в отсутствие, так и в присутствии Mn^{2+} (оптимального для реакции полимеризации на poly(dT)-матрице кофактора фермента) не приводила к заметной инактивации фермента. Добавление poly(dT)-матрицы и d(pA)₁₀-праймера по отдельности также не влияло на активность фермента (рис. 1). Не было обнаружено инактивации ДНК-полимеразы с помощью eATP и при добавлении в насыщающих концентрациях матрично-затравочных комплексов poly(dG)·d(pC)₉ и poly(dA)·d(pT)₁₀, т. е. матриц, не комплементарных eATP. Глубокая инактивация фермента имела место только при одновременном добавлении комплементарной реагенту poly(dT)-матрицы, d(pA)₁₀-праймера и ионов Mn^{2+} в оптимальных концентрациях (рис. 1). Это соответствовало ранее описанным условиям суицидной инактивации ДНК-полимеразы I eATP.

Предполагая возможность аффинной модификации ДНК-полимеразы α по суицидному механизму, мы сделали попытку селективного введения метки в белок с помощью $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{pA})_{10}$ в присутствии poly(dT)-матрицы и eATP. Однако включения метки ни в одну из субъединиц фермента не наблюдалось. Более того, инкубация ДНК-полимеразы с poly(dT), $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{pA})_{10}$ и eATP (в оптимальных для протекания реакции полимеризации в случае dATP условиях) не приводила к увеличению длины праймера.

Поскольку в отличие от других суицидных реагентов eATP исходно обладает химически реакционноспособной группой, можно было предположить, что инактивация ДНК-полимеразы eATP происходит без включения реагента в праймер, но зависит от присутствия праймера и комплементарной eATP матрицы. При этом следовало ожидать ковалентного присоединения eATP к ферменту только специфическим образом — по

