



№ ДК 577.152.277-6'14

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ

I. РОЛЬ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ ФОСФАТНЫХ ГРУПП ЗАТРАВКИ
В СВЯЗЫВАНИИ ЕЕ С ФЕРМЕНТОМНевзгский Г. А., Фролова Е. И., Левина А. Э.,
Подуст В. И., Лебедев А. В.Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР

Определена зависимость величин K_m и V от длины олиготимидилатов затравок и этилирования их межнуклеотидных фосфатных групп в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразой α из плаценты человека и ДНК-полимеразой I из *E. coli* при использовании poly(A) в качестве матрицы. Показано, что минимальными затравками для первого фермента могут служить ТМР и ТТР. В ряду от ТМР до $(Tr)_{14}T$ средство этого фермента к затравке возрастает в 1,8 раза, а величина V — в 1,4 раза при увеличении длины затравки на одно нуклеотидное звено вплоть до декануклеотида. При дальнейшем увеличении длины цепи средство возрастает в 1,3 раза, а величина V уменьшается. Аналогичная ситуация наблюдается при использовании ДНК-полимеразы I в ряду затравок $(Tr)_4T - (Tr)_{14}T$ с точкой перегиба для $(Tr)_8T$. Показано, что индивидуальные диастереомеры этиловых эфиров олиготимидилатов (обозначения p' и p'' соответствуют энантиомерным конфигурациям): $[Tr'(Et)Tr]_3Tr'(Et)T$, $[Tr''(Et)Tr]_3Tr''(Et)T$, $(Tr)_3Tr'(Et)T$, $(Tr)_3Tr''(Et)T$, $(Tr)_8Tr'(Et)TrT$, $(Tr)_8Tr''(Et)TrT$ и полностью этерифицированные аналоги $[Tr(Et)]_7T$, $[Tr(Et)]_{14}T$ (смеси изомеров) инициируют реакцию полимеризации на матрице poly(A), катализируемую обоими ферментами. На основании совокупности полученных данных сделан ряд предположений относительно связывания с ферментом затравки и матрицы, возможной роли при этом их предсформированного комплекса, роли электростатических контактов и водородных связей в таких взаимодействиях.

В настоящее время в литературе отсутствуют данные о природе взаимодействия, т. е. типе связей, образуемых между ДНК-полимеразой (дезоксинуклеозидтрифосфат: ДНК-дезоксинуклеотидилтрансфераза; ДНК-нуклеотидилтрансфераза; КФ 2.7.7.7) и матрицами и затравками (праймерами). Большинство исследователей, работающих с этим ферментом из разных источников, считают минимальной затравкой пентануклеотид. С другой стороны, показана принципиальная возможность синтеза poly(A) на матрице poly(T) ДНК-полимеразой α из клеток HeLa при использовании в качестве затравок ди-, три- и тетраденилатов (рибо- и дезоксирибояда), а также $r(A_rA)$ [2, 3].

ДНК-полимераза из *Micrococcus luteus* в системе poly(T)·oligo(rA) в качестве затравки использует $(p_rA)_4$ [4]. Фишер и Корн [5] для определения минимального размера затравки для ДНК-полимеразы α из культивируемых в культуре клеток KB использовали оригинальный подход: затравочный динуклеотид был связан с матрицей ковалентно, образуя с ней шпильчатую структуру. В этой системе наблюдалось удлинение затравки. Однако на основании имеющихся данных нельзя сделать каких-либо выводов о роли электростатических контактов, водородных связей и гидрофобных взаимодействий в процессах образования комплекса фермента с затравкой. Остается также неясным вопрос о минимальном размере затравки для ДНК-полимеразы.

Ранее нами [1] был описан синтез ряда этилированных по межнуклеотидным фосфатным группам аналогов олиготимидилатов, которые были

Сокращения: обозначения p' и p'' соответствуют тетраэдрическим атомам фосфора, входящим в состав триэфирных производных и имеющих энантиомерную конфигурацию [1]. Префикс d в обозначениях дезокси-нуклеотидов везде опущен (если не указано специально). V — максимальная скорость превращения субстрата.

исследованы в качестве затравок для ДНК-полимеразы I из *E. coli* с целью выявления роли межнуклеотидных фосфатных групп в процессах роста затравок при синтезе ДНК. В данной работе продолжено исследование влияния этилирования межнуклеотидных фосфатных групп на величины K_m и V в отношении затравок в зависимости от положения и числа этильных групп в их структуре в реакции, катализируемой ДНК-полимеразой I. При помощи указанных аналогов олиготимидилатов проведено сравнительное исследование роли межнуклеотидных фосфатных групп в связывании и превращении иницирующих субстратов ДНК-полимеразой I из *E. coli* и ДНК-полимеразой α из плаценты человека. Сделана попытка установить закономерности изменения величин K_m и V при изменении длины затравки от TMP до $(Tr)_{14}T$.

Для проведения сравнительного исследования были использованы следующие аналоги олиготимидилатов: октатимидилаты с чередующимися этилированными и неэтилированными межнуклеотидными фосфатными группами — $[Tr'(Et)Tr]_3Tr'(Et)T$ (I), $[Tr''(Et)Tr]_3Tr''(Et)T$ (II), представляющие собой индивидуальные диастереомеры с энантиомерными конфигурациями при атомах фосфора триэфирных фосфатных остатков, и полностью этилированный октатимидилат $[Tr(Et)]_7T$ (III) — смесь изомеров; диастереомеры моноэтиловых производных декатимидилатов, содержащих этильную группу по первому с 3'-конца межнуклеотидному фосфату $(Tr)_8Tr'(Et)T$ (IV) и $(Tr)_8Tr''(Et)T$ (V); ундекатимидилаты, этилированные по второй с 3'-конца межнуклеотидной фосфатной группе $(Tr)_8Tr'(Et)TrT$ (VI) и $(Tr)_8Tr''(Et)TrT$ (VII); полностью этилированный пентадекатимидилат $[Tr(Et)]_{14}T$ (VIII) и неэтилированные олиготимидилаты, содержащие от 1 до 15 мононуклеотидных звеньев.

Ранее нами [1] было показано, что олиготимидилаты (III) — (VII) служат субстратами, иницирующими рост цепи на матрице poly(A), катализируемый ДНК-полимеразой I из *E. coli* и кленовским фрагментом. Величины K_m и V для этих затравок в случае двух последних ферментов совпадали. В настоящей работе показано, что олигонуклеотиды (I), (II), и (VIII) также являются затравками для кленовского фрагмента. Все синтезированные олиготимидилаты (I) — (VIII) иницируют синтез poly(T) на матрице poly(A), катализируемый ДНК-полимеразой α из плаценты человека.

