

Химические подходы к изучению матричного биосинтеза: исследование репликации и обратной транскрипции

Д.Г.Кнорре, Н.В.Кудряшова, О.И.Лаврик

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения

Российской академии наук

630090 Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8, факс (383) 235–1665

Рассмотрены химические подходы к изучению матричного биосинтеза ДНК с помощью ДНК-полимераз и обратных транскриптаз, в основном ДНК-полимеразы I из *E. coli* и обратной транскриптазы вируса ВИЧ-1. Особое внимание уделено сопоставлению данных химической модификации и рентгеноструктурного анализа, а также количественным аспектам взаимодействия матриц, праймеров и нуклеозид-5'-трифосфатов с ДНК-полимеразой. Описаны новые варианты метода каталитически компетентного мечения, разработанные в ходе исследования этих ферментов. Приведены данные, полученные при изучении репликативных комплексов с использованием аналогов праймеров, содержащих фотоактивные группы.

Библиография — 98 ссылок.

Оглавление

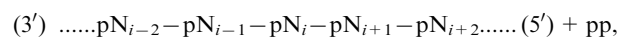
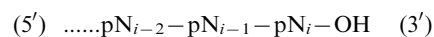
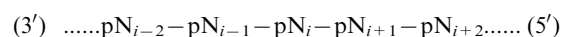
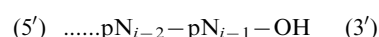
I. Введение	486
II. Основные типы аффинных реагентов, используемые для исследования репликации и обратной транскрипции	487
III. Исследование взаимодействия ДНК-полимераз с матрицами, праймерами и нуклеозид-5'-трифосфатами методом группоспецифичной и аффинной химической модификации. Структурные аспекты	490
IV. Каталитически компетентное мечение ДНК-полимераз	495
V. Исследование взаимодействия ДНК-полимераз с матрицами, праймерами и нуклеозид-5'-трифосфатами методом аффинной химической модификации. Количественные аспекты	496
VI. Химические методы исследования репликативных комплексов	499
VII. Заключение	500

I. Введение

Общие вопросы, связанные с использованием химических подходов к изучению механизма матричного биосинтеза нуклеиновых кислот, и основные результаты, полученные с помощью химических методов при изучении ферментов, катализирующих биосинтез РНК (транскрипцию), рассмотрены в обзоре¹. Настоящий обзор посвящен применению химических методов для изучения биосинтеза ДНК — репликации и обратной транскрипции.²

Основное химическое событие — удлинение полинуклеотидной цепи — в случае ДНК-полимераз происходит точно так же как в случае РНК-полимераз, рассмотренных в обзоре¹. Нуклеозидтрифосфат $pppN_i$, комплементарный считываемому элементу pN_i матрицы, роль которой играет одностебчатая ДНК, фосфорилирует 3'-ОН-группу 3'-концевого нуклеотидного остатка растущей цепи ДНК. Таким образом происходит перенос нуклеотидного остатка от

трифосфата на 3'-ОН-группу растущей полимерной цепи, так что фермент представляет собой нуклеотидилтрансферазу.



p — остаток ортофосфата; N_i и $\underline{N}_i$ — остатки нуклеозида соответственно в продукте и матрице; i — номер остатка в полинуклеотидной цепи, считая соответственно от 5'-конца продукта и 3'-конца матрицы.

Однако на этом сходство ДНК-полимераз с РНК-полимеразой практически заканчивается. РНК-полимеразы имеют дело с двунитевыми ДНК, которые временно расплетаются с участием самого фермента, образуя непротяженный расплетенный участок (вздутие). Одна из нитей расплетенного участка (транскрибируемая) ответственна за отбор субстрата в активном центре. В случае процесса репликации с помощью ДНК-зависимых ДНК-полимераз двунитевая ДНК предварительно расплетается с помощью специальной системы, о которой будет сказано ниже. ДНК-полимераза в отличие от РНК-полимераз непосредственного участия в расплетании ДНК не принимает.

Д.Г. Кнорре. Академик, заведующий лабораторией исследования модификации биополимеров НИБХ СО РАН.
Телефон: (383) 235–6441

Н.В. Кудряшова. Научный сотрудник той же лаборатории.

О.И. Лаврик. Доктор химических наук, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов того же института.

Область научных интересов авторов: матричный биосинтез, аффинная модификация и энзимология.

Дата поступления 26 сентября 1997 г.

Транскрипция начинается на определенном участке матрицы и требует предварительного связывания фермента в области начала транскрипции (промоторной области). После образования на нужном участке транскрибируемой ДНК комплекса с ферментом и специальными факторами транскрипции происходит инициация процесса, т.е. образование динуклеотида. Отметим, что первый из остатков динуклеотида сохраняет трифосфатную группу. Инициация синтеза ДНК в живых организмах во всех исследованных случаях начинается с синтеза рибоолигонуклеотидного праймера, 3'-концевая ОН-группа которого служит акцептором 5'-фосфата дезоксирибонуклеотидного остатка. Только после этого начинается синтез новой цепи ДНК. Функцию праймера при этом выполняет 3'-концевой дезоксирибонуклеотидный фрагмент. Для образования рибоолигонуклеотидного праймера у прокариот и эукариот существует специальный фермент, праймаза, так что первичным продуктом репликации является гибридный олигонуклеотид, содержащий на 5'-конце рибоолигонуклеотид.

В узле, в котором непосредственно происходит химическое превращение, присутствуют комплекс 3'-концевого нуклеотида праймера с комплементарным нуклеотидом матрицы, выступающий одонитевой фрагмент матрицы и отобранный субстрат. При этом безразлично, идет ли речь о введенном извне праймере или о конце вновь синтезированной нити.

В случае РНК-полимераз продуктом является одонитевая РНК, связанная комплементарными взаимодействиями с транскрибируемой нитью матрицы лишь на 3'-конце. В случае ДНК-полимераз продуктом является дуплекс, который в биологических системах сохраняется до начала следующего цикла репликации. В связи с этим спектр задач, решаемых химическими методами, для ДНК-полимераз отличается от описанного в обзоре¹ для РНК-полимераз. Следует также отметить, что на сегодняшний день для ДНК-полимераз имеется больше данных РСА о пространственной структуре фермента и его комплексов с матрицей и субстратами. В связи с этим результаты химической, в том числе аффинной модификации ДНК-полимераз, целесообразно рассматривать одновременно с ними. Многие из сказанного относятся и к ферментам, осуществляющим обратную транскрипцию, т.е. к РНК-зависимым ДНК-полимеразам (обратным транскриптазам).

