



УДК 577.113.3

**ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ,
КАТАЛИЗИРУЕМЫЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ**© 2000 г. **А. А. Краевский**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
117984, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 22.03.99 г. Принята к печати 25.05.99 г.

Рассмотрены химические реакции, катализируемые различными ДНК-полимеразами, включая реакцию элонгации цепи ДНК, 3'→5'-экзонуклеазную редактирующую активность и другие пути репликационной репарации, характерные для этих ферментов. Проведен анализ этих реакций и их связи с точностью матричного синтеза на примере отдельных наиболее характерных ДНК-полимераз.

Ключевые слова: ДНК-полимеразы, субстраты, химические реакции; репликация; репарация.

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-полимеразы включают большую группу ферментов, катализирующих биосинтез ДНК. И хотя эти ферменты известны уже более 40 лет [1, 2], их исследования продолжают исключительно интенсивно, что определяется значимостью их биологических функций. Так как в последние 10 лет обзоры по химическим реакциям, катализируемым ДНК-полимеразами, в отечественной литературе отсутствуют, предлагаемый материал представляет определенный интерес.

В настоящее время для клеток животных, растений и микроорганизмов, а также для инфицированных вирусами клеток известно несколько разных по биологическому назначению процессов биосинтеза ДНК. Некоторые из этих процессов проходят во всех типах клеток (репликация и репарация ДНК, синтез ДНК митохондрий), другие же – только в специализированных (например, осуществляющих синтез антител, транспозонов) или инфицированных вирусами клетках (репликация бактериофагов и вирусов). Эти процессы катализируются разными ДНК-полимеразами, различающимися по числу субъединиц, молекулярной массе, свойством ассоциации с разными вспомогательными белками, ускоряющими процессы биосинтеза ДНК, и по многим другим структурным свойствам и функциональному назначению.

Синтез ДНК в подавляющем большинстве случаев проходит по полуконсервативному механизму, при этом дочерняя цепь ДНК синтезируется по материнской цепи, называемой обычно матрицей. В одних случаях матрицами являются одноцепочечные ДНК, в других – РНК. Некоторые ДНК-полимеразы функционируют процессивно, т.е. с отщеплением фермента от комплекса мат-

рицы (М) с новосинтезированной дочерней цепью ДНК (дДНК) после удлинения дДНК на десятки нуклеотидных остатков (вплоть до полного окончания процесса), другие – дистрибутивно, когда высвобождение фермента из комплекса происходит после каждого шага удлинения. Таких различий между разными ДНК-полимеразами много, и мы не будем анализировать их отдельно, а лишь обсудим в конкретных ситуациях по мере изложения материала.

Здесь внимание будет сосредоточено на общих свойствах ДНК-полимераз, отличающих их от всех или по крайней мере от многих других ферментов. Эти свойства следующие.

1. Полимеризация различных по структуре 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dNTP) в цепи ДНК.
2. Высокая точность биосинтеза ДНК, как правило, не характерная для других ферментов.
3. Многообразие условий функционирования ДНК-полимераз.

В обзоре рассматриваются примеры отдельных ДНК-полимераз.

**ОСНОВНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ СХЕМА
СИНТЕЗА ЦЕПЕЙ ДНК**

Как известно, элонгация цепи ДНК проходит в результате ее поэтапного удлинения за счет включения нуклеотидных остатков по 3'-концу дДНК. Субстратами (строительным материалом и источником энергии) для процесса элонгации служат dNTP (схема 1). В нормальных условиях в сфере реакции присутствуют dATP, dCTP, dTTP и dGTP. Они поочередно связываются активным комплексом [ДНК-полимераза + М-дДНК], и в результате “проб и ошибок” отбирается dNTP,

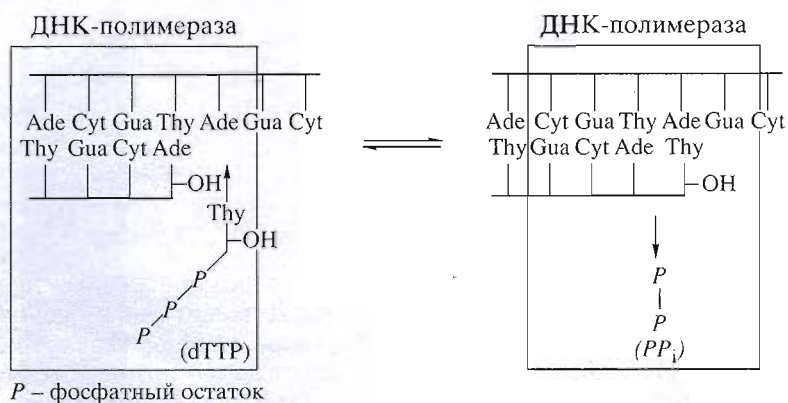


Схема 1. Элонгация цепи ДНК на одно звено.