Следует отметить, что определение изменения величины K_m и V , коррелирующее с увеличением длины затравки на одно мономерное звено, представляется достаточно сложным. С одной стороны, как показано в работе [1], величина K_m для затравки уменьшается, а V возрастает при увеличении ее длины. С другой стороны, известно, что реакции удлинения затравок, катализируемые ДНК-полимеразой I из *E. coli* [6] и ДНК-полимеразой α из эукариот [7], имеют процессивный характер, т. е. не все молекулы затравки диссоциируют из комплекса с ферментом после увеличения их длины на одно мономерное звено. Так, при использовании в качестве затравки $(Tr)_9T$ и включения $[^3H]TMP$ в количестве 0,2 моль/моль этой затравки мы наблюдали образование не только $(Tr)_{10}T$ (основной продукт), но и олиготимидилатов с длиной цепи от 12 до 15 мономерных звеньев. Следовательно, определение начальной скорости реакции полимеризации в этом случае гарантирует точность оценки величин K_m и V , которые могли бы быть характерными для роста затравки строго определенной длины на одно мономерное звено. Чтобы уменьшить, насколько это возможно, нижнее значение величин K_m и увеличение V за счет увеличения длины затравки в ходе полимеризации выше расчетной, концентрации ферментов и длительности реакции подбирали так, чтобы включение мононуклеотида в растущую цепь (в последних точках кинетической кривой) не превышало 0,001—0,005 моль на 1 моль присутствующего в реакционной смеси субстрата.

Очевидно, что оценку сродства фермента к субстрату при помощи величины K_m можно проводить только в частных случаях и лишь приближенно. Однако, как нами было показано ранее [1], в указанных условиях определения величин K_m для олигоаденилатных затравок в случае ДНК-

Величины K_m и относительных максимальных скоростей V превращения затравок (иницирующих субстратов) для ДНК-полимеразы I из *E. coli* и ДНК-полимеразы α из плаценты человека

Олиготимидилат	ДНК-полимераза I из <i>E. coli</i> *		ДНК-полимераза α из плаценты человека	
	K_m , мкМ	V , %	K_m , мкМ	V , %
(Tr) ₇ T	1,1	100	0,65	100
[Tr'(Et)Tr] ₃ Tr'(Et)T (I)	7,3	0,6	2,1	2,7
[Tr''(Et)Tr] ₃ Tr''(Et)T (II)	7,0	0,4	2,5	3,3
[Tr(Et)] ₇ T (III)	7,2	0,2	2,4	1,8
(Tr) ₉ T	0,40	100	0,23	100
(Tr) ₈ Tr'(Et)T (IV)	2,7	14	1,2	15
(Tr) ₈ Tr''(Et)T (V)	2,5	2,6	1,3	8,3
(Tr) ₁₀ T	0,36	110	0,16	95
(Tr) ₈ Tr'(Et)TrT (VI)	0,38	68		
(Tr) ₈ Tr''(Et)TrT (VII)	0,51	24		
(Tr) ₁₁ T	0,13	100	0,091	100
[Tr(Et)] ₁₁ T (VIII)	0,50	2,4	0,47	1,2

* Величины K_m и V для олигонуклеотидов кроме (I), (II), (VIII) и (Tr)₁₁T взяты из работы [2].

Ошибка в определении приведенных величин не превышала 10—20%.

полимеразы α эти величины лишь в 2,5 раза превышают соответствующие им величины K_d . Относительное уменьшение величин K_m (как и K_d) для олигоаденилатных затравок в 1,8 раза при увеличении их длины на одно мононуклеотидное звено совпадает с таковым для олиготимидилатных затравок (см. ниже). Эти данные позволили нам с учетом указанного различия в величинах K_m и K_d приблизительно оценить средство ДНК-полимеразы α затравкам на основании величин K_m .

В экспериментах по определению K_m и V для затравок были использованы оптимальные концентрации $MnCl_2$, трис-HCl-буфера (с оптимальным pH 7,5) и близкие к насыщающим концентрации ТТР ($4K_m$) и poly(A) ($3K_m$). При более высоких концентрациях ТТР и матрицы наблюдалось ингибирование реакции полимеризации.

Величины K_m и V для всех этилированных и немодифицированных олигонуклеотидов той же длины приведены в табл. 1. Видно, что введение этильной группы по первому от 3'-конца межнуклеотидному фосфатному остатку в 5—7 раз уменьшает средство фермента к моноэтилированным декатимидилатам (IV) и (V) по сравнению с (Tr)₉T независимо от пространственной конфигурации (p' или p'') при атоме фосфора фосфатной группы. Из сравнения величин K_m для [Tr'(Et)Tr]₃Tr'(Et)T (I), [Tr''(Et)Tr]₃Tr''(Et)T (II) и [Tr(Et)]₇T (III) с таковой для (Tr)₇T, а K_m для [Tr(Et)]₁₁T (VIII) с величиной K_m для (Tr)₁₁T очевидно, что этилирование всех или четырех из семи межнуклеотидных фосфатных групп не приводит к большему изменению средства (3,9—6,4 раза для ДНК-полимеразы I и 3,2—5,2 раза для ДНК-полимеразы α) по сравнению с этилированием лишь одной, первой с 3'-конца межнуклеотидной фосфатной группы в случае декатимидилатов (IV) и (V) (уменьшение средства в этом случае 5,2—6,8 раза).

Принято считать, что величины K_d , а также величины K_m , если они близки к величинам K_d , характеризуют процесс образования нековалентного михаэлисова комплекса фермента с субстратами, а величины максимальной скорости превращения V — способность субстрата подвергаться ферментативному превращению, т. е. стадию катализа. Таким образом, следует полагать, что в случае обоих ферментов на стадии образования комплекса фермента с затравкой существенную роль играет отрицательный заряд только первой от 3'-конца межнуклеотидной фосфатной группы затравки (иницирующего субстрата). Это предположение подтверждается увеличением средства ундекатимидилатов (VI) и (VII) с одним

этилированным межнуклеотидным фосфатным остатком во втором положении от 3'-конца. Величины K_m для ундекатимидилатов (VI) и (VII) (ДНК-полимераза I, табл. 1) сравнимы с величинами K_m для немодифицированных $(Tr)_9T$ и $(Tr)_{10}T$.

Рассмотренные данные могут указывать на одинаковую роль межнуклеотидных фосфатов затравки при их связывании с ДНК-полимеразой из прокариот и эукариот и образование лишь одного электростатического контакта между ферментом и иницирующим субстратом.