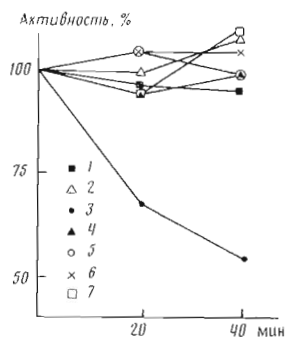


Рис. 1

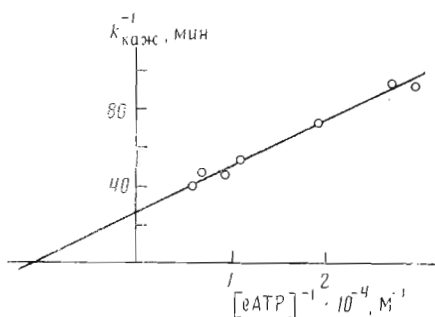


Рис. 3

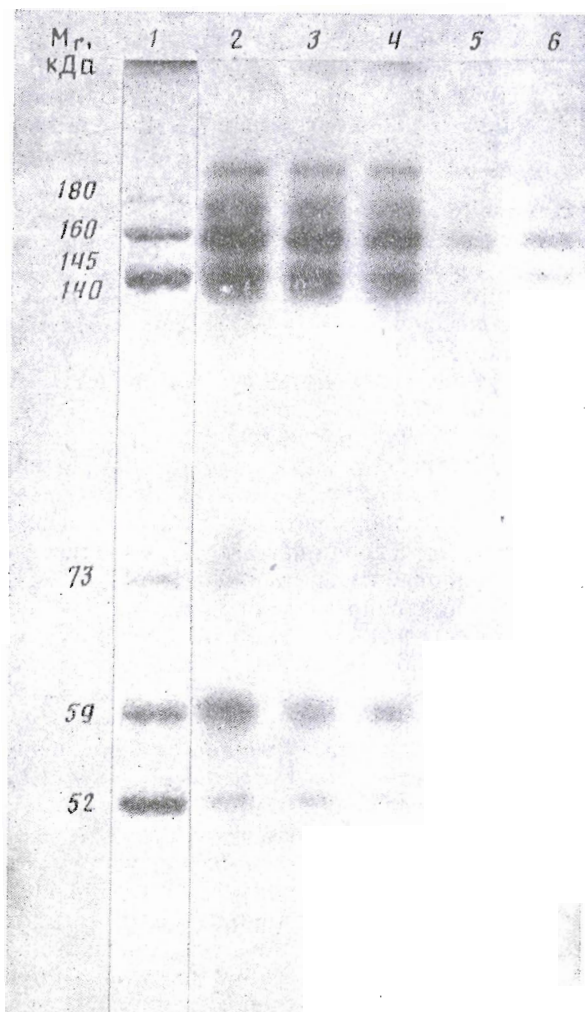


Рис. 2

Рис. 1. Кинетические кривые инактивации ДНК-полимеразы α eATP в различных условиях: 1 — eATP в присутствии $MnCl_2$; 2 — в присутствии $poly(dT) \cdot d(pA)_{10}$; 3 — $poly(dT) \cdot d(pA)_{10}$ и $MnCl_2$; 4 — $poly(dA) \cdot d(pT)_{10}$ и $MnCl_2$; 5 — $poly(dG) \cdot d(pC)_9$ и $MgCl_2$; 6 — eADP в присутствии $poly(dT) \cdot d(pA)_{10}$ и $MnCl_2$; 7 — eAMP в присутствии $poly(dT) \cdot d(pA)_{10}$ и $MnCl_2$. Использовали 0,1 мМ eATP (eADP, eAMP), 0,3 $OE_{260}/мл$ $poly(dT)$, 1,2 мкМ $d(pA)_{10}$, 0,5 $OE_{260}/мл$ $poly(dA)$, 0,7 мкМ $d(pT)_{10}$, 0,16 $OE_{252}/мл$ $poly(dG)$, 2 мкМ $d(pC)_9$, 0,12 и 2 мМ $MgCl_2$, остальные стандартные компоненты см. в «Экспер. части»

Рис. 2. SDS-электрофорез ДНК-полимеразы α после инкубации с $[\gamma-^{32}P]eATP$. 1 — окраска белка кумасси G-250; 2–6 — радиоавтография. Кроме компонентов, общих для всех смесей (см. «Экспер. часть»), смеси содержали: $MnCl_2$ (2); $poly(dT)$, $MnCl_2$ (3); $poly(dT)$, $d(pA)_{10}$, $MnCl_2$ (4); $poly(dT)$, $d(pA)_{10}$, dATP, $MnCl_2$ (5); $poly(dG)$ (0,16 $OE_{252}/мл$), $d(pC)_9$ (2 мкМ), $MgCl_2$ (2 мМ) (6)

Рис. 3. Зависимость величины $k_{инак}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы от концентрации eATP в обратных координатах

dNTP-связывающему участку фермента. В этом случае eATP можно было рассматривать как перспективный реагент при локализации структурных элементов активного центра фермента. Чтобы проверить это предположение, был проведен анализ ковалентного присоединения $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{eATP}$ в различных условиях. Данные радиоавтографии геля после электрофореза препаратов ДНК-полимеразы α , модифицированной $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{eATP}$, свидетельствуют (рис. 2), что в основном присоединение реагента происходило по высокомолекулярным (140—180 кДа) пептидам, соответствующим каталитическим субъединицам фермента. Мечению также подвергалась одна из субъединиц праймазы (59 кДа) и, весьма незначительно, полипептиды 52 и 73 кДа.

В некоторых случаях в препаратах ДНК-полимераз α эукариот обнаруживают полипептид с молекулярной массой 200 кДа. С помощью окраски гелей кумасси мы не смогли обнаружить этот полипептид в наших препаратах ДНК-полимеразы α . В то же время на радиоавтографе фермента, меченного $[\text{}^{32}\text{P}]\text{eATP}$, присутствует полоса радиоактивности, положение которой соответствует полипептиду с молекулярной массой 200 кДа. Не исключено, что это связано с присутствием указанного полипептида в препаратах белка в существенно меньших количествах, чем других субъединиц «каталитического кластера».