Рассматривая ДНК-полимеразы, следует отметить, что существует две группы этих ферментов, отличающихся по своим биологическим функциям. Одна из них ответственна за создание новых молекул ДНК, которое происходит путем разделения нитей родительской ДНК и построения комплементарной дочерней копии на каждой из разделенных нитей. Это с точностью до неизбежных ошибок создает две двунитевые структуры, идентичные исходной. Однако процесс требует нескольких дополнительных ферментов и белков. Разворачивание двойной спирали происходит с участием ферментов, называемых геликазами. Они работают в области разветвления исходной двойной спирали (в вилке репликации). Для предотвращения обратного объединения обеих нитей они связываются со специальным белком, чаще всего называемым белком SSB (single strand binding). На одной из нитей, имеющей направление 5' → 3' от вилки репликации, происходит непрерывный синтез комплементарной цепи, формирующейся в сторону вилки репликации. Эту нить обычно называют ведущей нитью. На второй нити синтез может идти только в сторону от вилки репликации, и по мере освобождения матрицы через определенные интервалы должно происходить новое иницирование, т.е. синтез нового РНК-праймера, который далее удлиняется в сторону от вилки репликации. Таким образом, на этой запаздывающей нити продуктами синтеза являются фрагменты дочерней нити с рибоолигонуклеотидом на 5'-конце (фрагменты Оказаки). На участке праймера образуется гибридный

ДНК–РНК дуплекс. Его РНК-фрагмент должен быть удален из конечного продукта репликации. Это достигается, по крайней мере частично, с помощью специального фермента — РНКазы Н, которая катализирует гидролиз рибоолигонуклеотидов в составе такого гибридного дуплекса. После этого предшествующий фрагмент Оказаки может быть удлинен ДНК-полимеразой до достижения 5'-конца предыдущей цепи. Однако в результате этого дочерняя запаздывающая нить получается с разрывами (никами). Для соединения 5'-фосфата с 3'-ОН-группой предыдущего фрагмента необходим еще один фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между этими группами. Этим ферментом является ДНК-лигаза. Таким образом, минимальный набор ферментов и вспомогательных белков при репликации состоит из собственно ДНК-полимеразы, геликаз, SSB-белка, РНКазы Н и ДНК-лигазы.

Фактически этот набор еще больше. Важной характеристикой процесса репликации является его процессивность. После стадии элонгации система матрица–удлиненный праймер от фермента не отделяется. Вместо этого происходит перемещение нового программирующего элемента матрицы и 3'-конца удлиненного праймера относительно фермента таким образом, что они оказываются в активном центре фермента. В последнее время накопилось много данных о том, что процессивность обеспечивается специальными вспомогательными белками, которые упрочняют комплекс фермента с дуплексом матрица–праймер. Их называют зажимами (clamps).³

Вторая группа ДНК-полимераз неспособна вести синтез полных дочерних копий, но необходима для застраивания коротких брешей, которые часто возникают на одной из нитей ДНК. Классическим примером образования таких брешей является вырезание поврежденных участков одной из нитей ДНК, которое осуществляется специальными ферментами, играющими важную роль в исправлении повреждений (репарации ДНК). Поэтому ДНК-полимеразы этой группы часто рассматривают как репарирующие, хотя скорее всего их функции этим не ограничиваются. К числу наиболее изученных ферментов этой группы относятся ДНК-полимераза I *E. coli* и ДНК-полимераза β человека. Именно для этих двух ферментов с помощью РСА получены данные об их пространственной структуре.

II. Основные типы аффинных реагентов, используемые для исследования репликации и обратной транскрипции

Применение метода аффинной модификации к исследованию ферментов наиболее эффективно в двух случаях. Во-первых, для определения положения точки или нескольких точек модификации фермента реакционноспособным аналогом субстрата или эффектора, которое указывает субединицу или область белка, взаимодействующую с субстратом или эффектором. Во-вторых, для определения родства субстрата или кофактора к белку из данных по конкуренции реагента и субстрата или кофактора.⁴ Второй случай будет детально рассмотрен в разделе V.

ДНК-полимеразы и обратные транскриптазы взаимодействуют с матрицей, праймером и дезоксинуклеозид-5'-трифосфатом (далее dNTP). В случае ДНК-полимераз нити двуцепочечной ДНК предварительно расплетаются с помощью геликаз. Таким образом, матрицей при репликации является одноцепочечная ДНК. Поэтому есть все основания полагать, что реакционноспособные производные ДНК осуществляют модификацию по участку связывания матрицы.

В двуцепочечных структурах одна из нитей соответствует матрице, а другая — праймеру. Если комплекс двух фрагментов ДНК имеет как двуцепочечную, так и свисающую одноцепочечную часть, и на стыке двух частей более короткий фрагмент имеет свободную 3'-ОН-группу, то именно

этот фрагмент выполняет функцию праймера. В качестве примера, который понадобится для дальнейшего рассмотрения, можно привести комплекс **1**.



1

Очевидно, что в этом комплексе именно верхняя нить выполняет функцию праймера. Не столь однозначно обстоит дело с аналогами dNTP. Даже в рамках довольно упрощенной схемы, предполагающей, что имеются достаточно четко разделенные сайты связывания матрицы, 3'-концевого фрагмента праймера и dNTP, ясно, что исследуемый аналог dNTP не обязательно образует комплекс с участком связывания субстрата. Как будет показано в разделе V, сродством к участку связывания матрицы обладают также дезоксинуклеозид-5'-монофосфат (dNMP) и дезоксинуклеозид-5'-дифосфат (dNDP). В итоге модификация фермента таким аналогом не позволяет однозначно отнести модифицированный участок белка к сайту связывания dNTP, так как это может быть и сайт связывания матрицы.