Определенный интерес представляет анализ максимальных скоростей (V) превращения этилированных олиготимидилатов. Как видно из табл. 1, этилирование первого от 3'-конца межнуклеотидного фосфатного остатка приводит к заметному снижению величины V (в 7–38 раз для ДНК-полимеразы I; в 6,5–12 раз для ДНК-полимеразы α) для индивидуальных декатимидилатов (IV) и (V) по сравнению с $(Tr)_9T$. Для обоих ферментов характерно, что скорость превращения второго изомера снижается больше, чем первого изомера. Введение этильной группы в фосфатный остаток во втором положении от 3'-конца в случае ундекатимидилатов (VI) и (VII) при использовании ДНК-полимеразы I приводит к возрастанию V в 5 и 9 раз по сравнению с таковыми для соответствующих им моноэтилированных декатимидилатов (IV) и (V). Этилирование всех или четырех из семи межнуклеотидных фосфатных групп олиготимидилатов, как видно на примере серии октануклеотидов (I)–(III) и $(Tr)_7T$, приводит к большему изменению (уменьшению) величин V в случае ДНК-полимеразы I (166–500 раз), чем ДНК-полимеразы α (37–56 раз). Однако качественные картины изменения максимальных скоростей превращения затравок для обоих ферментов весьма близки.

Существенное возрастание величин V при перемещении этильной группы от первого ко второму от 3'-конца межнуклеотидному фосфату, а также отсутствие заметной разницы в скоростях превращения олиготимидилатов, в которых были этилированы все или половина межнуклеотидных фосфатных групп октатимидилатов, могут указывать на то, что на стадии каталитического превращения в отличие от стадии образования комплекса Михаэлиса важен не только первый, но и второй, а в определенной степени, возможно, и третий от 3'-конца межнуклеотидный фосфатный остаток затравки. В то же время очевидно, что блокирование второй и третьей от 3'-конца межнуклеотидных фосфатных групп затравок не приводит к исчезновению каких-либо контактов между ними и ферментом. Существенное уменьшение величины V для затравок (I)–(III) и (VIII), в которых этилированы все или половина межнуклеотидных фосфатных групп, возможно, связано с их различной способностью после образования тройных комплексов с ферментом и матрицей подвергаться дальнейшей конформационной перестройке до состояния, необходимого для протекания каталитического акта. Вероятно, эти олиготимидилаты (I)–(III) и (VIII) в отличие от немодифицированных и моноэтилированных затравок (VI)–(VII) не способны к оптимальной «подгонке» концевой 3'-ОН-группы до состояния, в котором она может выполнять роль акцептора.

Рассмотренные результаты указывают на явную зависимость эффективности образования фермент-субстратного комплекса и каталитического превращения затравок от наличия отрицательного заряда именно у первой от 3'-конца межнуклеотидной фосфатной группы, а не по всей длине затравки. Эти данные позволяют предположить, что функцию затравок могут выполнять короткие олигонуклеотиды вплоть до моно- и динуклеотидов.

В связи с этим мы сделали попытку определить величины K_m и V для олиготимидилатов различной длины при их росте на матрице poly(A) в реакции, катализируемой ДНК-полимеразой. В этих экспериментах определяли радиоактивную метку, включенную в кислотонерастворимый продукт (см. «Экспериментальную часть»). Было обнаружено, что минимальными затравками ДНК-полимеразы I и ДНК-полимеразы α является пектатимидилат $(pT)_5$. Однако при продолжительном проведении реакции

полимеризации с использованием в качестве затравок $(pT)_2$ или $(pT)_3$ мы также наблюдали небольшое включение метки в кислотонерастворимый продукт. В связи с этим предполагается, что пента- и гексатимидилаты являются теми минимальными олигонуклеотидами, которые могут осаждаться на бумажных фильтрах при обработке последних 5–10% раствором трихлоруксусной кислоты. Для проверки этого предположения количество метки, включенной в затравки различной длины, было найдено при помощи метода обращенно-фазовой хроматографии в условиях количественного разделения мононуклеотидов, с одной стороны, и олигонуклеотидов с длиной больше одного мономерного звена — с другой. Сравнение количества метки в продуктах синтеза, обнаруженной при помощи обращенно-фазовой хроматографии (это количество принимали за 100%) и в кислотонерастворимом осадке приведено на рис. 1. Видно, что эффективность осаждения продуктов превращения $(pT)_5$ на бумажных фильтрах, обработанных трихлоруксусной кислотой, не превышает 3% от реального количества метки, включенной в затравку. Таким образом, метод осаждения кислотонерастворимых продуктов, по-видимому, не позволяет достоверно определять метку при использовании затравок с длиной меньше пяти мономерных звеньев, если включение, как было указано выше, не превышает 5 ммоль мономера на 1 моль затравки.

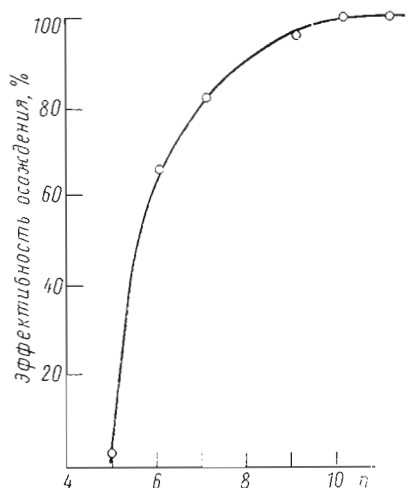


Рис. 1. Зависимость эффективности осаждения на фильтрах из бумаги FN-16, пропитанных 5% раствором трихлоруксусной кислоты, 3H -меченых продуктов реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразой α , от длины затравки. Условия см. «Экспер. часть»

Величины K_m и V для ряда $(pT)_5 - (Tp)_{14}T$, рассчитанные на основе получения кислотонерастворимых осадков с учетом эффективности сорбции продуктов их превращения, приведены в табл. 2. Величины K_m и V для $(pT)_5$, полученные этим способом и методом обращенно-фазовой хроматографии, не различались.

Методом обращенно-фазовой хроматографии было показано, что затравками для ДНК-полимеразы α могут служить TMP, TTP, $(pT)_2$ и $(pT)_3$. Кинетические кривые накопления 3H в продуктах превращения TMP и TTP приведены на рис. 2. Фермент не катализировал образование олигонуклеотидов при добавлении только $[^3H]TTP$ в отсутствие poly(A)-матрицы (рис. 2).

Зависимости начальных скоростей роста затравки от концентрации

Таблица 2

Величины K_m и относительных максимальных скоростей V превращения затравок (инициирующих субстратов) для ДНК-полимеразы α из плаценты человека *

Олиготимидилат	K_m , мкМ	V , %	Олиготимидилат	K_m , мкМ	V , %
TMP	48		$(Tp)_7T$	0,65	58
$(pT)_2$	23		$(Tp)_8T$	0,45	
$(pT)_3$	15		$(Tp)_9T$	0,23	100
$(pT)_5$	4,2	22	$(Tp)_{10}T$	0,16	95
$(pT)_6$	2,5	30	$(Tp)_{14}T$	0,091	54
$(pT)_7$	1,4	41			

* Ошибка в определении кинетических параметров не превышала $t_0-20\%$.