Наиболее высокий уровень ковалентного мечения субъединиц фермента наблюдался в отсутствие матрично-затравочных комплексов. Добавление $\text{poly}(\text{dT})$ или $\text{poly}(\text{dT}) \cdot \text{d}(\text{pA})_{10}$ приводило к снижению уровня мечения. Мечение было особенно низким в случае $\text{poly}(\text{dG}) \cdot \text{d}(\text{pC})_9$ -комплекса с некоплементарной реагенту матрицей. Последний практически полностью защищал от модификации субъединицы праймазы и полипептид 73 кДа. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в отсутствие матрицы и праймера реагент преимущественно модифицирует фермент вне dNTP-связывающего центра фермента. Большой уровень мечения в случае $\text{poly}(\text{dT}) \cdot \text{d}(\text{pA})_{10}$ по сравнению с $\text{poly}(\text{dG}) \cdot \text{d}(\text{pC})_9$ может быть объяснен дополнительным матрица-зависимым мечением белка по dNTP-связывающим участкам фермента. Это подтверждается эффективной защитой dATP (15 мкМ) от мечения фермента $[\text{}^{32}\text{P}]\text{eATP}$. Эти данные свидетельствовали о ковалентном присоединении $[\text{}^{32}\text{P}]\text{eATP}$ не только по dNTP-связывающему участку, но и вне его. При этом матрица-праймер-независимому мечению подвергались не только каталитические, но и другие субъединицы ДНК-полимеразы. В то же время очевидно, что матрица-праймернезависимое мечение ДНК-полимеразы α не влияет на полимеризующую активность фермента. Множественная модификация нуклеотид- и полинуклеотидзависимых ферментов реакционноспособными производными нуклеотидов достаточно широко описана (см. обзор [14]). Ковалентное присоединение химически активных аналогов нуклеотидов вне активных центров ферментов, как правило, не влияет на каталитическую активность. Например, присоединение 10—20 моль фотоактивного аналога АТФ к фенилаланил-тРНК-синтетазе из *E. coli* [15] не изменяло активности фермента. Ковалентное присоединение аффинных реагентов вне исследуемого центра значительно усложняет картину мечения и, к сожалению, не может быть однозначно интерпретировано. Такое присоединение может происходить в результате ковалентного присоединения реагентов по другим субстратсвязывающим участкам ферментов в результате образования специфических комплексов реагента с этими участками.

Таким образом, eATP не является суицидным реагентом для ДНК-полимеразы α из плаценты человека и не вполне пригоден для селективного мечения активного центра ДНК-полимеразы. В то же время ковалентное присоединение eATP вне dNTP-связывающего участка не изменяет полимеризующей активности фермента и поэтому не исключает его использования для исследования комплексообразования лигандов с dNTP-связывающим участком полимеразы. Количественные оценки эффективности комплексообразования ферментов с различными лигандами могут быть проведены по изменению специфической активности фермента из зависимостей скоростей инактивации от концентрации аффинных реаген-

тов и конкурентных им лигандов (см. «Экспериментальную часть»). Этот подход имеет ряд преимуществ. В большинстве случаев концентрации аффинных реагентов и конкурентных им лигандов на 1—5 порядков превышают концентрации ферментов. Поэтому при отсутствии примесных ферментативных активностей, деградирующих реагенты и субстраты, обычно не требуется гомогенности используемых ферментов, равно как и отсутствия в препаратах фермента неактивных молекул исследуемого белка. С другой стороны, расход реагентов на модификацию примесных белков обычно не превышает 1—10% и не может существенно изменить концентрацию аффинного реагента. Количество ферментов, необходимое для количественных оценок комплексообразования методом аффинной модификации, на 2—3 порядка меньше, чем в случае других физико-химических подходов. Это позволяет проводить исследования взаимодействия с лигандами таких труднодоступных белков, как ДНК-полимеразы эукариотических клеток.

Для проверки возможности использования рассмотренного подхода в случае ДНК-полимеразы α и eATP были исследованы закономерности инактивации фермента реагентом. Показано, что скорость инактивации ДНК-полимеразы α eATP в присутствии poly(dT)-матрицы, d(pA)₁₀-праймера и ионов Mn²⁺ возрастает с увеличением концентрации реагента. Зависимость скорости инактивации от концентрации реагента имеет насыщающий характер. Зависимость логарифма остаточной активности фермента от времени линейна. Это свидетельствует о псевдопервом порядке реакции модификации фермента eATP, протекающей в комплексе фермент · матрица · праймер · eATP. Данные указывают также на отсутствие заметного расхода реагента на побочные реакции с исследуемым ферментом, примесными белками и низкомолекулярными компонентами реакционной смеси. Это позволяет проводить определение кажущихся величин констант инактивации фермента ($k_{\text{нак}}$) при фиксированных концентрациях eATP.

Из зависимости $k_{\text{нак}}$ инактивации фермента от концентрации eATP была найдена величина K_d (90 мкМ) комплекса фермента с eATP (рис. 3), что в 3 раза больше, чем K_d (30 мкМ) комплекса ДНК-полимеразы I из *E. coli* с eATP [7].