Введение реакционноспособных групп в dNTP может быть легко проведено по γ -фосфату⁵ через промежуточное образование нуклеозид-5'-триметафосфата. Таким образом были получены производные, имеющие в своем составе остаток 4-(*N*-2-хлорэтил-*N*-метиламино)бензиламина,^{6,7} имидазола^{8,9} и *n*-азидоанилина.¹⁰ В случае алкилирующего и фосфорилирующего производных инактивация наблюдалась только в присутствии комплекса матрица–праймер. Этот факт можно рассматривать как свидетельство того, что аналог связывается в сайте размещения субстрата.^{6–9} В случае фотоаффинного реагента — производного *n*-азидоанилина — инактивация при облучении наблюдалась и в отсутствие этого комплекса, но в его присутствии она усиливалась.¹⁰ В последние годы синтезирован широкий набор аналогов dNTP, имеющих фотоактивную группу в гетероциклическом основании. Так, описаны и испытаны производные, содержащие фотоактивную группу в положении 4 цитозина, в положении 5 урацила (аналоги dTTP), а также в положениях 2 и 8 аденина.^{11–20} В табл. 1 приведены описанные на сегодняшний день dNTP, содержащие реакционноспособные группы в гетероциклическом основании. Важно, что некоторые из этих соединений способны выступать в качестве субстратов ДНК-полимеразы. Эти свойства позволяют использовать субстратную активность аналогов для специфичной фотоаффинной модификации ДНК-полимераз.

Фотоактивные аналоги должны обладать хорошими фотохимическими характеристиками, позволяющими проводить облучение при длинах волн, не вызывающих фотоинактивации белков и нуклеиновых кислот.¹¹ Наряду с этим они обладают хорошими субстратными свойствами в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразой α из плаценты человека,²¹ обратной транскриптазой вируса иммунодефицита человека,^{13–16} ДНК-полимеразой β .¹² Такие субстраты могут выступать в роли терминаторов, т.е. не допускать после их включения в 3'-конец праймера дальнейшей его элонгации. В других случаях наличие модифицированного остатка на 3'-конце не препятствует присоединению следующего звена, т.е. дальнейшему росту цепи. С такими производными возможно проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР), приводящей к получению дуплекса с большим числом реакционноспособных групп.²² Соответствующие характеристики реакционноспособных производных dNTP приведены в табл. 1.

Несмотря на кажущееся сходство аналогов с одинаковым положением введенной группы, их свойства как аффинных реагентов нередко достаточно резко различаются. Так, описаны¹⁹ три аналога dATP, содержащих в положении 2 адени-

на группы 4- $\text{N}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{S}$, 4- $\text{N}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SS}$ и 2- NO_2 -4- $\text{N}_3\text{C}_6\text{H}_3\text{S}$. Оказалось, что только первый из приведенных реагентов при облучении инактивирует фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (см. раздел III.1). Следует отметить, что инактивация не требует присутствия дуплекса матрица–праймер. Модификация достигает насыщения при включении в фермент одного остатка. Хотя модифицирующий реагент создан на основе dATP, конкурентным субстратом по отношению к нему является dTTP. Более того, модификацию ингибирует присутствие дуплекса поли(dA)–олиго(dT)₁₀. Это может свидетельствовать о взаимодействии аналога с участком связывания матрицы.¹⁸

Из нуклеотидных аналогов, содержащих реакционноспособную группу в углеводном фрагменте, исследован 2',3'-ангидроАТР. В присутствии дуплекса **1** наблюдалась инактивация фермента в соответствии с классическим законом аффинной модификации⁴ с величиной $K_d = 21 \text{ мкМ}$ и константой скорости инактивации 0.021 с^{-1} . Одновременно с инактивацией происходило включение остатка 2',3'-ангидроАТР в праймер. При этом включившийся остаток, естественно, играл роль терминатора. По данным авторов²⁵, образовавшийся дуплекс с таким остатком на конце не модифицирует фермент; его ингибирующее действие связано с повышенной прочностью тройного комплекса с ферментом.

Производные ДНК, используемые для исследования модификации ДНК-связывающего участка фермента, в отдельных случаях могут быть получены прямым введением реакционноспособной группы в молекулу ДНК или ее фрагмент. Например, в качестве аффинных реагентов матричного участка ДНК-полимеразы α из плаценты человека и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I был использован декануклеотид d(pT)₂pC(pT)₇, модифицированный по атому N(3) остатка цитозина *cis*-аквагидроксодиаммино платиной, т.е. содержащий фрагмент *cis*-[(NH₃)₂Pt(N(3)-dC)(OH)].^{26–28} При выдерживании этого декануклеотида с ферментом происходит постепенная инактивация последнего. Инактивация конкурентно ингибируется дезоксиолигонуклеотидами различной длины и структуры.

Поскольку и матрица, и праймер в качестве аффинных реагентов-аналогов ДНК имеют достаточно протяженные контакты с ферментом, особенно интересно располагать серией производных, у которых реакционноспособная группа введена в определенные положения ДНК. В настоящее время сформировалось два основных подхода к получению таких производных. Один из них основан на введении реакционноспособной группы в ходе синтеза соответствующего олигонуклеотида. Естественно, этот подход можно реализовать только для производных, содержащих подобную группу в гетероцикле. При этом возможно промежуточное получение ДНК или олигонуклеотида, содержащих фрагмент, по которому можно ввести реакционно-способный остаток на последней стадии синтеза. В качестве примера можно привести получение набора аналогов праймера с различным положением фотоактивной группы относительно 3'-конца растущей цепи.²⁹ С этой целью в ходе синтеза праймера в определенное положение вместо обычного тимидина вводился его аналог, содержащий в положении 5 урацила остаток (CH₂)₃NHCOCF₃. После удаления трифторрастворительной группы мягким щелочным гидролизом праймер обрабатывали *N*-гидроксисукцинимидным эфиром 5-азидо-2-нитробензойной кислоты. Затем этот модифицированный праймер гибридизовали с ДНК фага M13, которая служила матрицей, и с помощью ДНК-полимеразы фага T4 удлиняли на одно звено с использованием в качестве субстрата [α -³²P]ddATP. Последняя операция резко снижает вероятность отщепления 3'-концевого остатка в результате присущей ферменту 3' → 5'-экзонуклеазной активности и одновременно позволяет вводить в праймер радиоактивную метку. Это важно при использовании такого соединения для

Таблица 1. Производные dNTP, содержащие фотоактивные группы в гетероциклическом основании.