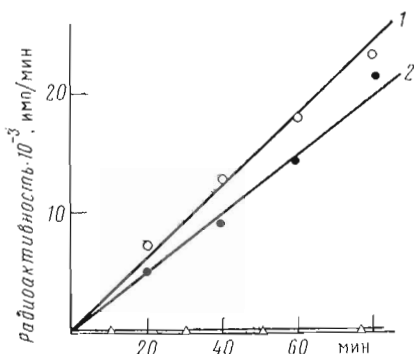


Рис. 2

Рис. 2. Кинетические кривые накопления ^3H -меченых продуктов реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразой α , на матрице poly(A) (33 мкМ) при использовании в качестве затравок: 46 мкМ ТТР (1) и 60 мкМ ТТР (2); 3 — система с 60 мкМ ТТР в отсутствие poly(A)

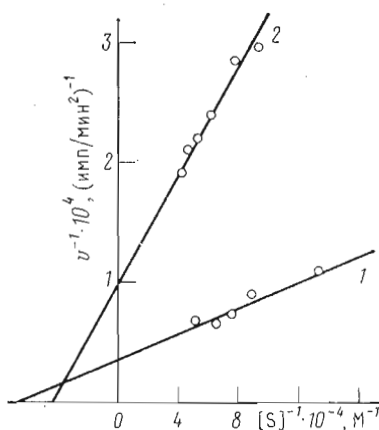


Рис. 3

Рис. 3. Зависимости начальных скоростей реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразой α , от концентрации $(pT)_3$ (1) и $(pT)_2$ (2), представленные в двойных обратных координатах

$(pT)_2$ и $(pT)_3$ представлены на рис. 3. Величины K_m для коротких затравок приведены в табл. 2.

Полулогарифмическая зависимость величин K_m и V от длины затравок (n) с n от 1 до 15 мононуклеотидных звеньев в случае ДНК-полимеразы α и величины K_m для затравок $(pT)_5-(Tp)_{14}T$ для ДНК-полимеразы I (некоторые величины взяты из работы [2]) приведены на рис. 4. Они имеют линейный характер с точкой перегиба при длине затравки, равной 10 и 9 мономерным звеньям для ДНК-полимеразы α и ДНК-полимеразы I соответственно. Зависимость $\lg V$ от n (длины затравки) в случае первого фермента также имеет точку перегиба при $n=10$. На основании этих данных предполагается, что характер взаимодействия затравки и матрицы за пределами белковых глобул ДНК-полимеразы изменяется при длине затравки в 9–10 звеньев и, как следствие, изменяется характер зависимостей K_m и V от длины затравки. По-видимому, в контакте с матрицей в пределах субъединицы ядра ДНК-полимеразы α и ДНК-полимеразы I находится 9–10 мономерных звеньев затравки.

Увеличение длины затравки на одно мономерное звено приводит к возрастанию его сродства к ДНК-полимеразе α (в пределах 1–10 звеньев) и к ДНК-полимеразе I (в пределах 5–9 звеньев) приблизительно в 1,8 раза. Для ДНК-полимеразы I величины K_m для затравок определенной длины несколько больше, чем для ДНК-полимеразы α , но их относительное изменение при $n=5-9$ практически совпадает с таковым для фермента из плаценты.

На основании величины K_m для ТТР, равной 45 мкМ, а также данных работы [8], где было показано, что величины K_m для затравок ДНК-полимеразы α человека превышают соответствующие им величины K_d приблизительно в 2,5 раза, изменение свободной энергии Гиббса образования комплекса фермента с ТТР в присутствии poly(A) можно оценить в пределах $\Delta G = -5,9-6,5$ ккал/моль. В то же время величины $-\lg K_m$ при увеличении длины затравки на одно мономерное звено изменяется на 0,255, что соответствует изменению свободной энергии Гиббса при образовании одной А·Т-пары на $\Delta G = -0,35$ ккал/моль. Следовательно, вклад первого от 3'-конца нуклеотида затравки в суммарное сродство фермента к затравке приблизительно на 3 порядка больше, чем каждого из остальных мономеров иницилирующего субстрата. ΔG при образовании комплекса фермента с первым от 3'-конца нуклеотидом приблизительно на $-5,6-6,2$ ккал/моль больше, чем с каждым из остальных нуклеотидов затравки.

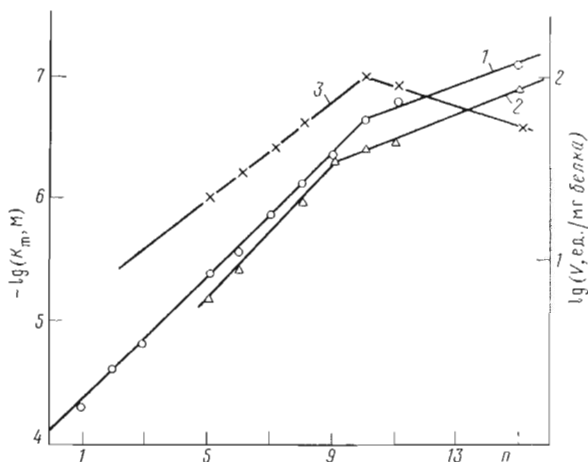


Рис. 4. Полулогарифмическая зависимость величин K_m (1 и 2) и V (3) от n — числа мононуклеотидных звеньев в олиготимидилатах для ДНК-полимеразы α из плаценты человека (1 и 3) и ДНК-полимеразы I из *E. coli* (2)

Изменение свободной энергии Гиббса ($\Delta G = -0,35$ ккал/моль) приблизительно на $-0,8-1,0$ ккал/моль меньше, чем аналогичная величина ($1,2-1,4$ ккал/моль [9]), характерная для образования водородных связей комплементарной пары $rA \cdot rU$ соответствующих гомополимерных цепей в растворе. Не исключено, что это изменение ΔG отражает некоторое ослабление уотсон-криковских взаимодействий между комплементарными цепями при их связывании с ДНК-полимеразой и (или) изменение конформации дуплекса цепей при связывании с ферментом.

Совокупность изложенных выше данных свидетельствует о том, что только первый от 3'-конца нуклеотид затравки образует дополнительные связи с ферментом. Остальные нуклеотидные звенья затравки взаимодействуют, вероятно, только с комплементарной цепью матрицы. В связи с этим определенный интерес представляет вопрос о том, какой тип возможных связей осуществляет взаимодействие между полимеразой и 3'-концевым нуклеотидом затравки.