Как указывалось выше, dATP защищает ДНК-полимеразу от инактивации eATP. Из зависимости $k_{\text{нак}}$ инактивации фермента от концентрации dATP при фиксированной концентрации eATP величина K_d комплекса полимеразы с dATP была найдена равной 1 мкМ (рис. 4). Величина K_m для dATP, найденная с помощью реакции полимеризации в условиях, идентичных экспериментам по инактивации, оказалась равной 13 мкМ.

Эти результаты и описанные выше данные по зависимости инактивации ДНК-полимеразы α от комплементарности матрицы реагенту свидетельствуют об аффинном характере инактивации ДНК-полимеразы α eATP.

Ранее было показано, что алкилирующие амиды dNTP и имидазолиды dNTP инактивируют ДНК-полимеразу I из *E. coli* только в присутствии матрично-затравочного комплекса [16, 17]. Аналогичный результат был получен при модификации ДНК-полимеразы α из плаценте человека имидазолидами dNMP [4, 6]. Было высказано предположение о том, что для формирования dNTP-связывающего участка ДНК-полимеразы и эффективного связывания нуклеотидов с этим участком необходимо образование комплекса ферментов с матрицей и праймером [4, 6]. Данные настоящей работы подтверждают это предположение.

В отличие от eATP инактивация ДНК-полимеразы α человека имидазолидами dNMP не требует комплементарности реагента используемой матрице и происходит в присутствии любого дуплекса взаимно комплементарных матрицы и праймера. В то же время инактивация ДНК-полимеразы I имидазолидами dNTP имеет место только при условии комплементарности реагента матрице [17]. На основании родства dNMP, dNDP и dNTP, комплементарных и некомплементарных матрице, к ДНК-полимеразам в работах [4, 6] сделан вывод о том, что в комплементарные

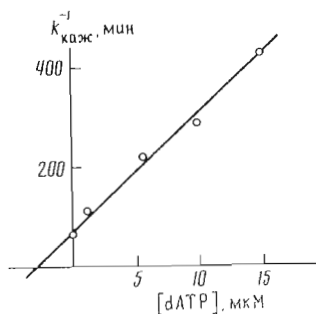


Рис. 4

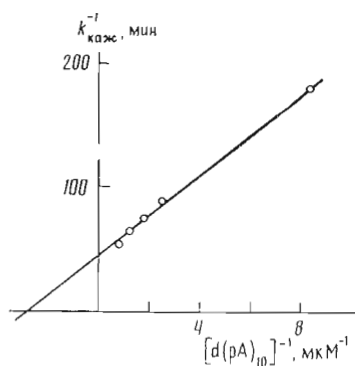


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость величины $k_{\text{каж}}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы от концентрации dATP при фиксированной концентрации eATP (170 мкМ)

Рис. 5. Зависимость величины $k_{\text{каж}}$ реакции инактивации ДНК-полимеразы от концентрации $d(pA)_{10}$ при фиксированной концентрации eATP (170 мкМ)

взаимодействия с матрицей могут вступать только dNTP. Наличие γ -фосфата нуклеотида необходимо для такого взаимодействия. Для проверки важности γ -фосфатной группы eATP в процессе инактивации ДНК-полимеразы α мы исследовали влияние на активность фермента eAMP и eADP. Показано, что в отличие от eATP два других эпоксинуклеотида не способны инактивировать фермент (рис. 1). Эти данные могут быть объяснены тем, что γ -фосфат eATP необходим для конформационной перестройки комплекса фермент · матрица · праймер · реагент. По-видимому, подгонка eATP до каталитически активного состояния, моделирующего аналогичные взаимодействия dNTP с активным центром, обеспечивает сближение эпоксигруппы реагента с модифицируемыми остатками активного центра. Ввиду отсутствия γ -фосфатной группы у eAMP и eADP такой реорганизации комплекса, вероятно, происходить не может, и они не инактивируют фермент.

Различие в величинах K_d и K_m для dATP более чем на порядок согласуется с полученными данными для ДНК-полимеразы α из плаценты человека о превышении величины K_m для dNTP по сравнению с K_d на 1–2 порядка. По данным аффинной модификации ДНК-полимеразы α имидазолидами dTTP, величина K_d для dTTP была найдена равной 0,06 мкМ, в то время как величина K_m составляла 3,1 мкМ [4, 6].

