



УДК 547.963.32.057:577.152.277'145

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА *E. COLI*. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА СВЯЗЫВАНИЯ ИНИЦИИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА С ПОМОЩЬЮ АНАЛОГОВ ОЛИГОТИМИДИЛАТОВ С ЭТИЛИРОВАННЫМИ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫМИ ФОСФАТНЫМИ ГРУППАМИ

Левина А. С., Невинский Г. А., Лаврик О. И.

*Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Синтезированы индивидуальные диастереомеры моноэтиловых эфиров олиготимидилатов (с энантиомерными конфигурациями при атоме фосфора): $d[(Tr)_8Tr'(Et)T]$ (I), $d[(Tr)_8Tr''(Et)T]$ (II), $d[(Tr)_8Tr'(Et)TrT]$ (III), $d[(Tr)_8Tr''(Et)TrT]$ (IV) и полностью этерифицированный аналог $d[(Tr(Et))_7T]$ (V), представляющий собой смесь диастереомеров. Все соединения инициировали реакцию полимеризации на матрице poly(dA), катализируемую ДНК-полимеразой I *E. coli*. Величины максимальной скорости превращения (и величины K_m) для олиготимидилатов (I)–(V) составляли 14; 2,6; 68; 24; 0,1% (2,7; 2,5; 0,38; 0,51 и 7,2 мкМ соответственно) по отношению к величине $V_{max}(100\%)$ для $d[(Tr)_9T]$ (K_m 0,4 мкМ).

Диастереомеры (I) и (II) не разрушались в коротком фрагменте полимеразы, проявляющим только 3'→5'-экзонуклеазную активность, но подвергались гидролизу за счет 5'→3'-нуклеазной активности полного фермента со скоростью, приблизительно в 3 и 10 раз меньшей, чем $d[(Tr)_9T]$.

Сделан вывод о том, что наряду с комплементарным взаимодействием праймера с полимерной цепью значительный вклад в связывание инициирующего субстрата вносит электростатический контакт положительной заряженной группы белка с первой (считая с 3'-конца) межнуклеотидной фосфатной группой затравки. На стадии подстройки и дальнейшего превращения субстрата существенную роль играют другие немодифицированные фосфодиэфирные группы (особенно первая и вторая с 3'-конца).

В последнее время для комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот успешно используют неионные аналоги олигонуклеотидов с этерифицированными межнуклеотидными фосфатами [1, 2]. Такие соединения представляются перспективными для исследования механизмов взаимодействия нуклеотидов с участками связывания матриц и инициирующих субстратов РНК- и ДНК-полимераз и выявления роли межнуклеотидных фосфатов олиго- и полинуклеотидов в процессах связывания и дальнейшего роста цепей.

В связи с этим для исследования ДНК-полимераз I из *E. coli* (КФ 2.7.7.7) проведен синтез индивидуальных диастереомеров моноэтиловых эфиров олигонуклеотидов с различными положениями этильной группы относительно их 3'-конца и полностью этилированного октануклеотида*: $(Tr)_8Tr'(Et)T$ – первый изомер (I); $(Tr)_8Tr''(Et)T$ – второй изомер (II); $(Tr)_8Tr'(Et)TrT$ – первый изомер (III); $(Tr)_8Tr''(Et)TrT$ – второй изомер (IV); $[Tr(Et)]_7T$ – смесь изомеров (V).

Сокращения: TPS – 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорид, ClPh – *n*-хлорфенил, Lev – левулинил, Tr – тритил, Neres – 2-*N*-гидроксиэтилпиперазин-*N'*-2-этансульфокислота. Префикс *d* в обозначении олиготимидилатов опущен, так как в статье упоминаются только производные 2'-дезокситимидина.

* Обозначения *p'* и *p''* соответствуют тетраэдрическим атомам фосфора, входящим в состав триэфирных производных и имеющих энантиомерную конфигурацию. Так как абсолютная конфигурация при атомах фосфора неизвестна, изомеры $(Tr)Tr(Et)T(Lev)$ обозначены в порядке элюции с силикагеля (*p'*, затем *p''*). Эти обозначения сохранены для более длинных моноэтиловых производных олиготимидилатов, полученных на основе индивидуальных диастереомеров динуклеотидов.

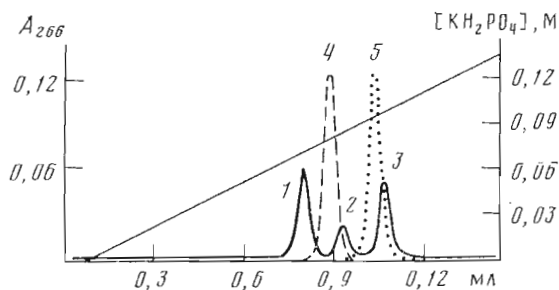


Рис. 1. Микроколоночная ионообменная хроматография смеси немодифицированных олиготимидилатов $(\text{Tr})_7\text{T}$ (1), $(\text{Tr})_8\text{T}$ (2), $(\text{Tr})_9\text{T}$ (3), а также препаратов моноэтилированного декатимидилата (I) (пик 4) и ундекатимидилата (IV) (пик 5)

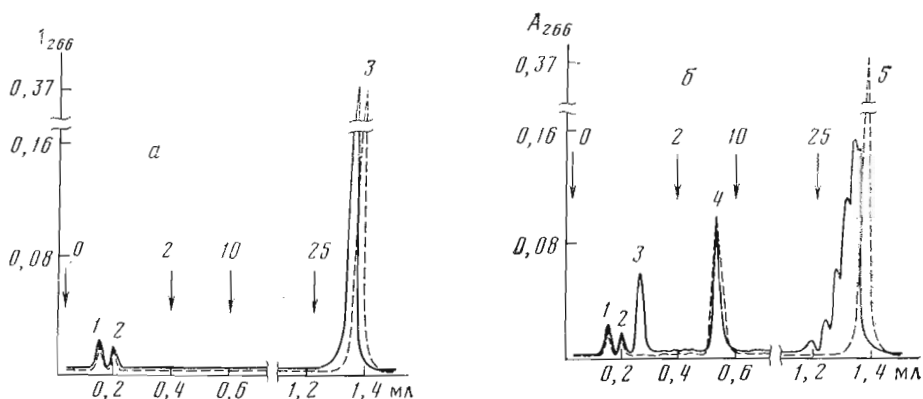


Рис. 2. Разделение с помощью микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии продуктов 6-часовой инкубации в стандартных условиях в присутствии poly(dA) (см. «Экспер. часть») олиготимидилатов $(\text{Tr})_9\text{T}$ (сплошная линия) и $(\text{Tr})_8\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ (I) (штриховая линия) без фермента (а) и с кленовским фрагментом ДНК-полимеразы (б). Пики 1 и 2 — компоненты реакционной смеси (Hepes/NaOH, MgCl_2 , KCl, EDTA), 3 — исходные олиготимидилаты (а) и dTMP (б), 4 — dAMP, 5 — декатимидилат (I) и продукты гидролиза $(\text{Tr})_9\text{T}$. Стрелками указаны ступени элюента и содержание в нем метанола в %