Как следует из экспериментов с этилированными олиготимидилатами, первая от 3'-конца межнуклеотидная фосфатная группа затравки, возможно, взаимодействует с полимеразой электростатически. Поскольку сродство этилированных затравок почти в 5-7 раз меньше, чем соответствующих им неэтилированных затравок, величину ΔG такого взаимодействия можно оценить в пределах от $-1,1$ до $-1,2$ ккал/моль. Величина ΔG образования пары водородных связей T·A была оценена равной $-0,35$ ккал/моль. При экстраполяции зависимостей $\lg K_m$ от длины затравки (см. рис. 4) до пересечения с осью ординат ($n=0$) в случае ДНК-полимеразы α отсекается значение, которому соответствует величина K_m , равная 77 мкМ. Это значение K_m , возможно, следует отнести к затравке — дезоксирибозо-5'-фосфату, не имеющему в своем составе основания. ΔG образования комплекса фермента с дезоксирибозо-5'-фосфатом в присутствии $\text{poly}(A)$ (с учетом указанной выше поправки на различие в величинах K_m и K_d затравок) можно оценить равной $-5,6-6,2$ ккал/моль. Если вычесть из этого значения $\Delta G = -1,1 \div -1,2$ ккал/моль, соответствующее электростатическому взаимодействию, то получается величина $-4,5-5,1$ ккал/моль для образования других контактов между концевым фосфатным остатком TMP и ферментом. В связи с этим следует отметить данные работы [10], где показано, что образованию единственного Me^{2+} -зависимого электростатического контакта между межнуклеотидными фосфатными группами матрицы и ее участком связывания на ферменте соответствует изменение свободной энергии Гиббса на $-1,2 \div -1,4$ ккал/моль. Кроме этого электростатического взаимодействия атом кислорода $\text{P}=\text{O}$ -группы межнуклеотидной фосфатной группы образует водородную связь с

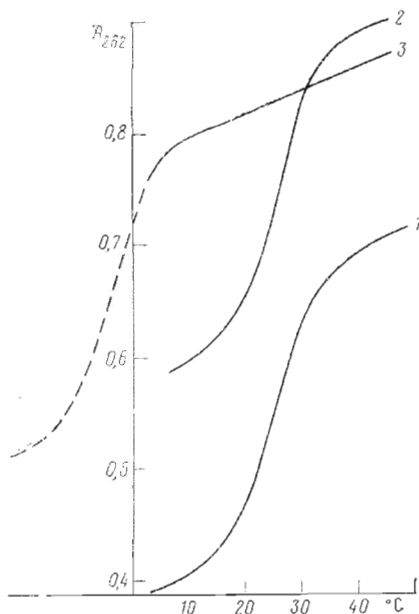


Рис. 5. Кривые плавления дуплексов poly(A) с $(\text{Tr})_7\text{T}$ (I), $[\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}'\cdot(\text{Et})\text{T}$ (2) и $[\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (3)

водородную связь. Не исключено также, что каждая из этих групп принимает участие во взаимодействии с полимеразой, но водородные связи при этом менее прочны и характеризуются изменением свободной энергии Гиббса (ΔG) порядка -2 ккал/моль.

Особого внимания заслуживают несколько фактов. Так, poly(A) не образует комплексов с ТМР в растворах при температуре выше 0°C . Температуры плавления дуплексов poly(A) с $(\text{Tr})_7\text{T}$, $[\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ (I) и $[\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (II) равны соответственно 25, 27 и $<0^\circ\text{C}$ (рис. 5). Близкие к приведенным значения температур плавления комплексов poly(A) с $(\text{Tr})_7\text{T}$ и фосфорилированными по 3'-ОН-группе аналогами соединений (I) и (II) были получены в работе [12]. Следовательно, ТМР и этилированный олигонуклеотид (II) не способны образовать дуплексы с poly(A) в растворе при 25–30°C. В то же время ТМР может служить затравкой для ДНК-полимеразы α , а величины K_m для октатимидилатов (I) и (II), определенные при 30°C как для ДНК-полимеразы I, так и для ДНК-полимеразы α , практически не различаются (табл. 1). Увеличение сродства фермента к затравкам при росте их длины до $n=9-10$ не противоречит важности образования дуплексов за счет комплементарных взаимодействий между цепями матрицы и затравки. Как указано в работе [10], олигонуклеотид $(\text{pT})_5$ связывается с ДНК-полимеразой α с такой же эффективностью, как и $(\text{pT})_8$, но с меньшей эффективностью, чем $(\text{pT})_{10}$. Это свидетельствует о том, что введение в цепь затравки некомплементарного матрице основания приводит к снижению ее сродства к ферменту.

Возможность связывания с полимеразой предсформированных дуплексов рассматриваемых цепей следует из того, что в качестве матрично-затравочных комплексов полимеразы использует как ДНК, так и комплексы poly(A) с $(\text{pT})_{8-15}$, температура плавления которых в растворе близка или выше 30°C . Из данных рентгеноструктурного анализа комплекса ДНК-полимеразы I с ДНК следует, что последняя в комплексе находится в В-форме [11]. Совокупность рассмотренных данных приводит к заключению, что в комплексе с ферментом цепи матрицы и затравки взаимодействуют с образованием уотсон-криковских пар. Очевидно, что если такие цепи не способны образовывать дуплексы в растворе, как, например, poly(A) с ТМР или олиготимидилатом (II), а poly(A) способен служить

ферментом с $\Delta G = -4,5$ ккал/моль [10]. Величину ΔG для дезоксирибозо-5'-фосфата в качестве затравки, равную $-4,5 \div -5,1$ ккал/моль, также можно было бы отнести за счет образования водородной связи между ферментом и Р=О-группой фосфатного остатка. Однако, согласно данным рентгеноструктурного анализа комплекса кленовского фрагмента с ТМР, 3'-ОН-группа последнего образует водородную связь с амидной группой Thr^{355} [11]. 5'-Фосфатный остаток ТМР удален на 25 Å от участка локализации 3'-конца затравки. Не исключено, что 3'-концевая фосфатная группа затравки образует водородную связь с ферментом не только в центре 3'-5'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы, но и в участке, предназначенном для проявления ферментом полимеризующей активности. В связи с этим можно предположить, что одна из рассмотренных групп (Р=О-фосфата или 3'-ОН-группа) образует с ферментом

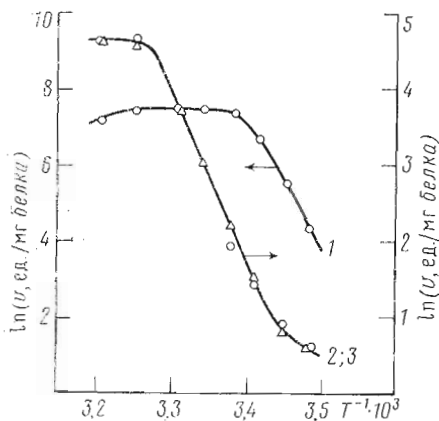


Рис. 6

Рис. 6. Представленные в координатах Аррениуса зависимости начальных скоростей реакции полимеризации на матрице poly(A), катализируемой ДНК-полимеразой α , при использовании различных затравок: $(\text{Tr})_7\text{T}$ (1), $[\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ (2) и $[\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (3)