Таким образом, eATP — первый пример аффинного реагента ДНК-полимеразы α из плаценты человека, инактивирующего фермент только в присутствии комплементарной реагенту матрицы.

Для исследования праймерного участка ДНК-полимераз важна оценка соотношения величин K_m и K_d для иницирующего субстрата. В работе [2] оценена величина K_d комплекса ДНК-полимеразы α с $r(pA)_5$ -праймером с помощью аффинного реагента матричного участка фермента $(Tr)_2pC(Pt^{2+})(pT)_7$. Было показано, что величина K_d комплекса фермента и матрицы с этим праймером лишь в 1,5–2 раза меньше величины K_m , найденной с помощью реакции полимеризации. Применение этого подхода для оценки величин K_d для праймеров имеет ряд ограничений [2]. Зависимость инактивации ДНК-полимеразы eATP от праймер-матричного комплекса теоретически предполагает возможность оценки сродства праймеров к ферменту с помощью eATP. Чтобы проверить эту возможность, мы исследовали зависимость скорости инактивации ДНК-полимеразы α от концентрации $d(pA)_{10}$ -праймера при насыщающих концентрациях poly(dT)-матрицы и eATP. Было показано, что скорость инактивации увеличивается с возрастанием концентрации праймера и при высоких концентрациях выходит на плато. Величина K_d для $d(pA)_{10}$, найденная обработкой этих данных, оказалась равной 0,33 мкМ (рис. 5),

что примерно в 1,3 раза меньше по сравнению с величиной K_m для $d(pA)_{10}$, найденной в реакции полимеризации.

Таким образом, этот результат подтверждает сделанный ранее вывод об отсутствии заметного различия в величинах K_m и K_a для праймеров.

На основании полученных данных можно полагать, что eATP может быть использован как аффинный реагент для анализа механизма функционирования матричнозависимых ферментов.

Экспериментальная часть

В работе использовали для препарата ДНК-полимеразы α из плаценты человека. ДНК-полимераза $\alpha(I)$ с удельной активностью $6 \cdot 10^3$ ед. акт./мг была получена хроматографической очисткой на фосфоцеллюлозе, красной сефарозе, DEAE-сефарозе и гидроксилпатите [12]. Высокоочищенный препарат ДНК-полимеразы $\alpha(II)$ с удельной активностью $2,7 \cdot 10^4$ ед. акт./мг из того же источника был выделен иммуноаффинной хроматографией на сорбенте с иммобилизованными моноклональными антителами SJK 287-38 [13]. По данным электрофореза, фермент (II) состоял из четырех каталитических субъединиц (140–180 кДа), двух субъединиц праймазы (52–59 кДа) и полинуклеотида 73 кДа [18]. За единицу полимеризующей активности принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 нмоль dNMP в кислотонерастворимый продукт за 1 ч при 37°С. В качестве матрично-затравочного комплекса использовали активированную на 25–30% ДНК [19].

В работе использовали ДНК тимуса теленка, dNTP (НИКТИ БАВ, Бердск), акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, SDS (Serva, ФРГ), 2-меркаптоэтанол, $MnCl_2$ (Merck, ФРГ), poly(dT) (Sigma, США), [3H]dATP (900 ТБк/моль; Изотоп, СССР), [^{32}P]H₃PO₄ (185 Пбк/моль). Остальные реактивы были квалификации ос. ч.

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, ФРГ) в системах: хлороформ – метанол, 4 : 1 (А); ацетон – вода, 5 : 2 (Б); диоксан – конц. аммиак – вода, 6 : 1 : 4 (В).

ЯМР-спектры снимали на спектрометре Bruker WP-200 SY с фурье-преобразователем (200 МГц) в DMSO-*d*₆ и D₂O с тетраметилсиланом и H₃PO₄ в качестве внутренних стандартов.

Синтез $d(pA)_{10}$ описан ранее [20]. Концентрацию олигонуклеотида определяли спектрофотометрически (ϵ_{260} $98,7 \cdot 10^3$ M⁻¹·см⁻¹).