Фотоактивная группа	Положение группы в гетероцикле	Субстратные свойства	Модификация (инактивация)
N ₃	Ade-8	—	Модификация Ile765, Tug766 в ДНК-полимеразе I <i>E. coli</i> в отсутствие дуплекса матрица – праймер ¹⁷
$\text{SCH}_2\text{CC}_6\text{H}_4\text{N}_3\text{-}p$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$	Ade-2	Конкурентный ингибитор по отношению к dTTP ¹⁹	Инактивация фрагмента Кленова в отсутствие дуплекса матрица – праймер ¹⁸ Ингибирует модификацию в присутствии поли(dA) – олиго(dT) ₁₀ ¹⁸ Мечение Asp732 ¹⁸
$\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—C—C}_6\text{F}_4\text{N}_3\text{-}p$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$ (FAB)	Cyt-4	Субстрат ДНК-полимеразы α-праймазы человека вместо dTTP ²¹ Субстрат обратной транскриптазы ВИЧ-1 вместо dCTP ¹³ и вместо dTTP ¹⁶	Модификация субъединиц 165, 59, 49 кДа (комплекс человека) ²³ Модификация субъединиц 165, 49 кДа (комплекс человека, компетентное мечение) ²³ Модификация субъединиц 150, 59, 48 кДа (комплекс из тимуса теленка) ²³ Модификация p66 и p51 ¹⁴ Модификация p66 (компетентное мечение) ¹⁴
$\text{CH=CHCH}_2\text{NHCC}_6\text{F}_4\text{N}_3\text{-}p$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$ (AIFAB)	Cyt-4	—	Снижение субстратных свойств и увеличение терминирующих свойств
$\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH—C—C}_6\text{H}_3\text{N}_3$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$ (NAB)	Cyt-4	Субстрат ДНК-полимеразы α-праймазы тимуса теленка ¹⁵ Субстрат обратной транскриптазы ВИЧ-1 вместо dCTP и вместо dTTP ¹⁶	Снижение субстратных свойств и увеличение терминирующих свойств
$(\text{CH}_2)_2\text{NHCCH}_2\text{ON=CHC}_6\text{F}_4\text{N}_3\text{-}p$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$	Cyt-4	Субстрат обратной транскриптазы ВИЧ-1 вместо dCTP и вместо dTTP ¹⁶	Снижение субстратных свойств и увеличение терминирующих свойств
$\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{ON=CHC}_6\text{F}_4\text{N}_3\text{-}p$ $\parallel$ O	Cyt-4	Субстрат обратной транскриптазы ВИЧ-1 вместо dTTP ¹⁶	Снижение субстратных свойств и увеличение терминирующих свойств
$\text{NHC}(\text{CH}_2)_4\text{CNH—N=CHC}_6\text{F}_4\text{N}_3\text{-}p$ $\parallel \quad \quad \parallel$ $\text{O} \quad \quad \text{O}$	Cyt-4	Субстрат обратной транскриптазы ВИЧ-1 вместо dCTP и вместо dTTP ¹⁶	Снижение субстратных свойств и увеличение терминирующих свойств
$\text{CH=CHCH}_2\text{NHCC}_6\text{F}_4\text{N}_3\text{-}p$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$	Cyt-5	Субстрат ДНК-полимеразы α-праймазы тимуса теленка. ²³ Субстрат обратной транскриптазы ВИЧ-1 ¹⁴	Модификация p66 и p51 Модификация p66 (компетентное мечение) ¹⁴
N ₃	Ura-5	—	Модификация ДНК-полимеразы I <i>E. coli</i> в отсутствие дуплекса матрица – праймер ²⁴
$\text{HC=CH—CH}_2\text{—NH—C—C}_6\text{H}_3\text{N}_3$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{O}$	Ura-5	Субстрат обратной транскриптазы ВИЧ-1 вместо dTTP ¹⁵	Модификация p66 и p51
$\text{CH=CH—C}_6\text{H}_4\text{—C—CF}_3$ $\quad \quad \quad \parallel$ $\quad \quad \quad \text{N=N}$	Ura-5 (ddUTP)	Субстрат обратной транскриптазы ВИЧ-1 вместо dTTP ²⁰	Модификация p66

аффинной модификации. Таким способом были получены праймеры с положением фотоактивной арилизидной группы в положениях 3, 9, 13, 18, 22, 27 и 46 относительно 3'-концевого фрагмента.²⁹ При использовании соответствующего матрично-праймерного дуплекса реакционноспособные остатки могут быть введены в определенные положения праймера ферментативным путем с применением в качестве

субстратов ДНК-полимераз аналогов dNTP, содержащих реакционноспособную группу.^{12, 14, 15, 23}

Второй подход к получению ДНК с определенным положением метки можно проиллюстрировать получением серии производных олигонуклеотидов-праймеров с различным положением флуоресцентной метки относительно 3'-конца праймера. Они были получены³⁰ из одного олигонуклеотида,

несущего в определенном месте аналог тимидина U*, содержащий в положении 5 вместо метильной группы флуоресцентную 5-диметиламинонафталин-1-сульфонильную группу. Исходный дуплекс имел структуру 2.



2

Структура матрицы позволяла добавлением dCTP в присутствии ДНК-полимеразы удлинить праймер на одно звено (соединение 3), добавлением смеси dCTP и dATP — на три звена (соединение 4), а добавлением смеси dCTP, dATP и dGTP — на шесть звеньев (соединение 5). Тем самым флуоресцентная метка удалялась на определенное расстояние от активного центра фермента.