Соединение $[\text{Tr}(\text{Et})]_7\text{T}$ было получено в виде смеси диастереомеров из полностью защищенного октатимидилата $(\text{Tr})\text{Tr}(\text{ClPh})[\text{Tr}(\text{ClPh})]_6\text{T}(\text{Lev})$ с помощью реакции переэтерификации [3] с последующим удалением концевых защитных групп. Индивидуальные диастереомеры (I) и (II) синтезированы конденсацией октатимидилатов с индивидуальными диастереомерами динуклеотидов и выделены с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографий. Гомогенные препараты диастереомеров получены с помощью дополнительных микроколоночной ионообменной и обращенно-фазовой хроматографий. При ионообменной хроматографии декануклеотиды $(\text{Tr})_8\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ и $(\text{Tr})_8\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ проявляли подвижность, промежуточную между $(\text{Tr})_7\text{T}$ и $(\text{Tr})_8\text{T}$ (рис. 1). В случае обращенно-фазовой хроматографии они элюировались со смолы при несколько большей концентрации метанола, чем $(\text{Tr})_9\text{T}$ (рис. 2а). Эти данные показывают, что заряд декатимидилатов равен заряду нонатимидилата $(\text{Tr})_8\text{T}$ и что в них содержится гидрофобная этильная группа. Дополнительное доказательство структуры моноэтилированных декатимидилатов (I) и (II) было получено с помощью их гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда (рис. 3). Следует отметить, что этерифицированные межнуклеотидные фосфатные группы не подвергаются действию фосфодиэстеразы [4].

Согласно данным обращенно-фазовой хроматографии, полные гидролизаты первого (I) и второго (II) изомеров содержали dThd, dTMP и $\text{pTr}(\text{Et})\text{T}$ в соотношении 1 : 7 : 1 и 1 : 7 : 1,03 соответственно.

Инкубация $(\text{Tr})_9\text{T}$ с кленовским фрагментом в присутствии poly(dA) без dTTP приводила к заметному гидролизу олиго- и полинуклеотидов

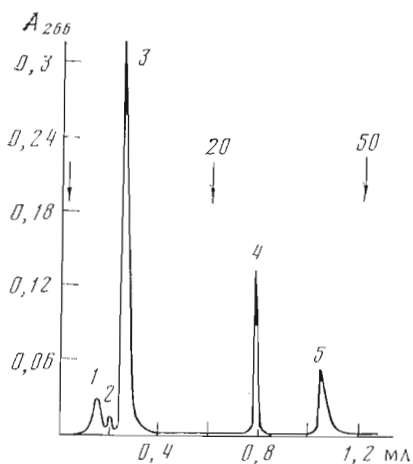


Рис. 3

Рис. 3. Микроколоночная обращенно-фазовая хроматография гидролизата, полученного при инкубации декатимидилата (I) с фосфодиэстеразой: 1 и 2 — компоненты реакционной смеси, 3 — dTMP, 4 — dThd, 5 — pTr'(Et)T. Стрелками указаны ступени элюсита и содержание в них метанола в %

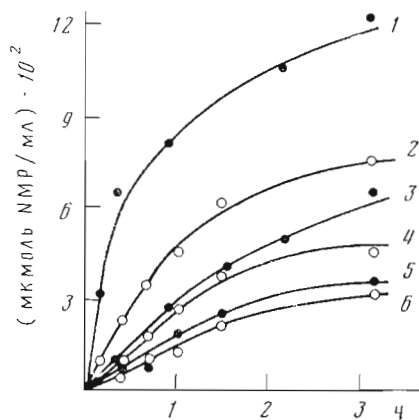


Рис. 4

Рис. 4. Кинетические кривые накопления dTMP и dAMP при гидролизе олиготимидилатов ДНК-полимеразой I: 1 и 2 — dTMP и dAMP соответственно в случае (Tr)₈T, 3 и 4 — в случае (Tr)₈Tr'(Et)T (I), 5 и 6 — в случае (Tr)₈Tr''(Et)T (II). Условия см. в «Экспер. части»

за счет наличия у этого фермента 3'→5'-экзонуклеазной активности с образованием мононуклеотидов (dTMP и dAMP) и олиготимидилатов, содержащих 5—9 мономерных звеньев (рис. 2б). В то же время индивидуальные диастереомеры декатимидилатов (I) и (II) при инкубации с фрагментом в аналогичных условиях не претерпевали превращений, однако в обоих случаях наблюдался гидролиз poly(dA) (рис. 2а, б). Было показано, что диастереомеры (I) и (II) являются иницирующими субстратами реакции полимеризации, катализируемой кленовским фрагментом ДНК-полимеразы *E. coli*. Это позволило получить из декатимидилатов (I) и (II) индивидуальные диастереомеры ундекатимидилатов (Tr)₈Tr'(Et)TrT (III) и (Tr)₈Tr''(Et)TrT (IV), выделенные из реакционных смесей в гомогенном состоянии с помощью последовательных микроколоночной обращенно-фазовой и ионообменной хроматографий. В первом случае моноэтилированные ундекатимидилаты элюировались метанолом при несколько большей его концентрации, чем для (Tr)₈T, а во втором случае их подвижность была промежуточной между (Tr)₈T и (Tr)₈T (рис. 1). После обработки фосфодиэстеразой гидролизаты изомеров (III) и (IV) содержали dThd, dTMP и pTr(Et)T в соотношении 1 : 8 : 1,05 и 1 : 8 : 0,97, что в совокупности с данными по хроматографической подвижности доказывало их структуру.

Как упоминалось выше, индивидуальные диастереомеры моноэтилированных декатимидилатов (I) и (II) не гидролизуются кленовским фрагментом, проявляющим 3'→5'-экзонуклеазную активность. Эту активность связывают с корректирующей функцией ДНК-полимеразы I при синтезе полимерной цепи [5, 6]. В то же время полному ферменту — ДНК-полимеразе I *E. coli* — присуща также 5'→3'-экзонуклеазная активность, которую проявляет малый фрагмент белка [5]. Поэтому мы исследовали возможность гидролиза полным ферментом диастереомеров декатимидилата, содержащих этильную группу на первом с 3'-конца межнуклеотидном фосфате. Из рис. 4 видно, что скорость гидролиза изомеров декатимидилата (I) и (II) примерно в 2,5—3 и 10—12 раз меньше, чем (Tr)₈T. Более высокая скорость гидролиза последнего, вероятно, связана с одновременным проявлением 3'→5'- и 5'→3'-нуклеазных активностей фермента. Как следует из работы [6], 5'→3'-нуклеазная активность полного фермента проявляется при наличии дуплекса комплементарных цепей.