2',3'-Эпоксиадеозин был синтезирован из аденозина согласно методу [8]. eATP синтезировали следующим образом (ср. [9]). К суспензии 230 мг (0,92 ммоль) eAdo в 4 мл абс. триэтилфосфата добавляли 109 мкл (1,2 ммоль) POCl₃. Смесь выдерживали 1,5 ч при 0°С, затем к ней добавляли 9,2 мл 0,5 М раствора пиррофосфата (Bu₃NH⁺) в абс. диметилформамиде и 0,92 мл трибутиламина. Через 3 мин к смеси добавляли 46 мл 0,1 М триэтиламмонийбикарбонатного буфера (TEAB), pH 7,0. После инкубации смеси в течение 3 ч при 25°С раствор упаривали в вакууме, остаток растворяли в 20 мл воды и наносили на колонку (3×12 см) с DEAE-целлюлозой (HCO₃⁻). Элюцию продукта проводили в линейном градиенте концентрации TEAB (pH 7,0) от 0 до 0,35 М. Объем градиента 1 л. Фракции, соответствующие пику eATP, объединяли, упаривали в вакууме до объема 2 мл. К остатку добавляли 100 мл ацетона, содержащего 0,1% хлористого лития. Выпавший осадок промывали дважды ацетоном и сушили в вакууме. Выход eATP составил 0,24 ммоль (26%).

eADP получали аналогично eATP с заменой пиррофосфата на ортофосфат (после обработки POCl₃ осаждали эфиром). Продукт реакции содержал eAMP, eADP и eATP в соотношении 38 : 37 : 25. Очистку продукта проводили препаративной ТСХ в системе В при 2°С.

УФ-спектры eAMP, eADP и eATP практически не отличались от таковых для ATP. В спектрах ¹H-ЯМР eAdo присутствовал характерный сигнал 1'-H с хим. сдвигом 6,2 м.д., а в спектре eATP – сигнал с хим. сдвигом 6,4 м.д. [10], а также остальные сигналы атомов водорода этих

соединений. Спектр ^{31}P -ЯМР eATP содержал сигналы, соответствующие α -, β - и γ -атомам фосфора.

При гидролизе eATP щелочной фосфатазой, согласно данным ТСХ, происходило образование eADP и eAMP, а при гидролизе eADP — образование eAMP. Величины R_f eAMP, eADP и eATP (ТСХ в системе В) составили соответственно 0,74; 0,48 и 0,37 и отличались от величин R_f соответствующих аденозин-5'-моно-, ди- и трифосфатов (0,60; 0,43 и 0,25).

$[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{pA})_{10}$ получали ферментативным путем из $\text{d}(\text{pA})_n\text{A}$ по стандартной методике [21].

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{eATP}$ получали из eADP по аналогии с ранее описанной методикой [11]. Вещество выделяли ионпарной хроматографией на колонке с сорбентом Силохром С-18 (Chemapol, ЧССР), элюируя градиентом концентрации этанола (0–100% в 50 мМ ТЕАВ, pH 7,5). Выход 26% в расчете на $[\text{}^{32}\text{P}]\text{H}_3\text{PO}_4$.

Активность фермента в экспериментах по его инактивации определяли при 30°С. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала: 50 мМ трис-НСl-буфер (pH 7,5), 0,1 мг/мл BSA, 2 мМ MgCl_2 , 4 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мкМ EDTA, 2 OE_{260} /мл активированной ДНК, 25 мкМ каждого из dNTP (dTTP, dCTP, dATP, dGTP; dATP был ^3H -меченым с уд. акт. 10–30 ТБк/моль). Реакцию начинали добавлением 0,2–1 ед. акт. ДНК-полимеразы α . Дальнейшая обработка описана ниже.

Взаимодействие лигандов с ДНК-полимеразой α исследовали с помощью реакции полимеризации, проводимой в специально подобранных условиях для poly(dT)·poly(dA)-матрично-затравочного комплекса при 30°С. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала стандартные компоненты: 50 мМ трис-НСl (pH 7,5), 0,5 мг/мл BSA, 0,12 мМ MnCl_2 , 4 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,3 OE_{260} /мл poly(dT). При определении величины K_m для dATP смеси содержали 4 мкМ $\text{d}(\text{pA})_{10}$ и варьируемые концентрации $[\text{}^3\text{H}]\text{dATP}$ от 3 до 40 мкМ. Величину K_m для $\text{d}(\text{pA})_{10}$ определяли в смесях, содержащих 45 мкМ $[\text{}^3\text{H}]\text{dATP}$ и варьируемые концентрации $\text{d}(\text{pA})_{10}$ от 0,1 до 1,2 мкМ. Реакцию начинали добавлением 1–5 ед. акт. фермента.