3



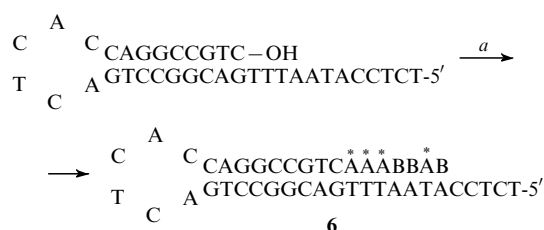
4



5

Для ряда исследований можно вместо дуплекса матрица–праймер использовать шпильчатую структуру со свисающим одонитевым фрагментом. Такая структура имитирует дуплекс матрица–праймер, и в присутствии ДНК-полимеразы может происходить элонгация короткого фрагмента стебля шпильки. При использовании для элонгации фотоактивных dNTP можно получить фотоактивный стебель, имитирующий фотоактивный дуплекс.

Такой прием был, например, использован для получения шпильки, содержащей несколько остатков бромдезоксиринидина (соединение 6).³¹



6

* — радиоактивно меченный остаток dAMP,

B — бромдезоксиринидин;

a) ДНК-полимераза; [α -³²P]dATP + BrdUTP (BrdUTP — 5-бром-дезоксиринидинтрифосфат).

Эта шпилька была использована для фотоаффинной модификации ДНК-полимеразы γ (ДНК-полимераза, работающая в митохондриях) из лягушки (ксенопуса) и для фотоаффинной модификации ДНК-полимеразы ϵ из тимуса теленка.³²

III. Исследование взаимодействия ДНК-полимераз с матрицами, праймерами и нуклеозид-5'-трифосфатами методом группоспецифичной и аффинной химической модификации. Структурные аспекты

1. ДНК-полимераза I из *E. coli* и фрагмент Кленова

Фермент состоит из одной полипептидной цепи (молекулярная масса 103 кДа, длина цепи 928 аминокислотных остатков)

и образует три домена. N-Концевой домен 1–330 содержит активный центр для 5' → 3'-экзонуклеазной активности, катализирующий ступенчатое отщепление нуклеотидов с 5'-конца. Средний домен, представленный остатками 331–514, содержит активный центр для 3' → 5'-экзонуклеазной активности, катализирующий отщепление 3'-концевого нуклеотида растущей полинуклеотидной цепи, причем преимущественно отщепляется остаток, некомплементарный матрице, что предотвращает сохранение ошибочно включенного мономера. Домен 515–928 содержит собственно ДНК-полимеразный центр.³³ При мягкой обработке фермента протеазой субтилизином от него отщепляется 5' → 3'-экзонуклеазный домен и получается так называемый фрагмент Кленова, сохраняющий всего две активности и в настоящее время являющийся предметом наиболее интенсивных исследований.³⁴

Для фрагмента Кленова сделан рентгеноструктурный анализ (рис. 1), в том числе в комплексе с модельным ДНК-дуплексом и в комплексе с dCTP (разрешение 3,9 Å).^{35, 36} Данные четко демонстрируют наличие обоих доменов. N-Концевой 3' → 5'-экзонуклеазный домен образован семью α -спиралями (A–G) и четырьмя β -структурами (1–4). С-Концевой полимеразный домен фрагмента Кленова образован тремя субдоменами, которые были названы «ладонью» (palm), «пальцами» (fingers) и «большим пальцем» (thumb), по анатомической аналогии с правой рукой (рис. 1). Домен «palm» состоит из шести β -структур (7–9, 12–14), «thumb» содержит четыре α -спирали (H–K), а домен «fingers» состоит из пяти α -спиралей (L–P). Наиболее удаленные от «palm» участки двух других субдоменов сближены, в результате чего формируется щель, в которой связывается ДНК. В основании щели находятся карбоксильные группы двух остатков аспартата (Asp705, Asp882) и одного остатка глутамата (Glu883) (рис. 2), которым приписывается роль групп, координирующих через ионы Mg^{2+} трифосфатную группу субстрата. Эти ионы играют важную роль в основном каталитическом процессе — переносе монофосфатного остатка на 3'-ОН-группу праймера. Аналогичные триады остатков дикарбоновых аминокислот обнаружены и у других ДНК-полимераз, для которых имеются данные об их пространственной структуре. В первую очередь отметим ДНК-полимеразу β , структура которой с высоким разрешением установлена в комплексе с ddCTP и dATP как в присутствии, так и в отсутствие комплекса матрица–праймер.^{37, 38} Наиболее детальные сведения о точках контакта комплекса матрица–праймер с ферментом получены в работе³⁹. В ней осуществлена прямая фотосшивка с ферментом двух меченых [$5'$ -³²P] олигонуклеотидов, содержащих 25 и 37 мономерных звеньев, 3'-концы которых образуют шпильчатую структуру. Стебель этой шпильки имитирует комплекс матрицы с праймером. Основная модификация прошла в пределах пептида, соответствующего участку фермента 759–775 по остаткам Ile765, Tyr766, Ser769 и Phe771 в спирали O домена «fingers».

С целью получения сведений об участке связывания субстрата был выполнен целый ряд работ с использованием реакционноспособных производных dNTP. Эти работы начались с применения метода прямой фотосшивки фермента с dTTP облучением при $\lambda = 254$ нм комплекса фермент–субстрат.⁴⁰ В этом эксперименте было показано, что фотоприсоединение происходит по остатку His881. Как видно из рис. 1, он находится между 12-й и 13-й β -структурами в субдомene «palm». При использовании для модификации фрагмента Кленова 8-азидо-dAMP фотоприсоединение происходило в основном по Tyr766, который находится в α -спирали «fingers».¹⁷ Интересно отметить, что этот же остаток тирозина модифицировался при облучении фермента в комплексе с матрицей и аналогом праймера 7.⁴¹