соответствующий правильному спариванию с матричным нуклеотидом по Уотсону–Крику. После этого фермент катализирует образование фосфоэфирной связи между 3'-гидроксилом дДНК и α -фосфатом dNTP. Далее фермент перемещается на один шаг по одноцепочечному участку матрицы с диссоциацией пирозфосфата (PP_i), при этом выделяется 5–8 ккал, что сдвигает равновесие реакции в сторону полимеризации. Однако наряду с этим все ДНК-полимеразы в отсутствие dNTP и в присутствии PP_i катализируют и обратную реакцию образования dNTP, а именно реакцию переноса нуклеотидного остатка из фосфодиэфирной группы 3'-конца дДНК на PP_i с одновременным образованием соответствующего dNTP и укорочением цепи ДНК на одно звено. Эта обратная реакция реализуется за счет теплоты системы и из-за низкого сродства PP_i к ферменту обычно проходит при концентрации PP_i в 100–1000 раз более высокой, чем в реакции элонгации цепи ДНК. Тем не менее она может иметь определенное биологическое значение [2, 3].

За счет этих двух реакций ДНК-полимеразы катализируют пирозфосфатный и нуклеотидный обмены с соответствующими субстратами реакции. Так, показано, что фермент в присутствии ^{32}P -меченого PP_i частично превращает dNTP в $[\beta, \gamma\text{-}^{32}P]$ dNTP (схема 2), а нуклеотидный обмен катализирует при остановке элонгации дДНК из-за отсутствия следующего комплементарного матрице dNTP, о чем можно судить при внесении в среду $[\alpha\text{-}^{32}P]$ dNTP, соответствующего последнему нуклеотидному остатку (схема 3) [2, 3].

Химический механизм образования новой фосфоэфирной связи в дДНК из ангидридной связи dNTP или в обратной реакции – переноса нуклеотидного остатка из фосфодиэфирной группы 3'-конца дДНК на PP_i – в общих чертах изучен. В обычных условиях эта реакция проходит по механизму S_N2 , что подтверждается обращением

конфигурации заместителей относительно реагирующего фосфатного остатка (схема 4).

В соответствии со схемой 4 ДНК-полимеразы катализируют нуклеофильную атаку 3'-гидроксила дДНК на α -фосфат dNTP, причем стереохимически эта реакция проходит по механизму нуклеофильного замещения “in-line” с образованием пентавалентного переходного состояния. Задачей ДНК-полимераз в данной реакции является обеспечение образования специфичного по отношению к матрице комплекса [ДНК-полимераза + М-дДНК], последующее связывание dNTP, катализ одной или нескольких нехимических стадий (конформационных превращений) для образования продуктивного комплекса [ДНК-полимераза + М-дДНК + dNTP], катализ химической реакции, освобождение PP_i и перемещение в новое положение вдоль по матрице.

Механизм с обращением конфигурации около фосфора доказан с помощью хиральных α -тио-dNTP, нуклеотидный остаток которых включается в ДНК при катализе различными ДНК-полимеразами, в результате чего образуется новая фосфотиоатдиэфирная группа с обращенной конфигура-

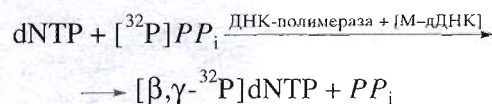


Схема 2. Пирозфосфатный обмен в dNTP в присутствии ДНК-полимеразы и комплекса матрицы с дочерней цепью ДНК.

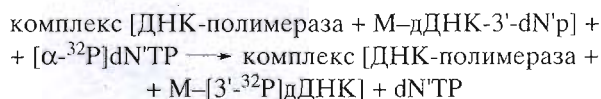
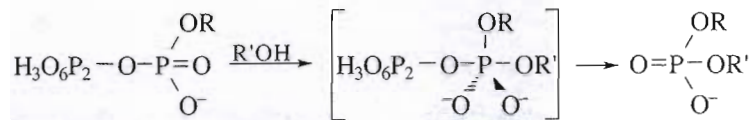


Схема 3. Нуклеотидный обмен между 3'-концевым нуклеотидом дочерней цепи ДНК в составе комплекса с матрицей и dNTP в присутствии ДНК-полимеразы.



где R – нуклеозидный остаток dNTP, R'OH – дДНК с 3'-гидроксилом.

Схема 4. Химическая реакция, происходящая при синтезе новой фосфоэфирной связи в процессе элонгации ДНК.

цией относительно атома фосфора [3]. Данные рентгеноструктурного анализа нескольких ДНК-полимераз в комплексах [M–дДНК + dNTP] подтверждают это положение. На схеме 5 показан активный комплекс обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) для случайного набора нуклеотидных остатков дДНК и dNTP [4, 5]. Для ДНК-полимеразы I из *E. coli* [6, 7] и ряда других [8–10] схема активного центра принципиально не отличается; естественно, нумерация остатков аспарагиновой кислоты для каждой ДНК-полимеразы своя.