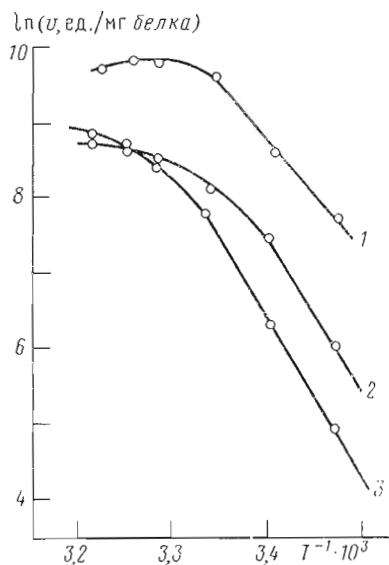


Рис. 7

Рис. 7. Представленные в координатах Аррениуса зависимости начальных скоростей реакции полимеризации на матрице poly(A), катализируемой ДНК-полимеразой I из *E. coli*, при использовании различных затравок: $(\text{Tr})_7\text{T}$ (1), $[\text{Tr}'(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}'(\text{Et})\text{T}$ (2) и $[\text{Tr}''(\text{Et})\text{Tr}]_3\text{Tr}''(\text{Et})\text{T}$ (3)

матрицей и последние два соединения — затравками, то каждый из них связывается с ферментом самостоятельно, а сближение их на ферменте обеспечивает, вероятно, образование комплементарных дуплексов. Этот вывод согласуется с данными работ Фиппера и Корна [13–15], которые кинетическими методами показали возможность последовательного связывания с ДНК-полимеразой из клеток линии KB однодепочечных матрицы и затравки: первой связывается с ферментом матрица, а затем затравка.

Эти данные не противоречат представлениям о существовании различных в дуплексах матрицы и затравки в растворе и после образования их комплексов с полимеразой. В связи с этим было исследовано влияние температуры на начальные скорости реакций роста затравок. Из рис. 6 и 7 видно, что для всех трех олиготимидилатов кривые в координатах Аррениуса имеют точку перегиба. Учитывая отсутствие заметной инактивации ДНК-полимераз в использованных условиях определения начальных скоростей, точку перегиба можно, по-видимому, отнести к плавлению дуплексов poly(A) с олиготимидилатами на ферменте. В случае ДНК-полимеразы не наблюдается заметного различия в кривых Аррениуса для различных изомеров (r' и r'') олиготимидилатов (I) и (II). Температура плавления этих дуплексов, если такая интерпретация верна, выше 25°C независимо от температуры плавления этих дуплексов в растворе (27°C и ниже). Выше 25°C лежат также точки перегиба на кривых Аррениуса в случае ДНК-полимеразы I и олиготимидилатов $(\text{Tr})_7\text{T}$, (I) и (II). Это может быть связано с тем, что определяющим фактором стабильности комплексов матрицы и затравки на полимеразе, по-видимому, являются не их комплементарные взаимодействия, а взаимодействия матрицы и затравки с ферментом. Так, при длине затравки, равной 8 мононуклеотидным звеньям, величина ΔG за счет образования уотсон-криковских водородных связей составляет приблизительно $-2,8$ ккал/моль [10]. В то же время ΔG образования комплекса фермента с матрицей $(\text{Tr})_{14}\text{T}$ за счет всех типов связей, кроме комплементарных взаимодействий с затравкой, существенно больше ($-10,5$ ккал/моль [10]). Изменение свободной энергии Гиббса при связывании с ферментом затравки $(\text{Tr})_7\text{T}$ за счет образования связей

между ферментом и первым от 3'-конца нуклеотидом $-5,2-6,5$ ккал/моль (см. выше).

Кажущиеся величины энергий активации реакции полимеризации были рассчитаны для линейных участков аррениусовых кривых (рис. 6 и 7). Они оказались равными 28,7; 40,2; 43,9 ккал/моль для ДНК-полимеразы I и 60,0; 39,2; 40,7 ккал/моль для ДНК-полимеразы α соответственно для $(Tr)_7T$, $[Tr'(Et)Tr]_3Tr'(Et)T$ и $[Tr''(Et)Tr]_3Tr''(Et)T$. Эти величины достаточно близки для этилированных олиготимидилатов для обоих полимераз и почти в 2 раза отличаются для $(Tr)_7T$.

Можно предложить также другое объяснение появлению точки перегиба на кривых в координатах Аррениуса, а именно резкий конформационный переход самого фермента при этой температуре; фермент в новом конформационном состоянии не утрачивает каталитическую активность, но скорость катализируемой реакции снижается и, что самое существенное, одновременно снижается температурный коэффициент реакции. Именно такой механизм лежит в основе появления точки перегиба на аррениусовых кривых для многих ферментов.

Сравнительное изучение ДНК-полимеразы α человека и ДНК-полимеразы I из *E. coli* свидетельствует о существовании общих закономерностей в связывании и превращении затравок этими ферментами. Оба фермента, возможно, электростатическим способом взаимодействуют с первой от 3'-конца межнуклеотидной фосфатной группой. Наблюдается одинаковое увеличение сродства фермента к затравкам (в 1,8 раза) при их удлинении на одно мономерное звено. Оба фермента, вероятно, стабилизируют комплексы матрицы и затравки и способны связывать в дуплексы элементарные цепи, которые в растворе не взаимодействуют. Для обоих полимераз характерны близкие значения кажущихся величин энергии активации реакции полимеризации при использовании этилированных октатимидилатов в качестве затравок. На линейных зависимостях $\lg K_{1/2}$ от длины затравки наблюдается точка перегиба при близких значениях числа мононуклеотидных звеньев в $n=9-10$. Делается общий вывод, что механизм связывания и удлинения затравок ДНК-полимеразами из прокариот и эукариот если и отличается, то несущественно.

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты ДНК-полимеразы I из *E. coli* штамма MRE-600 производства НИС НГУ и ИЦиГ СО АН СССР с уд. акт. $6 \cdot 10^4$ ед./мг белка [4]. Фермент был свободен от экзо- и эндонуклеаз и содержал, судя по данным электрофореза в ПААГ, менее 5% посторонних белков [1].

Препарат кленовского фрагмента был любезно предоставлен С. В. Мамаевым (НИБХ СО АН СССР). Фермент был выделен из суперпродукционного, полученного генно-инженерным способом штамма *E. coli* и не содержал 5':3'-экзонуклеазной активности, характерной для ДНК-полимеразы I, а также примесей других нуклеаз. Удельная активность фермента $3 \cdot 10^3$ ед./мг белка.

Препараты ДНК-полимеразы α из плаценты человека получали по методу [8]. Фермент был очищен в 1400 раз и не содержал других, характерных для эукариот полимеризующих ферментов. Удельная активность этой ДНК-полимеразы 610 ед./мг белка. Содержание белка ДНК-полимеразы α в общем белке препарата оценено $\sim 1-3\%$ [8]. Во всех случаях за единицу полимеразной активности принимали количество фермента, которое катализировало включение 1 моль NMP в кислото-нерастворимый продукт за 1 ч при 37° С.