В связи с этим можно предположить, что разница в скорости гидролиза индивидуальных диастереомеров (I) и (II) — следствие различия в эффективности образования ими дуплексов с poly(dA) на малом фрагменте фермента. Диастереомер $(\text{Tr})_8\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (II) не только сам гидролизуется с меньшей скоростью, чем альтернативный изомер (I), но в его присутствии наблюдается заметное ингибирование скорости гидролиза poly(dA). По-видимому, прочность комплекса poly(dA) с диастереомером (I) на малом фрагменте ниже, чем со вторым изомером (II).

Принимая во внимание отсутствие гидролиза диастереомеров моноэтилированных олиготимидилатов (I) и (II) большим фрагментом ДНК-полимеразы, следует полагать, что такие олигонуклеотиды могут быть использованы для дискриминации 5'→3'- и 3'→5'-экзонуклеазных активностей полного фермента.

Известно, что в качестве праймеров реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразами, могут служить только поли- и олигонуклеотиды, комплементарные однополовой цепи нуклеиновой кислоты, связанной с матричным участком фермента. Очевидно, что наличие комплементарности цепей играет важную роль в этом процессе. Однако до настоящего времени остается непонятой до конца роль межнуклеотидных фосфатов в процессе связывания и дальнейшего превращения иницирующих субстратов. Для исследования этого вопроса мы попытались применить этерифицированные по межнуклеотидным фосфатам аналоги олиготимидилатов. Использование таких соединений могло выявить вклад отдельных межнуклеотидных фосфатов (в различных положениях относительно 3'-конца праймера) и отрицательного заряда затравки в целом.

Было показано, что все синтезированные нами этилированные олиготимидилаты являются субстратами, иницирующими рост цепи, катализируемый ДНК-полимеразой *E. coli*.

Чтобы избежать занижения величин K_m и завышения величин максимальных скоростей реакции полимеризации за счет увеличения длины иницирующих субстратов, концентрации ДНК-полимеразы и $[^3\text{H}]d\text{TTP}$ были подобраны такими, чтобы включение $[^3\text{H}]d\text{TMP}$ в растущую цепь составляло не более 0,005—0,1 моль на 1 моль присутствующего в реакционной смеси иницирующего субстрата. На рис. 5 и 6 в качестве примера приведены зависимости скорости включения $[^3\text{H}]d\text{TMP}$ в растущую цепь от концентрации иницирующего субстрата для некоторых диастереомеров. Данные о величинах K_m и $V_{\text{макс}}$ для всех синтезированных этилированных окта-, дека- и ундекатимидилатов и контрольных неэтилированных олигонуклеотидов той же длины приведены в таблице. Сравнение этих величин для индивидуальных диастереомеров $(\text{Tr})_8\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ (I), $(\text{Tr})_8\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (II), а также $(\text{Tr})_8\text{T}$ и $(\text{Tr})_7\text{T}$, полученных в случае клевовакского фрагмента и полного фермента ДНК-полимеразы I, показывает, что наличие малого фрагмента полимеразы в составе полного белка практически не влияет на сродство и относительные величины максимальных скоростей превращения субстратов на большом фрагменте фермента. Введение этильной группы по первому с 3'-конца межнуклеотидному фосфату уменьшает сродство декатимидилатов (I) и (II) к ферменту в 6—7 раз независимо от того, в какой энантиомерной конфигурации (p' или p'') находится атом фосфатной группы. Из сравнения величин K_m для $[\text{Tr}(\text{Et})]_7\text{T}$ (V), с одной стороны, и $(\text{Tr})_7\text{T}$ — с другой, видно, что этилирование всех межнуклеотидных фосфатных групп также уменьшает сродство олигонуклеотида в 6—7 раз.

Можно полагать, что величины K_m в основном характеризуют процесс образования комплекса фермента с субстратами. В связи с этим полученные данные свидетельствуют в пользу того, что на стадии образования комплекса праймера с полинуклеотидной цепью в участке связывания матрицы существенную роль играет отрицательный заряд первой с 3'-конца фосфодиэфирной группы иницирующего субстрата. Это предположение подтверждается увеличением сродства ундекатимидилатов с одним этилированным межнуклеотидным фосфатом во втором положении с 3'-конца. Величины K_m для ундекатимидилатов $(\text{Tr})_8\text{Tr}'(\text{Et})\text{TrT}$ (III) и

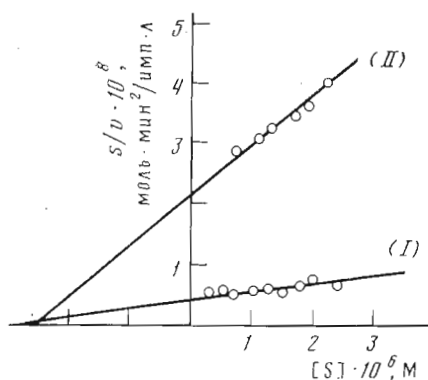


Рис. 5

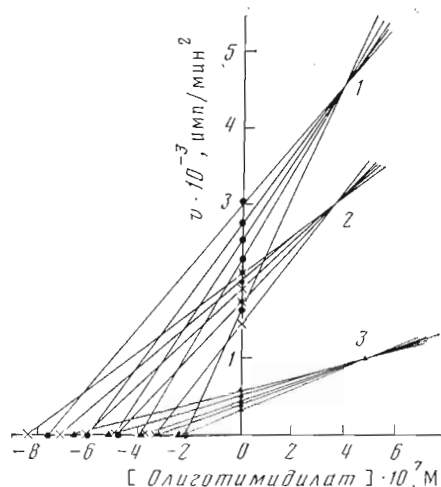


Рис. 6

Рис. 5. Зависимости скорости реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразой I, от концентрации $(\text{Tr})_8\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ (I) и $(\text{Tr})_8\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (II)

Рис. 6. Зависимости скорости реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразой I, от концентрации $(\text{Tr})_8\text{T}$ (1), $(\text{Tr})_8\text{Tr}'(\text{Et})\text{TrT}$ (2) и $(\text{Tr})_8\text{Tr}''(\text{Et})\text{TrT}$ (3) в прямых линейных координатах Эйзенляля и Корнинг-Бюдена [7]

$(\text{Tr})_8\text{Tr}''(\text{Et})\text{TrT}$ (IV) сравнимы с величиной K_m для неэтилированного декатимидилата $(\text{Tr})_8\text{T}$ и практически не отличаются от таковой для ундекатимидилата $(\text{Tr})_{10}\text{T}$.