ТОЧНОСТЬ БИОСИНТЕЗА ДНК

Как упоминалось выше, сейчас известно большое число ДНК-полимераз. Например, для клеток человека идентифицированы ДНК-полимеразы репликативные (α и ϵ для синтеза отстающей цепи ДНК в репликативной вилке, δ – для синтеза опережающей цепи), ДНК-полимераза β – для репарации поврежденной ДНК, γ – для репликации митохондриальной ДНК и теломераза (специфическая обратная транскриптаза, катализирующая

синтез теломерных концов хромосом). Наряду с этими ферментами в специализированных клетках человека найдены клеточные обратные транскриптазы, биологическая роль которых не ясна (известно, что они катализируют образование ретротранспозонов), а также матрично-независимая концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза (TDT), функции которой, по-видимому, связаны с синтезом антител.

Несмотря на то что химические реакции удлинения дДНК на одно звено при катализе всеми ДНК-полимеразами аналогичны, по многим остальным признакам процесс элонгации для различных ферментов различается иногда весьма существенно. Одно из таких отличий – точность синтеза дДНК относительно программы матрицы.

Точность матричного синтеза ДНК при катализе ДНК-полимеразами имеет особое биологическое значение. Любое ошибочное включение природного 2'-дезокси-нуклеотидного остатка, если оно не будет исправлено при последующем репликационном контроле на уровне вновь образованного дуплекса, как правило, приводит к мутациям при последующих раундах репликации. Мутации в обычных условиях биосинтеза ДНК в клетках происходят с частотой 10^{-10} – 10^{-11} . Такая точность не имеет аналогов ни для каких других ферментативных процессов. Здесь мы не будем проводить анализ мутагенного действия модифицированных dNTP [3, 11, 12] за исключением отдельных, существенных для данного обзора случаев, а сосредоточим внимание лишь на аспектах, характеризующих механизмы защиты от ошибок катализируемого ДНК-полимеразами матричного синтеза.

Хорошо документировано несколько этапов защиты от ошибочных включений и коррекции уже возникших ошибок при биосинтезе ДНК, катализируемом разными ДНК-полимеразами:

- 1) первичный отбор комплементарного матрице dNTP;
- 2) редактирование возникших ошибочных включений;
- 3) репарация ошибочно включенных нуклеотидных остатков в составе дуплекса ДНК.

При этом каждый из этих этапов имеет особую важность для отдельных ДНК-полимераз.

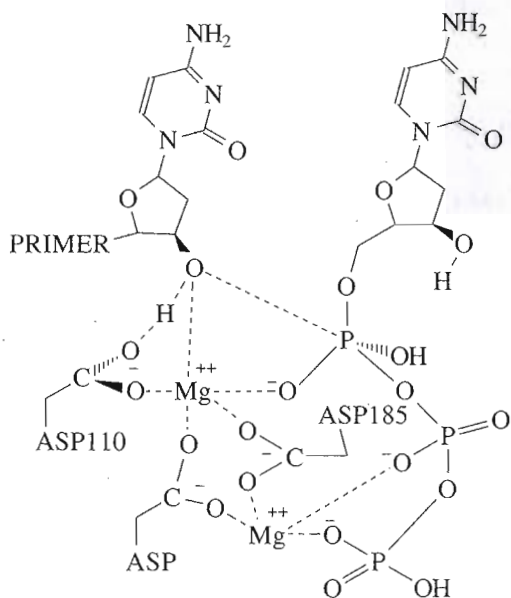


Схема 5. Расположение дДНК (обозначенной на схеме как PRIMER) и трех каталитически существенных остатков аспарагиновой кислоты в активном центре обратной транскриптазы ВИЧ [4, 5].

1. Первичный отбор

Первичный отбор соответствующего матрице dNTP проходит в общем одинаково для разных ДНК-полимераз, хотя ряд параметров реакции влияет на этот процесс. Среди этих параметров в первую очередь следует назвать функциональное назначение конкретного процесса биосинтеза ДНК. Отбор комплементарного матрице dNTP начинается с образования канонических уотсон-криковских пар. Образование таких пар, во-первых, энергетически более выгодно, так как образуются водородные связи, оптимальные по сравнению с другими возможными вариантами. Во-вторых, правильно образованный комплекс вызывает конформационное изменение ДНК-полимеразы, что значительно ускоряет реакцию элонгации [13, 14] и последующую транслокацию фермента. При образовании неправильной пары снижается количество выделенной свободной энергии и замедляется скорость последующей реакции.