В качестве матрично-затравочного комплекса использовали активированную ДНК. Активацию последней проводили при помощи панкреатической ДНКазы I [16].

В работе использовали ДНК из спермы лосося, ТТР, АТР, СТР, ГТР (НИКТИ БАН, г. Бердск), натриевую соль poly(A) (Boehringer, ФРГ), бычий сывороточный альбумин (Koch-Light, Англия), $MgCl_2$, $MnCl_2$ (Merck, ФРГ), 2-меркаптоэтанол (Loba-Chemie, Австрия), $[^3H]TTP$ с уд. акт. 895 ТБк/моль («Изотоп», СССР), остальные реактивы квалификации ос. ч. или специально очищенные отечественного производства.

Препарат $(pT)_2$ любезно предоставлен В. Н. Буневой (НИБХ, Новосибирск). Синтез, доказательство структуры и методы определения коэффициентов молярного поглощения всех использованных в работе соединений, кроме октатимидилатов (I) и (II), описаны в работах [1, 8].

Все использованные в работе олиготимидилаты были гомогенными, судя по данным микроколоночных ионообменной и обращенно-фазовой хроматографий, проведенных при помощи хроматографа «Милхром» согласно методикам, описанным в работе [1].

Для синтеза $[\text{Tp}'(\text{Et})\text{Tp}]_3\text{Tp}'(\text{Et})\text{T}$ (I) и $[\text{Tp}''(\text{Et})\text{Tp}]_3\text{Tp}''(\text{Et})\text{T}$ (II) использовали исходные олиготимидилаты $[\text{Tp}'(\text{Et})\text{Tp}]_4$ и $[\text{Tp}''(\text{Et})\text{Tp}]_4$. Синтез и характеристики двух последних олигонуклеотидов описаны в работе [12]. Отщепление концевой фосфатной остатка изомеров октатимидилатов $[\text{Tp}(\text{Et})\text{Tp}]_4$ проводили при помощи щелочной фосфатазы. Реакционная смесь объемом 1 мл содержала: 5 OE_{260} одного из 3'-фосфорилированных диастереомеров, 10 мМ трис-НСI-буфер (рН 8,0) и 3 ед. акт. щелочной фосфатазы (Worthington, США). Через 2 ч инкубации при 30° С смесь наносили на колонку (2×60 мм) со смолой аминосилохром АС_{III}-300 (ИЦиГ СО АН СССР, Новосибирск). Целевой продукт элюировали при помощи линейного градиента концентрации $\text{K}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (рН 6,5) от 0 до 0,05 М. Элюирующая концентрация $\text{K}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 0,015 М. Дополнительную очистку октатимидилатов (I) и (II) проводили при помощи обращенно-фазовой хроматографии на сорбенте Lichrosorb PR-18; элюцию проводили градиентом концентрации метанола от 0 до 70% в 0,02 М трис-ацетатном буфере (рН 7,8). Размер колонки 2×60 мм, скорость элюции 0,05–0,1 мл/мин. Элюирующая концентрация метилового спирта 50%. Выход олигонуклеотидов (I) и (II) составлял 50–60% (судя по поглощению при 266 нм).

Кинетические параметры реакции, катализируемой ДНК-полимеразой I из *E. coli*, определяли согласно работе [1], в которой было показано, что величины K_m и V для олиготимидилатов и их этилированных аналогов на матрице poly(A) не различаются для полного фермента ДНК-полимеразы I из *E. coli* и для клеювского фрагмента. Кинетические параметры реакции, катализируемой ДНК-полимеразой α , определяли в условиях, оптимальных для poly(A)-oligo(T) матрично-затравочного комплекса. Реакционная смесь объемом 50–100 мкл содержала 50 мМ трис-НСI-буфер (рН 7,5), 2,3 мМ MnCl_2 , 10 мкМ EDTA, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, бычий сывороточный альбумин (0,5 мг/мл), 35 мкМ (в расчете на мононуклеотид) poly(A), а также 15–20 мкМ [^3H]TTP с удельной радиоактивностью 100–600 ТБк/моль. Концентрацию затравок варьировали в широком диапазоне (от 0,001 до 10 мкМ) в зависимости от сродства фермента к олиготимидилатам. Реакцию начинали добавлением 0,1–2 ед. акт. ДНК-полимеразы α . Все измерения кинетических параметров для олиготимидилатов от $(\text{pT})_5$ до $(\text{Tp})_{10}\text{T}$ и всех этилированных олигонуклеотидов проводили при 30° С.

В случае фермента из *E. coli* и плаценты человека в процессе инкубации смесей отбирали аликвоты (по 10–20 мкл) через интервалы времени от 0,5 до 20 мин (в зависимости от V для затравки). Количество вносимого фермента и интервалы отбора проб подбирали так, чтобы включение [^3H]TMP не превышало в конце кинетического опыта 0,001–0,005 моль нуклеотида на 1 моль олиготимидилата, присутствующего в реакционной смеси. При этом все измерения активности полимеразы проводили на линейных участках зависимостей накопления продуктов от времени (т.е. по начальным скоростям) и от концентрации белков с использованием poly(A) и TTP в концентрациях, близких к насыщающим (величины $K_m=10$ мкМ для poly(A) и 3,7 мкМ для TTP). Аликвоты смесей наносили на фильтры (диаметром 2 см) из бумаги FN-16, пропитанные 5% раствором трихлоруксусной кислоты, содержащей 10 мМ пиррофосфат натрия. Фильтры промывали 6 раз при 0° С 5% раствором CCl_3COOH , также содержащей 10 мМ пиррофосфат натрия. Затем их отмывали от кислоты в холодном ацетоне, высушивали и определяли их радиоактивность на счетчике Mark-III (Nuclear Chicago, США).

Эффективность осаждения олиготимидилатов различной длины трихлоруксусной кислотой на фильтрах из бумаги FN-16 определяли следующим образом. Реакционная смесь объемом 0,1 мл содержала стандартные компоненты, а также $(\text{pT})_5$ – $(\text{Tp})_{10}\text{T}$ в концентрации 50–100% от величины K_m для этих олигонуклеотидов. После инкубации реакционных смесей в течение 2–10 мин из смеси отбирали четыре аликвоты по 20 мкл. Две из них наносили на фильтры из бумаги FN-16 и подвергали стандартной обработке, как описано выше. Две другие аликвоты добав-

ляли в пробирки, содержащие по 20 мкл 50 мМ EDTA для остановки реакции полимеризации. Полученные растворы наносили на колонку (2×60 мм) со смолой Lichrosorb RP-18 и промывали с использованием ступенчатого градиента концентраций метанола: 0,5 мл 0,02 М трис-ацетатного буфера (рН 7,8); 0,4 мл этого же буфера, содержащего 2% метанола, и 0,4 мл буфера, содержащего 70% метанола. Элюат, полученный при использовании буфера, содержащего 70% метанола, собирали на фильтры из бумаги FN-16. Количество метки в обоих рассмотренных выше случаях определяли в толуольном скинтиляторе, как описано выше. Эффективность осаждения олигонуклеотидов кислотой рассчитывали, принимая количество метки, найденной при помощи метода обращенно-фазовой хроматографии, за 100%.