Совокупность полученных данных говорит о том, что на стадии связывания иницирующего субстрата не происходит образования большого числа электростатических контактов фосфатных групп субстрата с молекулами фермента. Наряду с образованием дуплекса комплементарных цепей на полимеразе дополнительная фиксация иницирующего субстрата, по-видимому, происходит за счет образования электростатической связи или магшевого мостика в участке связывания ферментом первого с 3'-конца межнуклеотидного фосфата.

В связи с этим следует отметить особую роль ДНК-полимеразы в образовании дуплекса комплементарных цепей. Так, взаимодействие комплементарных цепей в комплексе с ферментом происходит при более низкой концентрации, чем свободных цепей в растворе [8].

Как следует из работ [9, 10], разные диастереомеры образуют различные по прочности комплексы с комплементарными цепями олигонуклеотидов. Поскольку октатимидилат $[\text{Tr}(\text{Et})]_7\text{T}$ (V) представляет собой смесь 128 изомеров со статистическим распределением в цепи атомов фосфора в p' - и p'' -энантиомерных конфигурациях, можно было ожидать, что различные диастереомеры этой смеси будут образовывать комплексы разной прочности с $\text{poly}(\text{dA})$ на ферменте. В то же время из данных таблицы следует, что эффективность образования комплекса $\text{poly}(\text{dA})$ со смесью изомеров неионного аналога (V) на полимеразе определяет практически только модификация первой с 3'-конца фосфодифирной связи. По-видимому, дополнительное взаимодействие комплементарных цепей с ферментом нивелирует разницу в эффективности образования дуплексов разных диастереомеров октатимидилата (V) с $\text{poly}(\text{dA})$.

Особый интерес представляет анализ максимальных скоростей превращения использованных нами олиготимидилатов. Величины $V_{\text{макс}}$ в основном характеризуют способность субстрата подвергаться превращению на ферменте. Как видно из таблицы, этилирование первого с 3'-конца межнуклеотидного фосфата приводит к понижению величины $V_{\text{макс}}$ индивидуальных диастереомеров декатимидилата (I) и (II) в 7–10 и 40–55 раз соответственно по отношению к неэтилированному олигонуклеотиду $(\text{Tr})_8\text{T}$. Введение этильной группы во второе положение с 3'-конца в слу-

**Величины K_{m} и максимальных скоростей превращения
иницирующих субстратов ДНК-полимеразы I и кленовского
фрагмента фермента ***

| Олиготимидилат | K_m , мкМ | V_{max}^{**} , % |
|------------------------------------|-------------|--------------------|
| (Tr) ₁₀ T | 0,36 | 110 |
| (Tr) ₉ T | 0,40 (0,41) | 100 (100) |
| (Tr) ₇ T | 1,1 (1,1) | 55 (52) |
| (Tr) ₈ Tr'(Et)TrT (III) | 0,38 | 68 |
| (Tr) ₈ Tr''(Et)TrT (IV) | 0,51 | 24 |
| (Tr) ₈ Tr'(Et)T (I) | 2,7 (3,1) | 14,4 (10) |
| (Tr) ₈ Tr''(Et)T (II) | 2,5 (2,6) | 2,6 (1,8) |
| [Tr(Et)] ₇ T (V) | 7,2 | 0,1 |

* В скобках указаны величины V_{max} и K_m , полученные с помощью кленовского фрагмента. Ошибка в определении величин составляла не более 10—20%. Точность в определении величины K_m для полностью этилированного октатимидилата (V) 50% (см. «Экспер. часть»).

** Максимальная скорость превращения декатимидилата (Tr)₉T принята за 100%.

чае ундекатимидилатов (III) и (IV) вызывает возрастание величины V_{max} в 5 и 9 раз по сравнению с таковыми для соответствующих декатимидилатов (I) и (II). Однако максимальные скорости превращения моноэтилированных ундекатимидилатов (III) и (IV) и неэтилированных олиготимидилатов (Tr)₉T и (Tr)₁₀T не равны, хотя для изомера (III) разница составляет всего 40—50%.

Величина максимальной скорости роста цепи в случае полностью этилированного октатимидилата [Tr(Et)]₇T (V) примерно в 10³ раз меньше, чем V_{max} для олигонуклеотида (Tr)₇T. Поскольку при введении одной этильной группы в случае более слабого субстрата из декатимидилатов — (II) наблюдается снижение V_{max} по сравнению с неэтилированным декатимидилатом (Tr)₉T в 55 раз, уменьшение этого параметра за счет введения в октатимидилат шести этильных групп по межнуклеотидным фосфатам можно оценить приблизительно в 15—20 раз.

Таким образом, на стадии каталитического превращения в отличие от стадии первичного образования комплекса важен не только первый, но и второй, а возможно, и третий с 3'-конца межнуклеотидный фосфат.

Эти данные в определенной степени согласуются с результатами работы Миллера с соавт. [11], где было исследовано взаимодействие ДНК-полимеразы I из *E. coli* с аналогами олиготимидилатов Tr(TrTr')_nT(pT)_n (p' — межнуклеотидные метилфосфонатные группы с атомами фосфора в разных энантиомерных конфигурациях). Индивидуальные диастереомеры с $n=1-2$ при концентрации 0,5 мкМ вообще не стимулировали реакции полимеризации, в то время как начальная скорость синтеза олиготимидилатов с $n=3-5$ возрастала от 12 до 98% и от 0 до 33% по отношению к (Tr)₁₁T (100%) в случае альтернативных энантиомерных конфигураций при модифицированных атомах фосфора. Авторы сделали вывод, что в связывании праймера с полимеразой участвуют первые пять с 3'-конца межнуклеотидных фосфатных групп и что для протекания реакции полимеризации необходимо наличие отрицательных зарядов по крайней мере на первой и второй межнуклеотидных фосфодиэфирных группах. Наши данные не согласуются со второй частью этого вывода. Этилирование первого с 3'-конца межнуклеотидного фосфата, как было показано выше, хотя и приводит к уменьшению эффективности связывания и каталитического превращения праймера, но полностью не исключает возможности протекания реакции. Этилирование же второго межнуклеотидного фосфата заправки вообще влияет только на величину V_{max} ее превращения.

Разница результатов, полученных нами и в работе [11], может быть следствием того, что в случае полимеразы этирифицированные межнуклеотидные фосфатные группы могут лучше, чем метилфосфонатные межнуклеотидные группы, моделировать природные фосфодиэфирные связи

в полинуклеотидах. В пользу этого предположения свидетельствуют величины K_m и V_{\max} для ундекатимидилатов (III) и (IV), сравнимые с аналогичными величинами для немодифицированных $(Tr)_9T$ и $(Tr)_{10}T$, в то время как фосфонатные аналоги олиготимидилатов, содержащие метильную группу даже на втором фосфате с 3'-конца, вообще не проявляют иницирующих свойств при концентрациях, сравнимых с величиной K_m для немодифицированных олигонуклеотидов.