Тем не менее, как показано экспериментально, ошибочные пары все-таки возникают с частотой от 10^{-4} до 10^{-6} для разных ДНК-полимераз. Причина их образования лежит в особенности процесса, катализируемого этими ферментами. Главная причина состоит в том, что ДНК-полимеразы на каждом шагу элонгации дДНК выбирают один из четырех различных по структуре dNTP, да еще в условиях, когда матричный нуклеотидный остаток в образующейся паре также варьируется из-за соседних нуклеотидных остатков, влияющих на конформацию односпирального участка матрицы в активном центре. Кроме того, если все ДНК-зависимые ДНК-полимеразы используют в качестве матрицы ДНК, в результате чего сразу же образуется двухспиральный дуплекс в В-форме [15], то в случае РНК-зависимых обратных транскриптаз на первом этапе при обратной транскрипции образуется смешанный комплекс ДНК-РНК, существующий в форме А [15], а на втором этапе при репликации образуется комплекс ДНК-ДНК уже в форме В. Такая особенность требует от обратных транскриптаз существенно более высокой конформационной подвижности, что, как следствие, компенсируется меньшей точностью. Поэтому, для ДНК-зависимых ДНК-полимераз ошибочные включения возникают в среднем с частотой 10^{-6} , а для обратных транскриптаз эта величина составляет 10^{-4} [16, 17].

2. Редактирующая функция ДНК-полимераз

С точки зрения последующего редактирования ошибок в процессе элонгации цепи ДНК ДНК-полимеразы можно разделить на два типа. К типу А относятся ферменты, имеющие дополнительный активный центр, катализирующий $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазный гидролиз. Этот актив-

ный центр располагается вблизи центра полимеризации, по-видимому, частично даже совмещаясь с ним. Его функция проявляется при кинетической задержке элонгации цепи, возникающей в результате включения некомплементарного $3'$ -нуклеотидного остатка и возникновения ошибочной пары. В этом случае ДНК-полимеразы включают $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазную активность и выщепляют некомплементарный $3'$ -концевой нуклеотидный остаток. К группе ДНК-полимераз, содержащих $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазный активный центр, относятся, по-видимому, все или почти все фаговые и бактериальные ДНК-полимеразы, а также многие ДНК-полимеразы животных и вирусов животных. Редактирующая активность понижает частоту ошибок в 10–100 раз [2, 3]. Но имеется также и довольно большое число ДНК-полимераз, не обладающих $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью (тип В). Например, ДНК-полимеразы ϵ , δ и γ человека такую активность имеют, а ДНК-полимеразы α и β , а также обратные транскриптазы ретровирусов человека не имеют. Тем не менее эти ферменты также катализируют включение с достаточно высокой точностью (за исключением вирусных обратных транскриптаз, частота ошибок для которых примерно 10^{-4} [18, 19]). Применяемые в случае ДНК-полимераз типа В механизмы коррекции строго не выяснены и, по-видимому, разнообразны.

Среди вероятных редактирующих реакций в первую очередь исследовался пирофосфоролиз ошибочно включенного нуклеотидного остатка [2, 3]. Эта реакция в ее классическом представлении кажется маловероятной, так как из-за низкого сродства PP_i к активному центру ДНК-полимераз ее осуществление требует примерно 1 мМ концентрации PP_i в реакционной среде. А это в клетке нереально, в том числе и из-за присутствия неорганической пирофосфатазы, гидролизующей PP_i для сдвига равновесия катализируемой ДНК-полимеразами реакции в сторону элонгации цепи дДНК [2]. В другом варианте постулировалось удерживание PP_i в активном центре ДНК-полимеразы вплоть до транслокации и связывания нового dNTP на последующем этапе реакции [2]. Однако никаких прямых доказательств такого механизма реакции до настоящего времени не существует. Наконец, предположение о соучастии в комплексе с ДНК-полимеразой отдельной специфической $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазы имеет под собой некоторые основания [2], хотя не кажется нам очевидным. Для этого ДНК-синтезирующий комплекс после ошибочного включения нуклеотидного остатка должен предвзрительно диссоциировать с освобождением ДНК-полимеразы и с реассоциацией после экзонуклеазного отщепления $3'$ -концевого нуклеотидного остатка. Среди ДНК-полимераз такой механизм кажется достаточно вероятным для ДНК-полимеразы β , так