В процессе инкубации реакционной смеси через каждые 3 мин отбирали алиquotы по 10 мкл и наносили их на диски диаметром 2 см из бумаги FN-16, предварительно пропитанные 5% ТСА и высушенные. Диски промывали последовательно 7 раз в растворах 5% ТСА и 1 раз ацетоном, сушили и определяли радиоактивность.

Модификацию фермента эпосинуклеотидами проводили при 30°С. Инкубационная смесь объемом 50–100 мкл содержала стандартные компоненты в концентрациях, указанных в предыдущей методике. При варьировании концентраций eATP (30–170 мкМ) $\text{d}(\text{pA})_{10}$ -праймер был использован в концентрации 4 мкМ. При варьировании концентраций $\text{d}(\text{pA})_{10}$ (0,1–1,2 мкМ) eATP использовали в концентрации 170 мкМ. Для определения величины K_d dATP (диапазон концентраций 1–15 мкМ) $\text{d}(\text{pA})_{10}$ и eATP применяли соответственно в концентрациях 4 и 170 мкМ. Реакцию модификации начинали добавлением 1–5 ед. акт. фермента. В процессе инкубации через 20 мин отбирали алиquotы по 5–10 мкл и вносили их в смесь для определения активности фермента.

Модификацию ДНК-полимеразы α (II) в присутствии $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{pA})_{10}$ или $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{eATP}$ проводили при 30°С в смеси объемом 30 мкл (стандартные компоненты указаны выше). Смеси также содержали 0,2 мг/мл ДНК-полимеразы α (II), 0,7 мкМ $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{pA})_{10}$ с уд. акт. 10^{17} Бк/моль к 900 мкМ eATP или 1,6 мкМ $\text{d}(\text{pA})_{10}$ и 90 мкМ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{eATP}$ с уд. акт. $3 \cdot 10^{16}$ Бк/моль. В экспериментах по защите фермента от инактивации eATP dATP использовался в концентрации 15 мкМ. После инкубации смесей в течение 1 ч их анализировали электрофорезом в 8% полиакриламидном геле в присутствии SDS [22]. Радиоавтографию гелей проводили на фотопленку РМ-В с усиливающим экраном.

Способность eATP терминировать синтез oligo(dA) на poly(dT)-матрице оценивали при 30°С. Смесь объемом 10 мкл содержала стандартные компоненты для реакции полимеризации, указанные выше, а также 0,7 мкМ

$[5\text{'-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{pA})_{10}$, 170 мкМ еАТР и 40 ед. акт. ДНК-полимеразы $\alpha(\text{II})$. В качестве контроля использовали смесь, в которой вместо еАТР был дАТР в концентрации 8 мкМ. Смеси инкубировали 1 ч и затем подвергали их анализу электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Радиоавтографирование гелей проводили как описано выше. Было показано, что в случае дАТР и $[5\text{'-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{pA})_{10}$ происходит образование меченых полинуклеотидов. В то же время еАТР не удлиняет цепь праймера; более того, при одновременном присутствии в инкубационной смеси дАТР и еАТР происходит практически полное ингибирование синтеза $\text{poly}(\text{dA})$.

Величины K_m для субстратов определяли с помощью графических методов. Использовали зависимости начальных скоростей реакции полимеризации от концентрации субстратов в координатах $1/v$ от $1/S$ [23]. Ошибка определения величин K_m не превышала 50%.

Величины K_0 комплексов фермента с аффинным реагентом (K_x) и конкурентным ему лигандом (K_y) находили с помощью анаморфозы уравнения Китца — Вилсона [24]:

$$1/k_{\text{каж}} = 1/k + K_x/x_0,$$

где k — константа скорости модификации фермента, $k_{\text{каж}}$ — константа скорости модификации фермента при фиксированной концентрации реагента x_0 . K_y находили с помощью уравнения