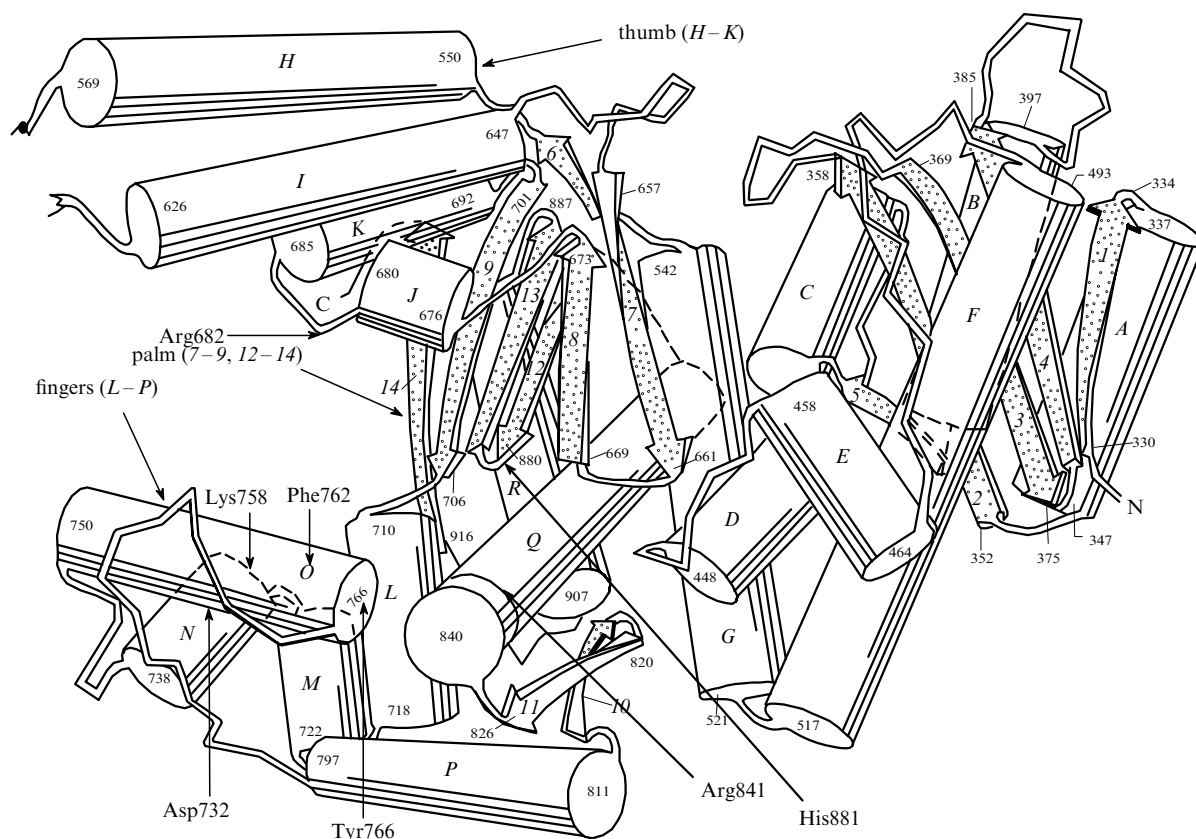


Рис. 1. Схема трехмерной структуры фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. α -Спиральные участки полипептида представлены в виде цилиндров, β -складки — в виде лент со стрелкой, указывающей направление цепи в складке от N-конца к C-концу; стрелками обозначены аминокислотные остатки, обнаруженные с помощью аффинной модификации.



7

U* — остаток аналога dTMP, содержащий в положении 5 2-нитро-5-азидобензильную группу, связанную через спейсер $(\text{CH}_2)_3\text{NH}$.

Это совпадение свидетельствует о том, что Tyr766 расположен в самом каталитическом центре. В пользу наличия в каталитическом центре остатка тирозина говорят и результаты химической модификации фрагмента Кленова специфичным к OH-группе тирозина реагентом — *N*-ацетилимидазолом. Модификация сопровождается потерей ферментативной активности. Защитить фермент от инактивации удавалось только в присутствии полного комплекса матрица–праймер–dNTP. При этом последний должен был быть комплементарен используемой матрице.^{4,42}

Уже на этом примере видно, что данные химической модификации не согласуются с упрощенной статической картиной расположения участков связывания субстратов. Сопоставление полученных результатов с пространственной структурой ДНК-полимеразы, полученной методом PCA, показывает, что расстояние между остатком Tyr766, модифицируемым 8-азидо-dAMP, и His881, модифицируемым dTTP, довольно велико (9 Å). Это наводит на мысль, что, по крайней мере, в бинарном комплексе фермент–dNTP ориентация последнего различна для разных нуклеотидов.

Помимо аналогов dNTP, для модификации ДНК-полимеразы (фрагмент Кленова) были использованы такие реагенты, как пиридоксаль-5-фосфат, который часто ведет себя как аналог нуклеотидов, и 5'-*n*-фторсульфонилбензоил-аденозин, FSO₂Bz-фрагмент которого по размеру близок к трифосфатной группе. В первом случае модификация прошла

по остатку Lys758,⁴³ а во втором случае — по остатку Arg682.⁴⁴ Следует заметить, что последняя модификация была проведена в присутствии комплекса матрица–праймер, т.е. как бы в комплексе, моделирующем комплекс фрагмента Кленова с матрицей–праймером и dNTP.

Если принять, что выявленные остатки имеют прямое отношение к активному центру фермента, то можно предположить, что положительно заряженные остатки как Lys758, так и Arg682 взаимодействуют с трифосфатным фрагментом dNTP. Однако и эта интерпретация не согласуется со структурой фермента, полученной методом PCA. Действительно, Lys758 расположен в спирали O, принадлежащей домену «fingers», а остаток Arg682 расположен в домене «thumb» по другую сторону щели (рис. 1). В то же время, как уже говорилось выше, наиболее вероятным участком закрепления трифосфатного фрагмента является триада остатков аминокислотных кислот, расположенная в субдомене «palm». Кроме того, эти предположения не согласуются с данными, полученными при фотомодификации фрагмента Кленова 2-(4-азидофенацетио)-dATP. В работе¹⁸ было показано, что модификация прошла по остатку Asp732, находящемуся в спирали N.