С нашей точки зрения, уменьшение V_{\max} превращения аналогов (I), (II) и (V) может быть следствием двух причин. Прежде всего, блокирование первой с 3'-конца фосфодиэфирной группы, возможно, препятствует образованию электростатического мостика между этой группой в олигонуклеотидах (I) и (II) и ферментом. Не исключена в связи с этим возможность смещения субстратов на ферменте и образования электростатического мостика с участием второй с 3'-конца фосфодиэфирной группы. Первый с 3'-конца мононуклеотид цепи иницирующего субстрата в этом случае попадает в участок связывания dNTP, что должно приводить к ингибированию реакции полимеризации. Уменьшение V_{\max} полностью этилированного октатимидилата (V) в 15–20 раз по сравнению с декатимидилатами (I), (II) в рамках рассмотренной модели может быть следствием смещения субстрата в сторону участка связывания dNTP не только на одно, но и на большее число нуклеотидных звеньев из-за полного отсутствия зарядов на межнуклеотидных фосфатах. Число молекул октатимидилата (V), связанных с ферментом правильным образом, когда концевая 3'-ОН-группа может выполнять роль акцентора фосфата, встраивающегося в цепь мононуклеотида, при этом должно уменьшаться.

Высказано предположение о том, что связывание иницирующего субстрата с полимеразой и особенно наличие у него концевой 3'-ОН-группы существенно для формирования активного состояния dNTP-связывающего участка фермента [42]. Учитывая эти данные, следует полагать, что уменьшение величины V_{\max} для олиготимидилатов (I), (II) и (V) может быть также следствием разной способности этилированных субстратов после образования их комплексов с матрицей подвергаться дальнейшей подстройке до оптимально необходимой для катализа конформации и «подгонке» концевой 3'-ОН-группы до состояния, когда она может выполнять роль акцентора. Следует отметить, что оба указанных выше фактора могут одновременно играть важную роль в снижении субстратной активности этилированных олиготимидилатов (I), (II) и (V).

Величины V_{\max} для изомера (I) в 5–6 раз больше, чем для изомера (II) декатимидилата. Соответствующие ундекатимидилаты (III) и (IV) превращаются со скоростями, различающимися в 2,5–3 раза. В обоих случаях максимальная скорость превращения меньше для изомеров, имеющих p'' -энантиомерную конфигурацию этилированного атома фосфора. По-видимому, в случае этой конфигурации атома фосфора этильная группа направлена в сторону участка связывания иницирующего субстрата с белком и стерически мешает более эффективной подстройке олигонуклеотидов до оптимально необходимой для катализа конформации.

Поскольку некомплементарные матрице олигонуклеотиды не способны иницировать реакцию полимеризации, но в то же время полностью этилированные олиготимидилаты являются субстратами ДНК-полимеразы, очевидно, что существенный вклад в связывание, подстройку и дальнейшее превращение затравки вносит ее комплементарное связывание с матрицей, эффективность которого повышается за счет взаимодействия с ферментом. Этот вывод согласуется с данными о порядке связывания лигандов ДНК-полимеразы с ферментом при протекании реакции полимеризации: первой связывается молекула нуклеиновой кислоты в участке связывания матрицы, затем иницирующий субстрат в участке связывания затравки, и последними связываются нуклеозид-5'-трифосфаты [43]. Совокупность этих данных объясняет зависимость связывания затравки от комплементарной цепи в участке связывания матрицы.

Как следует из полученных нами результатов, блокирование отрица-

тельно заряженного первого с 3'-конца межнуклеотидного фосфата приводит к существенному уменьшению сродства и скорости превращения иницирующего субстрата. Следовательно, образование электростатической связи или магниевого мостика с участием этого фосфата, так же как и комплементарность цепей, играет важную роль в проявлении ферментом каталитической активности. С другой стороны, межнуклеотидные фосфаты цепи праймера в определенной степени «безличны», что в принципе могло бы приводить к образованию электростатической связи между ферментом и любым из них. По-видимому, при образовании комплекса праймера и матрицы на ферменте, когда концевая 3'-ОН-группа может служить акцептором фосфата, встраивающегося в цепь мононуклеотида, существуют дополнительные механизмы правильной фиксации затравки на ферменте. Такими механизмами могут быть как узнавание ферментом концевой 3'-ОН-группы, так и узнавание основания первого с 3'-конца мононуклеотида. Дополнительные механизмы фиксации способны играть особенно важную роль при удлинении цепи иницирующего субстрата на гомополимерной матрице.

Полученные результаты указывают на явную зависимость эффективности связывания и каталитического превращения иницирующего субстрата от наличия отрицательных зарядов на первом и втором фосфатах, но не во всей цепи длинного праймера. Это позволяет предположить, что свойства праймеров могут проявлять короткие олигонуклеотиды вплоть до динуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали препарат ДНК-полимеразы I из *E. coli* MRE-600 производства НИС НГУ с удельной активностью $3 \cdot 10^3$ ед. акт./мг. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализировало включение 10 нмоль нуклеотида в течение 30 мин при 37°C в кислотонерастворимую фракцию. Удельная активность фермента определена в 50 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (рН 7,4) согласно работе [14]. Препарат фермента был свободным от экзо- и эндонуклеаз и содержал, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, менее 5% примесей белков.

Препарат кленовского фермента любезно предоставлен С. В. Мамаевым (НИБХ СО АН СССР). Фермент был выделен из суперпродуцентного генно-инженерного штамма *E. coli* и не содержал 5' → 3'-экзонуклеазной активности, характерной для ДНК-полимеразы I, а также примесей других нуклеаз.

Препарат фосфодиэстеразы из яда кобры *Naja naja oxiana* любезно предоставлен А. С. Буториным (НИБХ СО АН СССР).

В работе использовали (Tr)dThd, (CIPh)pT(Lev), TPS — препараты опытного химического производства НИОХ СО АН СССР, dTTP (НИКТИ БАВ, г. Бердск), Нерес (Ferak, ФРГ), бычий сывороточный альбумин (Koch-Light Laboratories, Англия), N-метилимидазол (Flaka, Швейцария), натриевую соль poly(dA) (Boeringer Mannheim, ФРГ), [^3H]dTTP с удельной активностью 836 ТБк/моль (Изотоп, СССР), остальные реактивы квалификации х.ч. и ос.ч.

Спектры ^{31}P -ЯМР записывали на импульсном спектрометре НХ-90 с фурье-преобразователем на ЭВМ ВНС-12 (Bruker, ФРГ) на частоте 36,43 МГц. Химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.) относительно 85% ортофосфорной кислоты (знак «—» соответствует сдвигу в сильное поле).