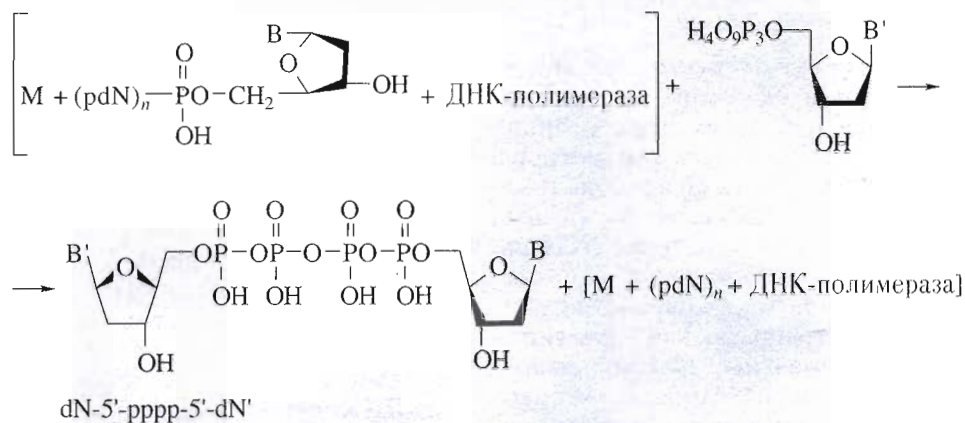


Схема 6. Реакция образования ди(дезоксинуклеозид)тетрафосфата (dN-5'-pppp-5'-dN') в процессе взаимодействия комплекса [M-дДНК + ДНК-полимераза] с некомплементарным матрице dNTP.

как этот фермент работает, по-видимому, главным образом по дистрибутивному механизму, т.е. с диссоциацией его комплекса с M-дДНК после каждого следующего шага [18].

В 1998 г. нами совместно с лабораторией из Университета Монпелье при исследовании стереохимического контроля биосинтеза ДНК было показано катализируемое рядом ДНК-полимераз образование ди(дезоксинуклеозид)тетрафосфата dN-5'-pppp-5'-dN', наблюдаемое при остановке элонгации дДНК [19]. Такая же реакция найдена и исследователями из США при изучении репарации цепей дДНК после терминации их синтеза модифицированными dNTP [20]. В соответствии с этой реакцией dNTP связывается с участком, на котором обычно локализуется PP_i в реакции катализируемого ДНК-полимеразой пирофосфоролиза, после чего эта молекула dNTP реагирует с 3'-концевым нуклеотидным остатком дДНК и в результате образуется dN-5'-pppp-5'-dN' (схема 6). В отличие от традиционного пирофосфоролиза дДНК концентрация dNTP, требуемая для реакции, на 1 – 1.5 порядка величины меньше, чем для PP_i.

Было логично думать, что если dN-5'-pppp-5'-dN' является продуктом ферментативной реакции, то он должен также быть субстратом элонгации. Действительно, мы показали, что dN-5'-pppp-5'-dN' проявляет субстратные свойства в реакции с ДНК-

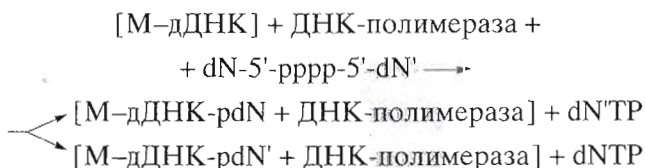


Схема 7. Реакция элонгации дДНК с использованием ди(дезоксинуклеозид)трифосфата dN-5'-pppp-5'-dN' в качестве субстрата.

полимеразами, удлиняя цепь дДНК (схема 7) [21]. При этом dN-5'-pppp-5'-dN' элонгирует цепь любым из двух своих нуклеотидных остатков, что определяется матрицей. Сродство dN-5'-pppp-5'-dN' к различным ДНК-полимеразам варьирует, отличаясь в 10–50 раз, причем в лучших случаях оно равно сродству традиционных субстратов dNTP. Мы полагаем, что совокупность реакций, показанных на схемах 6 и 7, обеспечивает редактирующую активность ДНК-полимераз, не имеющих 3'→5'-экзонуклеазной активности.

3. Репарация дуплексной ДНК

Наконец, репарация ДНК как результат специального контроля совершенства структуры дуплекса синтезированной ДНК осуществляется комплексом ферментов и будет рассмотрена с интересующих нас позиций в последнем разделе этого обзора, когда будут анализироваться особенности реакции, катализируемой ДНК-полимеразой β.

ОТДЕЛЬНЫЕ ВИДЫ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

Хотя биологическая задача всех ДНК-полимераз состоит в катализе синтеза ДНК и в общих чертах эти ферменты подобны, тем не менее каждый тип ДНК-полимераз имеет свои особенности, связанные с его конкретной биологической функцией и реализуемые через его структуру. Здесь будут обсуждены наиболее интересные с нашей точки зрения нетипичные ДНК-полимеразы.