Однако при одновременном рассмотрении данных PCA и результатов химической или аффинной модификации следует помнить, что теоретически эти данные не обязательно должны быть адекватны. PCA как самих ферментов, так и их комплексов с субстратами проводится с кристаллическими препаратами и дает некую оптимизированную структуру. Ясно, однако, что конформация белкового остова может в известной мере флуктуировать, и совершенно не обязательно, что для связывания dNTP или его трифосфатного фрагмента оптимальной является конформация, полученная

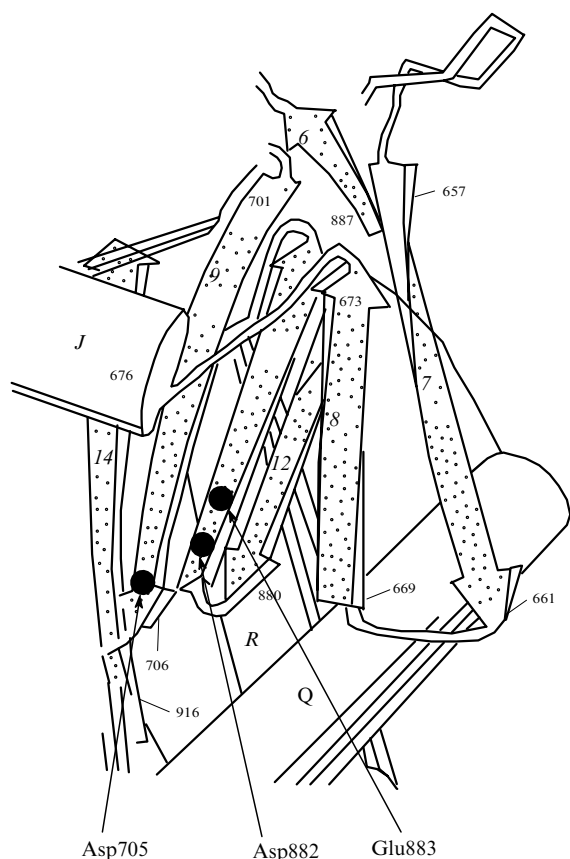


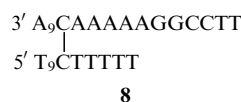
Рис. 2. Расположение триады остатков дикарбоновых аминокислот в трехмерной структуре фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*.

методом PCA для кристалла. В еще большей мере это относится к результатам химической модификации. Отмечалось,⁴⁵ что термодинамически оптимальная структура комплекса аффинного реагента с ферментом вряд ли обеспечивает оптимальную взаимную ориентацию реакционноспособного фрагмента и аминокислотного остатка мишени. При рассмотрении методом молекулярной механики процесса в дуплексе, образованном комплементарными олигонуклеотидами, один из которых несет *N*-2-хлорэтил-аминогруппу, установлено,⁴⁶ что энергетически оптимальные конформации не обеспечивают достаточного сближения алкилируемого гетероцикла и промежуточного этилениммониевого катиона, который образуется из исходной алкилирующей группы. Для перехода от термодинамически оптимальной к кинетически оптимальной структуре необходимо преодолеть определенный энергетический барьер. Для энергетически минимизированных структур, способных достаточно легко, но не беспрепятственно перейти в кинетически оптимальную, был введен⁴⁶ термин «конформационный накопитель». Поэтому небольшое несоответствие между рентгеноструктурными и химическими данными, составляющее несколько ангстрем, может всего-навсего отражать конформационные различия структуры фермента с оптимальным размещением субстрата и модифицирующего реагента.

Показано,⁴⁷ что обработка фрагмента Кленова [7-¹⁴C]фенилглиоксальем, специфично реагирующим с остатками аргинина, приводит к инактивации фермента. При включении в белок четырех остатков реагента достигается 95% инактивации. Поскольку с каждым остатком аргинина могут взаимодействовать две молекулы фенилглиоксаля, это означает, что инактивация происходит при модификации двух остатков аргинина. Только комплекс матрица–прай-

мер защищает фермент от инактивации фенилглиоксальем. Основное место модификации — Arg841. Этот остаток расположен в *Q*-спирали, вблизи Tyr766 и Lys758, а также His881, которые, как описано выше, участвуют во взаимодействии с dNTP или их аналогами. Расположение аминокислотных остатков, выявленных с помощью аффинной модификации, в трехмерной структуре фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* представлено на рис. 1. Триада остатков дикарбоновых аминокислот отмечена кружками на рис. 2.

Неожиданным результатом, полученным при изучении структуры фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, было выявление большого (~ 30 Å) расстояния между активным центром, в котором проходит удлинение праймера, и центром 3' → 5'-экзонуклеазной активности. Согласно общепринятой и хорошо обоснованной экспериментально точке зрения о роли последнего, после каждого акта элонгации новый присоединенный 3'-концевой фрагмент должен «пройти проверку» в экзонуклеазном центре. Для этого должно произойти перемещение концевого фрагмента праймера на несколько звеньев. Этот вопрос был исследован с использованием дуплекса матрица–праймер с ковалентно связанными цепями **8**, в котором два остатка цитидина связаны между собой аминокислотными группами с помощью этиленового мостика.⁴⁸



Сшивка достигается введением в матричный олигонуклеотид вместо цитидина его аналога, содержащего в положении 4 высокореакционноспособный трехчленный этилениминовый цикл. Такой аналог легко алкилирует расположенную напротив него аминокислотную группу праймерной цепи. Оказалось, что только пятый от места сшивки остаток dTMP праймера отщепляется под действием экзонуклеазы. Отщепление четвертого остатка чрезвычайно затруднено (константа скорости реакции на два порядка ниже, чем в случае пятого остатка). В то же время такой укороченный сшитый праймер, 3'-ОН-группа которого отстоит на четыре нуклеотида от точки сшивки, остается хорошим субстратом для элонгации. Следовательно, затрудненное разделение нитей сказывается только на одной из активностей фермента. Этот результат можно рассматривать как экспериментальное подтверждение необходимости значительного перемещения 3'-концевого фрагмента синтезируемой нити для акта коррекции.⁴⁸

Некоторые сведения об областях контакта фермента и нуклеиновых компонентов получены с помощью флуоресцентных методов. В работе³⁰ для оценки области контакта дуплекса матрица–праймер с ферментом использовали серию дуплексов **2–5**, в праймерный компонент которых был введен аналог dTMP, содержащий в положении 5 вместо метильной группы флуоресцирующую 5-диметиламинонафталин-1-сульфонильную группу. В этих дуплексах флуоресцентная метка была удалена на определенное, различное для разных дуплексов расстояние от активного центра фермента. Измерение времен жизни флуоресценции и времен корреляции внутреннего вращения для всех полученных образцов показало, что, по крайней мере, шесть остатков праймера остаются в контакте с ферментом. По мере удаления метки от 3'-конца праймера наблюдаются некоторые изменения ее флуоресцентных характеристик, свидетельствующие об изменении доступности метки растворителю и ее расстояния до белка.