УФ-спектры снимали на спектрометре Specord (Karl Zeiss, Jena, ГДР). УФ-спектры этилированных олиготимидилатов (I)–(V) не отличались от таковых для немодифицированных соединений.

ТСХ проводили на пластинках Kieselgel F 60 254 (Merck, ФРГ) в системах: хлороформ — этилацетат — метанол, 25 : 75 : 5 (А), 25 : 75 : 1 (В) и хлороформ — метанол, 8 : 2 (Г).

Колоночную хроматографию проводили на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, ФРГ). При разделении диастереомеров использовали колонку

размером 1,5×45 см и систему Б, а в остальных случаях колонку размером 4×12 см и градиент концентрации метанола в хлороформе.

Очистку олиготимидилатов осуществляли с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе Altex (США). В первом случае использовали колонку со смолой Partisil 10-SAX (Whatman, Англия) и градиент концентрации KH_2PO_4 (рН 6,5) от 0,05 до 0,3 М, содержащий 30% ацетонитрила, во втором — колонку с сорбентом Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ) и градиент ацетонитрила от 5 до 20% в 0,05 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 6,5). Колонки размером 10×250 мм, скорость хроматографии 6 мл/мин.

Очистку небольших количеств (до 2–3 OE_{266}) олигонуклеотидов и определение гомогенности продуктов синтеза проводили с помощью микроколоночной ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии на хроматографе «Милихром» отечественного производства. В первом случае использовали аминсилохром AC_{111} 300 (ИЦиГ СО АН СССР) и градиент концентрации KH_2PO_4 (рН 6,5) от 0 до 0,25 М, во втором — колонку с сорбентом Lichrosorb RP-18 ($1,5 \cdot 10^3$ теоретических тарелок) и градиент концентрации метанола от 0 до 70% в 0,02 М трис-ацетатном буфере (рН 7,8). Колонки размером 2×60 мм, скорость хроматографии 0,05–0,1 мл/мин.

Перед использованием олигонуклеотидов (I)–(IV) в экспериментах по определению величин K_m их подвергали обращенно-фазовой хроматографии в градиенте метанола, который затем удаляли в вакууме.

Окта- и ундекатимидилаты $(\text{Tr})_7\text{T}$ и $(\text{Tr})_{10}\text{T}$ получали, используя в качестве исходных мономеров $(\text{ClPh})\text{pT}(\text{Lev})$ и $(\text{Tr})\text{T}$ (концевой 5'-фрагмент), а в качестве конденсирующего реагента — TPS и метилимидазол [15]. Деблокирование олиготимидилатов осуществляли стандартным способом (концентрированный аммиак, 80% уксусная кислота). Целевые продукты выделяли ионообменной, а затем обращенно-фазовой хроматографией.

Октатимидилат $[\text{Tr}(\text{Et})]_7\text{T}$ получали из $(\text{Tr})\text{Tr}(\text{ClPh})[\text{Tr}(\text{ClPh})\text{T}]_6 \cdot \text{T}(\text{Lev})$ перэтерификацией в присутствии CsF [3]. Промежуточный этилированный октатимидилат выделяли гель-фильтрацией на сефадексе LH-20 (метанол — хлороформ, 1 : 1) и последующей хроматографией на силикагеле. После удаления тритильной и левулинильной защитных групп стандартным способом целевой продукт (V) дополнительно хроматографировали на силикагеле.

Диастереомеры $(\text{ClPh})\text{pTp}'(\text{Et})\text{T}(\text{Lev})$ и $(\text{ClPh})\text{pTp}''(\text{Et})\text{T}(\text{Lev})$. Реакцией $(\text{Tr})\text{T}$ с $(\text{ClPh})\text{pT}(\text{Lev})$ в присутствии TPS и метилимидазола [15] получали $(\text{Tr})\text{Tr}(\text{ClPh})\text{T}(\text{Lev})$ (660 мг, 600 мкмоль). Продукт выделяли хроматографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0–10%) и осаждали гексаном. Замену хлорфенильной группы на этильную проводили в присутствии CsF в смеси абс. хлороформ — абс. этанол (1 : 1) в течение 3 ч [3]. Окончание реакции определяли по исчезновению в спектрах ^{31}P -ЯМР сигнала исходного соединения при –5,6 м.д. и появлению двух сигналов при –2,3 и –2,6 м.д., соответствующих продуктам реакции. Получали $1 \cdot 10^4$ OE_{266} (550 мкмоль) смеси диастереомеров, которые затем разделяли 8-кратной хроматографией на колонке с силикагелем в системе (Б) согласно [16]. Таким образом выделяли 2580 OE_{266} более подвижного изомера $(\text{Tr})\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}(\text{Lev})$, имеющего также большую подвижность при ТСХ на силикагеле в системах А и Б, и 780 OE_{266} изомера $(\text{Tr})\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}(\text{Lev})$.

Каждый из диастереомеров обрабатывали 80% уксусной кислотой (кипячение, 10 мин), детритилированные продукты выделяли хроматографией на силикагеле (0–10% метанола в хлороформе) в количестве 2370 OE_{266} и 775 OE_{266} соответственно и осаждали гексаном из хлороформа. Полученные диастереомеры динуклеозидэтилфосфатов фосфорилировали по методу [17]: смесь 128 мкмоль $\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}(\text{Lev})$ и 774 мкмоль триазола сушили в вакууме над P_2O_5 , растворяли в 0,4 мл абс. пиридина и добавляли 360 мкмоль *n*-хлорфенилфосфодихлорида. Через 30 мин в реакционную смесь прибавляли 0,2 мл воды, через 1 ч продукт реакции выделяли хро-

матографией на силикагеле в градиенте концентрации метанола (0–40%) в хлороформе. Фракции, содержащие целевой продукт $(\text{ClPh})_p\text{Tr}'(\text{Et})\cdot\text{T}(\text{Lev})$, упаривали и хроматографировали на сефадексе LH-20 (колонка 100 мл, элюент — метанол) для отделения от примеси *n*-хлорфенилфосфата. Выделенный таким образом продукт осаждали эфиром из смеси хлороформ — метанол (1 : 1). Выход 102 мг (119 мкмоль, 93%).

Аналогично из 42 мкмоль $\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}(\text{Lev})$ получали изомер $(\text{ClPh})_p\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}(\text{Lev})$. Выход 37,4 мкмоль (89%).