В первую очередь это ДНК-полимераза β, особенности которой определяются ее функциями фермента репарации. Этот фермент удлиняет цепь ДНК на очень малое число нуклеотидных остатков либо даже на одно звено [22]. ДНК-полимераза β представляет собой медленно работающий фермент, который лишен 3'→5'-экзонук-

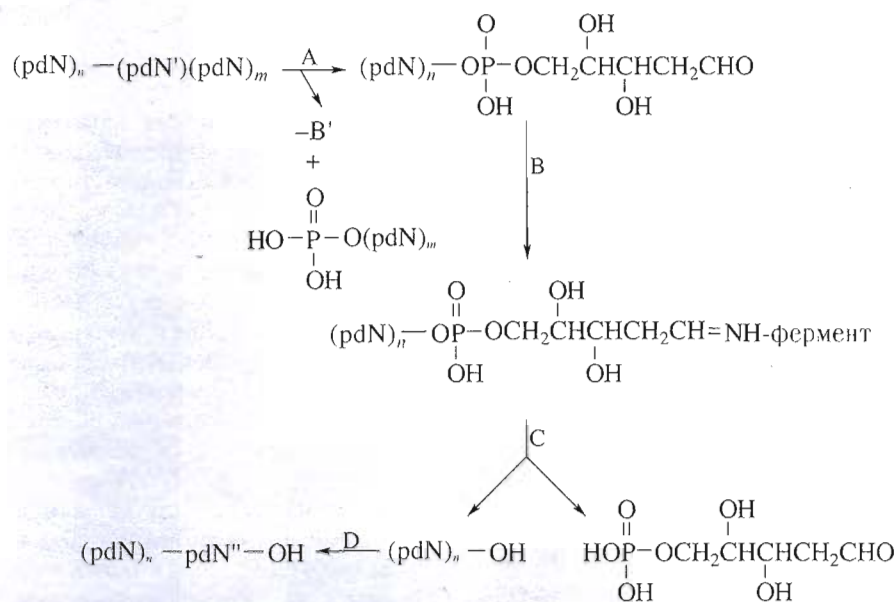


Схема 8. Гидролитическое удаление дезоксирибозилфосфата из репарируемой цепи ДНК, катализируемое ДНК-полимеразой β. Значение А–D см. в тексте.

леазной активности и к тому же обладает очень низкой пирофосфоролизной активностью [23, 24]. Еще одной его особенностью является присутствие дополнительной активности по удалению дезоксирибозилфосфатного остатка в процессе репарации ДНК [25, 26]. Процесс репарации ДНК при обнаружении ферментами репарации (о которых сказано ниже) неканонической пары в дуплексе ДНК проходит через ряд реакций. Обычно такая цепь реакций начинается с обнаружения и удаления одного из нуклеиновых оснований неканонической пары в ДНК (основание В' в реакции А на схеме 8), катализируемого соответствующим ферментом группы AP-эндонуклеаз типа II (апуриновых/апиримидиновых эндонуклеаз) [2, 3]. Затем происходит гидролитическое расщепление 3'-фосфоэфирной связи, причем фосфат остается в 5'-положении уходящей цепи ДНК (реакция А на схеме 8). Далее с 3'-концом ДНК в месте расщепления цепи связывается ДНК-полимераза β, при этом между остатком Lys⁷² фермента и альдегидной группой 3'-концевого гликозидного остатка образуется основание Шиффа (реакция В на схеме 8). Затем ДНК-полимераза β катализирует гидролитическое удаление дезоксирибозилфосфатного остатка (реакция С на схеме 8), таким образом освобождая 3'-конец для включения соответствующего канонической паре нуклеотида, также катализируемого ДНК-полимеразой β (реакция D на схеме 8). После этого ДНК-лигаза воссоединяет непрерывную цепь ДНК. Наряду с описанным вариантом репарации известны и другие репарационные процессы, восстанавливающие повреждения одной из цепей ДНК, возникающие в результате мутагенного, лучевого и других воз-

действий. При этом, по-видимому, во всех случаях заключительные стадии заполнения малых брешей катализируются ДНК-полимеразой β.

Рентгеноструктурный анализ комплексов [M-дДНК + ДНК-полимераза] и [M-дДНК + ДНК-полимераза + dNTP] показывает, что конформация ДНК-полимеразы β в них сильно различается [12]. При этом стадией, лимитирующей скорость процесса элонгации, является конформационное изменение, превращающее непродуктивный комплекс в продуктивный. Более того, такое превращение эффективно проходит лишь при образовании канонической комплементарной пары, вызывающей конформационное изменение за счет аллостерического влияния. Именно этот механизм главным образом обеспечивает точность синтеза, катализируемого ДНК-полимеразой β.

В качестве другого примера нетипичных ДНК-полимераз следует назвать обратные транскриптазы ретровирусов. Вероятно, к ним можно отнести и ДНК-полимеразу вируса гепатита В. Эта группа ферментов, как упоминалось выше, характеризуется очень низкой точностью обратной транскрипции/репликации, что определяет высокую генетическую вариабельность содержащих эти ферменты вирусов. Для вирусов этой группы характерно эволюционное разнообразие и быстрое приспособление к изменению окружающих условий. Наиболее ярко это свойство проявляется в выработке резистентности ВИЧ к воздействию ингибиторов. Например, резистентность к некоторым лекарствам, подавляющим репродукцию ВИЧ, повышается в 100 раз и более за 2–3 не-

дели. Действительно, учитывая частоту мутаций и величину генома вируса (около 9200 нт), легко вычислить, что за один раунд репликации в геноме вируса образуется в среднем одна мутация. Причины столь низкой точности обратных транскриптаз вирусов, связанные с необходимостью катализировать как обратную транскрипцию, так и репликацию, обсуждались нами выше, и потому мы хотели бы обратить внимание на полезную для человека сторону этой низкой точности.