В модельных экспериментах было показано, что моно-, ди- и трифосфаты мононуклеотидов элюируются со смолы двумя первыми растворами. Олигонуклеотиды, начиная с динуклеотидов, элюируются только буфером, содержащим не менее 10% метанола. При промывании колонки буфером, содержащим 70% метанола, со смолы элюировались не только олиготимидилаты, но также poly(A) и другие высокомолекулярные компоненты реакционной смеси.

Определение кинетических параметров реакции при использовании в качестве затравки коротких олиготимидилатов (с числом мононуклеотидных звеньев от 1 до 5 или же ТТР) проводили при 25° С. Реакционные смеси содержали стандартные компоненты, как описано выше для ДНК-полимеразы α . Реакцию полимеризации останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 25 мкМ. Количество включенной метки определяли методом обращенно-фазовой хроматографии, как описано выше.

Величины K_m и V превращения олиготимидилатов рассчитывали графическими методами: использовали зависимости скоростей реакции полимеризации от концентрации затравок в координатах $[S]/v$ от $[S]$; $1/v$ от $1/[S]$ и прямого линейного графика Эйзенталя и Корнш-Боуден, описанных в работе [17]. Ошибка в определении констант не превышала 20%. При определении концентрации олиготимидилатов использовали коэффициенты молярного поглощения олиготимидилатов, приведенные в работах [1, 8].

Температуры плавления комплексов poly(A) с октатимидилатами определяли в условиях, идентичных использованным для определения полимеризующей активности ДНК-полимеразы I из *E. coli*: 50 мМ Перес-NaOH-буфер (рН 8,0), содержащий 10 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 10 мкМ EDTA. Концентрации poly(A) и олиготимидилатов (Tr)₇T, (I) и (II) равны 66 мкМ (в расчете на мононуклеотид). Плавление определяли в специально сконструированной термостатируемой кювете объемом 2 мкл с использованием оптической системы хроматографа «Обь-4», согласно работе [18].

Исследование зависимостей начальных скоростей реакции полимеризации от температуры для олиготимидилатов (Tr)₇T, (I) и (II) проводили стандартным образом, как описано выше. Температуру реакционных смесей варьировали в диапазоне от 14 до 38° С. Энергию активации реакции рассчитывали по формуле

$$\ln \frac{v_1}{v_2} = \frac{E_a (T_2 - T_1)}{RT_1 T_2},$$

где v_1 и v_2 — начальные скорости реакции полимеризации при температурах T_1 и T_2 соответственно; R — универсальная газовая постоянная.

Авторы глубоко признательны В. Н. Буновой за препарат (pT)₂, Е. М. Ивановой за препарат (Tr)₁₄T, В. В. Горну за препарат (Tr)₉T, Т. В. Абрамовой за препараты [Tr(Et)Tr]₄, О. И. Лаврик и В. Ф. Зарытовой за полезные обсуждения, постоянный интерес и поддержку работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Левина А. С., Невинский Г. А., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 3, с. 358–369.
2. Rappoport E., Zamesnik P. C., Baril E. F. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 23, p. 12148–12151.
3. Zamesnik P. C., Rappoport E., Baril E. F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., 1982, v. 79, № 6, p. 1791–1794.
4. Sawani Y., Kitahara N., Isukada K. FEBS Lett., 1982, v. 150, № 1, p. 228–232.
5. Fisher P. A., Korn D. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 20, p. 11040–11048.
6. McClure W. R., Chow Y. Meth. Enzymol., 1980, v. 64, p. 277–292.
7. Hockensmith J. W., Barbara P. A. Biochemistry, 1981, v. 20, № 1, p. 227–232.
8. Невинский Г. А., Подуст В. Н., Левина А. С., Халабудда О. В., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 3, с. 357–368.
9. Долгинная Н. Г., Громова Е. С. Успехи химии, 1983, т. 52, № 1, с. 138–167.
10. Невинский Г. А., Левина А. С., Подуст В. Н., Лаврик О. И. Биоорган. химия, 1987, т. 13, № 1, с. 58–68.
11. Ollis D. L., Brick P., Halmin R., Xuong N. G., Steitz T. A. Nature, 1985, v. 313, № 6005, p. 762–766.
12. Абрамова Т. В., Воробьев Ю. И., Лебедев А. В. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 10, с. 1335–1347.
13. Fisher P. A., Korn D. Biochemistry, 1981, v. 20, № 16, p. 4560–4569.
14. Fisher P. A., Korn D. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 21, p. 11033–11039.
15. Fisher P. A., Wang T. S. F., Korn D. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 13, p. 6128–6135.
16. Noy G. P., Weissbach A. Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 477, № 2, p. 70–83.
17. Корниш-Боуден Э. В. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1978, с. 260–266.
18. Grachev M. A., Perelroyzen M. P. Nucl. Acids Res., 1978, v. 5, № 7, p. 2557–2564.

Поступила в редакцию

13.III.1985

После доработки

3.III.1986

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

NEVINSKY G. A., FROLOVA E. I., LEVINA A. S., PODUST V. N.,
LEBEDEV A. V.

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

The mechanism of binding and elongation of the oligothymidylate primers in the systems of the DNA polymerase α from human placenta and DNA polymerase I from *E. coli* with the poly(dA) as a template was investigated. Both dTMP and dTTP were shown to be the minimal primers of DNA polymerase α , the affinity and V increasing 1,8- and 1,4-fold respectively upon lengthening the primer by each unit from dTMP to d(Tp)₉T. Further elongation is accompanied by 1,3-fold affinity enhancement and a decrease in V . For the *E. coli* enzyme, a similar dependence of affinity of primer d(Tp)₄T–d(Tp)₁₄T was observed with the inflexion point corresponding to d(Tp)₈T.

The individual diastereomers of oligothymidylate ethyl esters (with p' and p'' corresponding to enantiomeric configuration) such as d[Tp'(Et)Tp]₃Tp'(Et)T, d[Tp''(Et)Tp]₃Tp''(Et)T, d(Tp)₈Tp'(Et)T, d(Tp)₈Tp''(Et)T, d(Tp)₈Tp'(Et)TpT, d(Tp)₈·Tp''(Et)TpT and completely esterified analogues d[Tp(Et)]₇T, d[Tp(Et)]₁₄T were shown to initiate the poly(dA)-dependent polymerization catalyzed by both enzymes.

A sum of the obtained results provided the basis for a number of conjectures on the mode of primer and template binding to the enzyme, possible role of their preformed complex, as well as electrostatic interactions and hydrogen bonding.