Моноэтилированные декатимидилаты (I) и (II). Смесь 26 мг (7,8 мкмоль) $(\text{Tr})\text{Tr}(\text{ClPh})[\text{Tr}(\text{ClPh})]_s\text{T}$, 12,9 мг (15,0 мкмоль) $p(\text{ClPh})\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}(\text{Lev})$ и 19 мг (62,5 мкмоль) TPS сушили в вакууме над P_2O_5 , растворяли в 0,1 мл абс. пиридина и добавляли 10 мкл (120 мкмоль) метилмидазола. Через 30 мин реакционную смесь хроматографировали на силикагеле (0–15% метанола в хлороформе). Фракции, содержащие полностью блокированный декатимидилат, упаривали и обрабатывали концентрированным аммиаком (50°, 16 ч), а затем 80% уксусной кислотой (10 мин, кипячение). Выделяли $(\text{Tr})_s\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}(\text{I})$ (40 OE_{266}) с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографий.

Аналогичным образом получали 19,5 OE_{266} $(\text{Tr})_s\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (II). Препараты диастереомеров моноэтилированных декатимидилатов (I) и (II) анализировали с помощью микроколоночной и обращенно-фазовой хроматографий. В качестве контролей использовали олиготимидилаты $(\text{Tr})_7\text{T}$, $(\text{Tr})_8\text{T}$ и $(\text{Tr})_9\text{T}$.

Моноэтилированные эфиры ундекатимидилатов (III) и (IV). Реакционная смесь объемом 2 мл содержала: 50 мМ Hepes/NaOH -буфер (pH 8,0), 10 мМ MgCl_2 , 10 мМ KCl , 10 мМ EDTA , 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,32 $\text{OE}_{266}/\text{мл}$ $\text{poly}(\text{dA})$ (12 нмоль) и 1 OE_{266} (11 нмоль) одного из моноэтиловых эфиров декатимидилатов (I) или (II). После добавления соответственно 0,22 и 0,7 ед. акт. кленовского фрагмента реакционную смесь инкубировали 6 ч при 37° С. Суммарную фракцию дека-, ундека- и додекатимидилатов отделяли от остальных компонентов реакционной смеси с помощью микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии. Гомогенные препараты ундекатимидилатов (III) и (IV) выделяли хроматографией смеси олигонуклеотидов на ионообменном сорбенте с выходом 25–30% согласно поглощению при 266 нм. Моноэтилированные додекатимидилаты с энантимерными атомами фосфора получали с выходом 0,5–1,5%.

Определение состава и коэффициента молярного поглощения олигонуклеотидов. После приготовления смеси объемом 0,1–0,2 мл, содержащей 10 мМ трис- HCl -буфер (pH 8,0), 10 мМ MgCl_2 и 0,5–0,6 $\text{OE}_{266}/\text{мл}$ олигонуклеотида, измеряли поглощение при 266 нм с помощью микроспектрофотометра «Миличром». К смеси добавляли 1 мкл (8,5 ед. акт.) раствора фосфодиэстеразы и инкубировали ее 4 ч при 30° С (до полного гидролиза олигонуклеотида). Затем повторно измеряли поглощение раствора при 266 нм. При расчете коэффициентов молярного поглощения олигонуклеотидов использовали значения коэффициентов молярного поглощения $d\text{Thd}$, $d\text{TMP}$ — $9,6 \cdot 10^3$ [18], $\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ — $17,5 \cdot 10^3$ и $\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ — $18,1 \cdot 10^3$ [16] и получали следующие величины: для $(\text{Tr})_7\text{T}$ — $69,0 \cdot 10^3$, $(\text{Tr})_8\text{T}$ — $87,0 \cdot 10^3$, декатимидилатов (I) и (II) — $89,0 \cdot 10^3$, ундекатимидилатов (III) и (IV) — $97,7 \cdot 10^3$.

Для определения состава гидролизата после инкубации с фосфодиэстеразой аликвоты реакционной смеси (20–25 мкл) подвергали микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии с помощью ступенчатой элюции, используя три раствора по 0,6 мл 0,02 М трис- AcOH -буфера (pH 7,8), содержащего 0, 20 и 50% метанола. За выходом продуктов следили по поглощению при 266 нм. Обработка продукта, соответствующего пику $p\text{Tr}(\text{Et})\text{T}$, щелочной фосфатазой приводила к образованию $\text{Tr}(\text{Et})\text{T}$, элюируемому с колонки при прохождении 1,5 мл раствора (для $p\text{Tr}(\text{Et})\text{T}$ — 1,1 мл). Площади пиков определяли весовым методом. Было рассчитано, что гидролизаты декатимидилатов (I) и (II), а также ундекатимидила-

тов (III) и (IV) содержат dThd, dTMP и pTp (Et)T в соотношении 1:7:4; 1:7:1,03; 1:8:1,05; 1:8:0,97 соответственно.

Гидролиз олиготимидилатов ДНК-полимеразой I E. coli и кленовским фрагментом полимеразы при 30° С. Инкубационная смесь объемом 0,2–0,25 мл содержала Hepes/NaOH-буфер, MgCl₂, KCl, EDTA, poly(dA), бычий сывороточный альбумин, как в случае синтеза ундекатимидилатов, а также 3,1–3,2 мкМ олигонуклеотида: (Tp)₈T, декануклеотида (I) или (II). Реакцию начинали добавлением ДНК-полимеразы I до концентрации 3–4 ед. акт./мл или кленовского фрагмента – 0,4–0,5 ед. акт./мл (согласно активности в реакции полимеризации). Затем из реакционной смеси отбирали аликвоты (20–25 мкл) и быстро замораживали в жидком азоте. Состав реакционных смесей анализировали с помощью микроколонной обращенно-фазовой хроматографии и ступенчатого градиента метилового спирта (растворы по 0,3–0,4 мл, содержащие 0, 2, 20, 25 и 70% спирта). Место выхода dTMP, dAMP, бычьего сывороточного альбумина, декатимидилатов и poly(dA) наблюдали при концентрациях метанола 0, 2, 20, 25 и 70% соответственно. При расчете количества исходных компонентов и продуктов гидролиза площади пиков оценивали весовым методом.