Многочисленными исследованиями в ряде лабораторий показано, что пониженная субстратная специфичность обратных транскриптаз проявляется не только по отношению к матрице, но также и по отношению к гликону и трифосфатному остатку dNTP. Хотелось бы отметить, что впервые такой вывод был сделан в 1986 г. в ИМБ РАН в совместном исследовании групп Р.Ш. Бибилашвили и нашей [27–29]. Так, при замене гидроксильной группы в 3'-положении dNTP на разнообразные, в том числе и объемные, группировки при модификации любого из трех фосфатных остатков dNTP или всех трех фосфатов одновременно, а также при многих других модификациях не происходит значительной потери субстратных свойств таких модифицированных dNTP по отношению к обратным транскриптазам, но они полностью лишаются сродства к другим ДНК-полимеразам (см. [30–32]). Использование названного свойства обратных транскриптаз легло в основу создания всех лекарств нуклеозидной природы для лечения больных синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД) [33, 34].

Еще одним ферментом, значительно отличающимся по многим свойствам от канонических ДНК-полимераз, является концевая TDT. Этот независимый от матрицы фермент синтезирует цепи олигодезоксинуклеотидов как будто бы без очевидной программы. Его активность наблюдается, по-видимому, только в незрелых клетках крови, а также при некоторых типах лейкозиев. Есть основания считать, что TDT причастна к повышению разнообразия возникающих при иммунном ответе антител [35, 36], а также к апоптозу клеток [37].

Оказалось, что TDT отличается от остальных ДНК-полимераз в отношении субстратной специфичности тем, что она может включать в олигонуклеотиды нуклеотидные остатки из α -тио-dNTP, L-dNTP [38–41] и даже фосфаты или замещенные фосфаты [42]. Сродство перечисленных соединений к TDT не сильно отличается от такового для dNTP. Это позволяет сделать заключение, что активный центр фермента TDT специфично связывает только фосфатные остатки своих субстратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно из изложенного материала, исследование химических процессов в активном центре ДНК-полимераз имеет как теоретическое, так и прикладное значение. Можно утверждать, что еще многие проблемы, возникающие при изучении химических реакций, катализируемых разными ДНК-полимеразами, ждут решения. В свою очередь особенности этих реакций влияют на стереохимический контроль биосинтеза ДНК, на процессы мутагенеза и возникновения устойчивости к лекарствам. В настоящем обзоре не рассматривались ферментативные активности различных ДНК-полимераз, не связанные непосредственно с процессом элонгации цепей ДНК, а обеспечивающие некоторые другие функции этих ферментов. Тем не менее эти активности влияют на функционирование активного центра элонгации ДНК, и их анализ, видимо, может представить дополнительный интерес.

Работа поддержана грантами РФФИ № 99-04-48315, № 98-03-32930А и грантом “Ведущие научные школы” № 96-15-97646.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lehman I.R., Bessman M.J., Simms E.S., Kornberg A. // J. Biol. Chem. 1958. V. 233. P. 163–172.
2. Kornberg A. DNA Replication. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1980. P. 1–726; Kornberg A. Supplement to DNA Replication. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1982. P. 1–203.
3. Краевский А.А., Куханова М.К. Итоги науки и техники. Серия Молекулярная биология. 1986. Т. 22. С. 3–164.
4. Kohlstaedt L.A., Wang J., Friedman J.M., Rice P.A., Steitz T.A. // Science. 1992. V. 256. P. 1783–1790.
5. Huang H., Chopra R., Verdine G.L., Harrison S.C. // Science. 1998. V. 282. P. 1669–1675.
6. Polesky A.H., Steitz T.A., Grindley N.D.F., Joyce C.M. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 14579–14591.
7. Polesky A.H., Dahlberg M.E., Benkovic S.J., Grindley N.D.F., Joyce C.M. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 8417–8428.
8. Joyce C.M., Steitz T.A. // Annu. Rev. Biochem. 1994. V. 63. P. 777–822.
9. Pelletier H., Sawaya M.R., Kumar A., Wilson S.H., Kraut J. // Science. 1994. V. 264. P. 1891–1903.
10. Eom S.H., Wang J., Steitz T.A. // Nature. 1996. V. 382. P. 278–281.
11. Kunkel T.A. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 18251–18254.
12. Beard W.A., Wilson S.H. // Chemistry and Biology. 1998. V. 5. P. R7–R13.
13. Brautigam C.A., Steitz T.A. // Current Opinion in Structural Biology. 1998. V. 8. P. 54–63.
14. Doubie S., Tabor S., Long A.M., Richardson C.C., Ellenberger T. // Nature. 1998. V. 391. P. 251–258.