$$1/k_{\text{каж}} = 1/k + (K_x/x_0)(1 + y_0/K_y),$$

где y_0 — концентрация конкурентного реагенту лиганда. Ошибка в определении величин K_0 не превышала 50%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joyce C. M., Steitz T. A. // Trends Biochem. Sci. 1987. V. 12. № 8. P. 238—292.
2. Невинский Г. А., Подуст В. Н., Левина А. С., Халабуда О. В., Лаврик О. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 357—368.
3. Невинский Г. А., Левина А. С., Подуст В. Н., Лаврик О. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 58—68.
4. Doronin S. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A., Podust V. N. // FEBS Lett. 1987. V. 216. № 2. P. 221—224.
5. Lavrik O. I., Levina A. S., Nevinsky G. A., Podust V. N. // FEBS Lett. 1987. V. 216. № 2. P. 225—228.
6. Невинский Г. А., Доронин С. В., Подуст В. Н., Лаврик О. И. // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. № 4. С. 1070—1079.
7. Abboud M. M., Sim W. J., Loeb L. A., Mildvan A. S. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 10. P. 3415—3421.
8. Азрем А. А., Зайцева Г. В., Калинин Е. Н., Михайлопуло И. А. // Биоорган. химия. 1976. Т. 2. № 10. С. 1325—1337.
9. Ludwig J. // Acta biochem. et biophys. Acad. sci. hung. 1981. V. 16. № 3. P. 131—133.
10. Russel A. F., Greenberg S., Moffatt J. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1973. V. 95. № 12. P. 4025—4030.
11. Walseth T. F., Johnson R. A. // Biochem. et biophys. acta. 1979. V. 526. № 1. P. 11—31.
12. Лаврик О. И., Невинский Г. А., Подуст В. Н., Халабуда О. В. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. № 2. С. 388—399.
13. Podust V. N., Lavrik O. I., Nasheuer H.-P., Crosse F. // FEBS Lett. 1989. V. 245. № 1, 2. P. 14—16.
14. Лаврик О. И., Невинский Г. А. // Аффинная модификация ферментов: проблемы и перспективы. Итоги науки и техники. Сер. Биоорган. химия. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 13. С. 15—22.
15. Aniklova V. N., Knorre D. G., Lavrik O. I., Kravchenko V. V., Nevinsky G. A. // FEBS Lett. 1975. V. 60. № 1. P. 172—175.
16. Бунева В. Н., Кудряшова Н. В., Небрат Л. Т., Ромащенко А. Г., Чимитова Т. А., Юшкова Л. Ф. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 268. № 1. С. 243—246.
17. Невинский Г. А., Доронин С. В., Лаврик О. И. // Биоолим. клетка. 1985. Т. 1. № 5. С. 247—253.
18. Nasheuer H.-P., Crosse F. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 25. P. 8458—8466.
19. Noy G. P., Weissbach A. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 477. № 2. P. 70—83.
20. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П. // Биоорган. химия. 1982. Т. 9. № 4. С. 516—521.
21. Остерман Л. А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. С. 255.

22. *Laemmli U. K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
23. *Корниш-Боуден Э.* Основы ферментативной кинетики. М.: Мир. 1979. С. 43—49.
24. *Kitz R., Wilson I. B.* // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. № 10. P. 3245—3249.

Поступила в редакцию
9.III.1989

V. N. PODUST, T. O. KOROBENICHEVA, G. A. NEVINSKY, V. A. RIKHTER*,
T. I. ABRAMOVA, O. I. LAVRIK

TEMPLATE-PRIMER-DEPENDENT INACTIVATION OF HUMAN PLACENTA
DNA POLYMERASE α BY 2',3'-EPOXYADENOSINE
5'-TRIPHOSPHATE

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division
of the Academy of Sciences of the USSR:*

** Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences of the Uzbek
SSR, Tashkent*

Modification of the human placenta DNA polymerase α by 2',3'-epoxyadenosine 5'-triphosphate (eATP) was investigated. The latter binds to the protein both in absence and in presence of template-primer complex. However for inactivation of the enzyme, reagent-complementary template, primer and Me^{2+} -ions are required. The inactivation is apparently due to the affinity modification of dNTP-binding site by eATP; covalent binding of the reagent off the enzyme's active site without affecting the DNA polymerase activity is also suggested.

The enzyme inactivation by eATP and its protection from inactivation in the presence of dATP were used to determine K_d values of complexes of the enzyme with eATP (90 μM) and dATP (1 μM), the latter value being 13-times lower than K_m for dATP (13 μM) in the polymerisation reaction. Using the dependence of the DNA polymerase inactivation by eATP on the primer concentration, K_d for enzyme-primer complexes were estimated. The K_d value for d(pA)₁₀ (0,33 μM) was close to K_m value (0,43 μM) for this primer. eATP was concluded to be a useful reagent for estimating the efficiency of the complex formation of different ligands with dNTP- and primer-binding sites of DNA polymerase.