Определение кинетических параметров, характеризующих связывание и каталитическое превращение иницирующих субстратов. Реакционная смесь объемом 0,05–0,1 мл содержала Hepes/NaOH-буфер, MgCl₂, KCl, EDTA, poly(dA), бычий сывороточный альбумин, как и в синтезе ундекатимидилатов, а также 30 мкМ [³H]dTTP с удельной активностью 300–400 ТБк/моль. Концентрацию олиготимидилатов (Tp)₇T, (Tp)₈T, (Tp)₁₀T, а также ундекатимидилатов (III) и (IV) варьировали в диапазоне 0,1–0,9 мкМ, а декатимидилатов (I) и (II) и октатимидилата (V) – в диапазоне 1–9 мкМ. Реакцию начинали добавлением 0,02–0,4 ед. акт. ДНК-полимеразы I или кленовского фрагмента в зависимости от максимальной скорости превращения иницирующего субстрата. В процессе инкубации смеси отбирали аликвоты (10–17 мкл) через интервалы, равные 1, 2, 10 мин в зависимости от V_{max} иницирующего субстрата. Количество вносимого фермента и интервалы отбора проб подбирали так, чтобы включение [³H]dTMP не превышало 0,005–0,1 моль нуклеотида на 1 моль олиготимидилата, присутствующего в реакционной смеси. Аликвоты смеси наносили на диски диаметром 2 см из бумаги FN-16, пропитанные 5% трихлоруксусной кислотой, содержащей 10 мМ пиррофосфат натрия. Диски промывали при 0° С 6 раз 5% трихлоруксусной кислотой, содержащей 10 мМ пиррофосфат натрия. Затем их отмывали от кислоты в холодном этиловом спирте, сушили и определяли их радиоактивность на счетчике Mark-III (Nuclear Chicago, США).

Величины K_m и максимальной скорости превращения рассчитывали с помощью графических методов: использовали зависимости скоростей реакции полимеризации от концентрации иницирующих субстратов в координатах s/v от s и в прямых линейных координатах согласно работе Эйзенталя и Корниша-Бодена [7]. Ошибка в определении констант составляла не более 10–20%. При определении концентраций олигонуклеотидов использовали коэффициенты молярного поглощения нуклеотидов, приведенные выше. В случае (Tp)₁₀T использовали величину 95,7·10³ согласно [19]. При расчетах концентрации [Tp(Et)]₇T коэффициент молярного поглощения принимали близким таковому для (Tp)₇T. Поскольку изменение этой величины для полностью этилированного аналога октатимидилата (V) не может быть больше, чем в 1,4–1,5 раза, следует считать, что величина K_m для соединения (V) определена с точностью ±50%.

Авторы глубоко признательны А. С. Буторину за любезно предоставленный препарат фосфодиэстеразы змеиного яда, В. В. Горну за препараты олиготимидилатов (Tp)₈T и (Tp)₉T, А. В. Лебедеву за помощь в разделении диастереомеров дишуклеотидов и полезные обсуждения в процессе выполнения работы, Д. Г. Кнорре и В. Ф. Зарытовой за постоянный интерес и внимание к работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Karova G. G., Knorre D. G., Rytte A. S., Stephanovich L. E.* FEBS Lett., 1980, v. 122, № 1, p. 21–24.
2. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Пичко Н. П., Райт А. С., Стефанович Е. М.* Биоорг. химия, 1981, т. 7, № 10, с. 1512–1522.
3. *Петренко В. Л., Поздняков П. И., Сиволобова Г. С., Шубина Т. Н.* Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 3, с. 516–521.
4. *Miller P. S., Chandrasegaran S., Dow D. L., Pulford S. M., Kan L. S.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 10, p. 5468–5474.
5. *Klenow H., Overgaard-Hansen H.* Eur. J. Biochem., 1974, v. 22, № 2, p. 371–381.
6. *Klenow H., Overgaard-Hansen H.* Eur. J. Biochem., 1974, v. 45, № 2, p. 623–627.
7. *Корниш-Боуден Э.* В кн.: Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1978, с. 260–266.
8. *Cassani G. R., Bollum F. S.* Biochemistry, 1969, v. 8, № 10, p. 3928–3936.
9. *Pless R. S., Ts'o P. O. P.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 6, p. 1239–1250.
10. *Карпова Г. Г., Козлова Л. О., Пичко Н. П.* Изв. СО АН СССР. Сер. хим., 1983, вып. 3, № 7, с. 95–100.
11. *Miller P. S., Annan N. D., McParland K. B., Pulford S. M.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 22, p. 2507–2512.
12. *Корнберг А.* В кн.: Синтез ДНК. М.: Мир, 1977, с. 68–118.
13. *Fisher P. A., Korn D.* Biochemistry, 1981, v. 20, № 11, p. 4560–4569.
14. *Бунева В. И., Демидова Т. В., Кнорре Д. Г., Кудряшова Н. В., Ромащенко А. Г., Старообразова М. Г.* Молекулярн. биология, 1980, т. 11, вып. 5, с. 1080–1087.
15. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Ромащенко В. П.* Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 516–521.
16. *Абрамова Т. В., Лебедев А. В.* Биоорг. химия, 1983, т. 9, № 6, с. 824–831.
17. *Sung W. L., Narang S. A.* Can. J. Chem., 1982, v. 60, № 2, p. 111–120.
18. *Schwarz* Bioresearch Radiochemical Catalog. N. Y., 1971, p. 51.
19. *Tazawa S., Tazawa J., Alfreder J. L., Ts'o P. O. P.* Biochemistry, 1972, v. 11, № 19, p. 3544–3558.

Поступила в редакцию
10.VIII.1984

E. COLI DNA POLYMERASE. A STUDY ON THE MECHANISM OF PRIMER BINDING USING OLIGOTHYMYDYLATE DERIVATIVES WITH ETHYLATED INTERNUCLEOTIDE PHOSPHATE GROUPS

LEVINA A. S., NEVINSKY G. A., LAVRIK O. I.

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

The following individual diastereomers of oligothymidylate ethyl esters (the alkyl phosphodiester group is asymmetric with *R* or *S* configuration) have been prepared: $d[(Tr)_8Tp'(Et)T]$ (I), $d[(Tp)_8Tp''(Et)T]$ (II), $d[(Tp)_8Tp'(Et)TpT]$ (III), $d[(Tp)_8Tp''(Et)TpT]$ (IV). A totally esterified analogue $d[(Tp(Et)_7]T]$ (V) was obtained as a diastereomeric mixture. All oligothymidylate derivatives revealed substrate activity as primers of DNA polymerase with poly(dA) as a template. The values of the maximal reaction rates were equal to 14; 2,6; 68; 24 and 0,1% for oligothymidylates (I)–(V) with respect to V_m value (100%) for $(Tp)_8T$. K_m values of oligothymidylates (I)–(V), 2,7; 2,5; 0,51; 7,2 μM , were obtained in relation to K_m for $d[(Tp)_8T]$ (0,4 μM). Diastereomers (I) and (II) were not destroyed by Klenow fragment of DNA polymerase I which has only 3'→5' exonuclease activity. However, these derivatives were hydrolyzed by complete DNA polymerase I due to its 5'→3' exonuclease activity, the reaction rate being 3–10 times lower than in case of $d[(Tp)_8T]$. The data suggest an essential contribution to the primer binding from the positive enzyme group interaction with the 3'-end negatively charged phosphate group of oligonucleotide, together with the primer complementary interaction with the template. At least two phosphodiester groups of the oligonucleotide primer are essential for the reaction of polymerization following the correct binding.