15. *Zenger B.* // Принципы структурной организации нуклеиновых кислот / Ред. Б.К. Вайнштейн. М.: Мир, 1987.
16. *Takeuchi Y., Nagumo T., Hoshino H.* // *J. Virol.* 1988. V. 62. P. 3900–3902.
17. *Bebenek K., Abbotts J., Roberts J.D., Wilson S.H., Kunkel T.A.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 16948–16956.
18. *Ono K., Ohashi A., Tanabe K., Matsukage A., Nishizawa M., Takahashi T.* // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 7. P. 715–726.
19. *Sosunov V.V., Santamaria F., Victorova L.S., Gosse- lin J., Rayner B., Krayevsky A.A.* // *Nucl. Acids Res.* 1999. (in press).
20. *Meyer P.R., Matsuura S.E., So A.G., Scott W.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 13471–13476.
21. *Victorova L.S., Sosunov V.V., Shipitsin A.V., Scob- lov A.A., Krayevsky A.A.* // *FEBS Lett.* 1999. V. 453. P. 6–10
22. *Krayevsky A., Kukhanova M., Alexandrova L., Belyako- va N., Krutyakov V.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 783. P. 216–220.
23. *Chang L.M.S., Bollum F.J.* // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. P. 3398–3404.
24. *Rosovskaya T., Tarussova N., Minassyan Sh., Atra- zhev A., Kukhanova M., Krayevsky A., Chidgeavadze Z., Beabealashvilli R.* // *FEBS Lett.* 1989. V. 247. P. 289–292.
25. *Matsumoto Y., Kim K.* // *Science.* 1995. V. 69. P. 699–703.
26. *Prasad R., Beard W.A., Chyan J.Y., Maciejewski M.W., Mullen G.P., Wilson S.H.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 11121–11126.
27. *Chidgeavadze Z.G., Beabealashvilli R.Sh., Krayev- sky A.A., Kukhanova M.K.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 868. P. 145–152.
28. *Краевский А.А., Куханова М.К., Атражев А.М., Чиджавадзе З.Г., Бибилашвили Р.Ш.* // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. С. 33–38.
29. *Krayevsky A.A., Kukhanova M.K., Atrazhev A.M., Dyat- kina N.B., Papchikhin A.V., Chidgeavadze Z.G., Bea- bealashvilli R.Sh.* // *Nucleosides and Nucleotides.* 1988. V. 7. P. 613–617.
30. *Краевский А.А.* // Молекулярн. биология. 1992. Т. 26. С. 725–744.
31. *Краевский А.А.* // Молекулярн. биология. 1994. Т. 28. С. 1245–1257.
32. *Краевский А.А., Чернов Д.Н.* // Молекулярн. био- логия. 1996. Т. 30. С. 991–1001.
33. *Mitsuya H.* // *J. Enzyme Inhibition.* 1992. V. 6. P. 1–8.
34. *De Clercq E.* // *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1998. V. 63. P. 449–477.
35. *Alt F., Baltimore D.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. P. 4118–4121.
36. *Komori T., Okada A., Stewart V., Alt F.W.* // *Science.* 1993. V. 261. P. 1171–1175.
37. *Koc Y., Urbano A.G., Sweeney E.B., McCaffrey R.* // *Leukemia.* 1996. V. 10. P. 1019–1024.
38. *Semizarov D.G., Victorova L.S., Dyatkina N.B., von Jan- ta-Lipinski M., Krayevsky A.A.* // *FEBS Lett.* 1994. V. 354. C. 187–190.
39. *Dyatkina N., Shirokova E., Theil F., Roberts S.M., Krayevsky A.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996. V. 6. P. 2639–2642.
40. *Dyatkina N., Semizarov D., Victorova L., Krayevsky A., Theil F., von Janta-Lipinski M.* // *Nucleosides Nucleo- tides.* 1995. V. 14. P. 723–726.
41. *Krayevsky A.A., Chernov D.N.* // *J. Biomol. Structure, Dynamics.* 1996. V. 14. P. 225–230.
42. *Arzumanov A.A., Victorova L.S., Yesipov D.S., Krayevsky A.A.* // *Nucl. Acids Res.* 1999 (in press).

Chemical Reactions Catalyzed by DNA Polymerases

A. A. Krayevsky[†]

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow 117984, Russia

Chemical reactions catalyzed by various DNA polymerases are discussed, including DNA chain extension, the 3'→5'-exonuclease proofreading activity, and some other pathways of replicative repair. The contribution of DNA polymerases to the fidelity of the template-dependent synthesis is analyzed by the examples of some most typical DNA polymerases.

Key words: DNA polymerases, substrates, chemical reactions, replication, repair

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.