Введение флуоресцентных меток в белок, ДНК и dNTP было использовано для оценки расстояний между определенной точкой фермента, ДНК и dNTP по резонансному переносу энергии с расчетом расстояний по теории Ферстера. В

фрагмент Кленова можно ввести в качестве акцептора энергии остаток 4-амино-7-нитробенз-2,1,3-оксадиазола по Cys907 через спейсер $\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2$. Ана-логичный акцептор можно ввести в положение 5 урацила через триметиленовый спейсер и на основе полученного аналога тимидина синтезировать фрагмент ДНК. В качестве донора энергии можно ввести в положение 5 урацила флуоресцирующую 5-аминонафталин-1-сульфонатную группу через спейсер $\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}_2$. На этой основе можно получить мононуклеотид, нуклеозидтрифосфат и фрагмент ДНК с донорной группой. Проведенное исследование позволило оценить расстояния между Cys907 и dNMP, dNTP или ДНК, а также расстояние между ДНК и dNMP.⁴⁹

Исследование активных центров других ДНК-полимераз с помощью аффинной модификации находится пока в зачаточном состоянии. Заманчивым объектом представляется ДНК-полимераза β человека, для которой получены данные РСА высокого разрешения.^{37,38} Сделана попытка локализовать dNTP-связывающий центр с помощью модификации 8-азидо-АТР и 5-азидо-dUTP.⁵⁰ Однако эти эксперименты проведены в отсутствие комплекса матрица – праймер. Возможно, с этим связана обнаруженная авторами⁵⁰ модификация субдомена 8 кДа, участвующего во взаимодействии с одонитевой ДНК. Недавно с помощью FAV-dCTP осуществлено каталитически компетентное мечение ДНК-полимеразы β .¹² Определение точки (или точек) модификации в этом случае позволит более надежно отнести их к области связывания dNTP.

2. Обратные транскриптазы

Ферменты, осуществляющие обратную транскрипцию, т. е. катализирующие матричный биосинтез ДНК на РНК-матрице, характерны для большой группы вирусов, называемых ретровирусами. Некоторые исследования, основанные на использовании химических методов, проводились с ферментом вируса миелобластома птиц (обратная транскриптаза AMV) и вируса Молони лейкемии грызунов (обратная транскриптаза MuLV). Особенно интенсивно эти ферменты стали изучать в связи с обнаружением обратной транскриптазы у вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1). Этот фермент рассматривается как перспективная мишень для борьбы со СПИДом, поэтому в этом разделе речь будет идти в основном об обратной транскриптазе ВИЧ-1.

Фермент в норме состоит из двух субъединиц, обозначаемых в соответствии с их молекулярными массами в килодальтонах р66 (555 аминокислотных остатков) и р51 (446 аминокислот). При этом меньшая субъединица (р51) представляет собой укороченную субъединицу р66, лишенную фрагмента 447–555.^{51–53} Фермент катализирует несколько процессов. Его функционирование начинается с обратной транскрипции геномной РНК вируса, представленной в вирионе двумя молекулами по 9750 нуклеотидов каждая.⁵⁴ Как и все ДНК-полимеразы, этот фермент требует наличия праймера. Природным праймером является тРНК клетки хозяина, в случае фермента ВИЧ-1 — тРНК^{лиз}.³ человека. На одном из завершающих этапов обратной транскрипции, приводящей к формированию минус-копии ДНК, фермент начинает работать как обычная ДНК-полимераза, создавая плюс-нить ДНК по информации, содержащейся в минус-нити. В ходе формирования минус-нити происходит постепенное уничтожение геномной РНК вируса с помощью еще одной ферментативной активности, присущей ферменту — РНКазе Н. Именно эта активность содержится в домене 447–555, отсутствующем в субъединице р51.^{53,55} В принципе, в искусственных условиях вместо гетеродимера р66/р51 могут быть получены гомодимеры, состоящие из одинаковых субъединиц.

Рентгеноструктурный анализ гетеродимера показал,⁵⁶ что субъединица р66 состоит из нескольких субдоменов.

Они образуют структуру, сходную с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I, которая представлена субдоменами «fingers», «palm» и «thumb». В работе⁵⁶ приведены также номера остатков в первичной последовательности обратной транскриптазы, соответствующие этим субдоменам, которые через соединительный субдомен связаны с С-концевым субдоменом, ответственным за Н-РНКазную активность фермента. В субдомене «palm» расположены три остатка Asp (110, 185, 186), по-видимому, играющие ту же роль, что соответствующие триады в ДНК-полимеразах I и β .

Первые три субдомена формируют полимеразный домен, у которого, как и в случае фрагмента Кленова, имеется щель для связывания дуплекса матрица – праймер. Однако, в отличие от фрагмента Кленова, полимеразный домен формируется не С-концевой, а N-концевой частью полипептидной цепи.⁵⁷

Область контакта дуплекса с ферментом была исследована наиболее детально с помощью футпринтинга радикалами $\cdot\text{OH}$.⁵⁸ На искусственном дуплексе матрица – праймер, центральная часть которого представлена ниже, было приготовлено несколько образцов путем элонгации праймера соответствующими dNTP и одним ddNTP.

```
....d(AAACCCTTCTGGTTCCCTTTCCCC....) (3') (78 звеньев)
      d(GGGG....) (5') (35 звеньев)
      ddAGGGG....
      ddGAAAGGGG....
      ddCAAGGGGAAAGGGG....
      ddTGGAAGACCAAGGGGAAAGGGG....
```

Таким образом был получен набор дуплексов с положением терминирующего фрагмента на расстоянии 1, 4, 10 и 19 звеньев от исходного. Например, смещение на 10 нуклеотидов достигалось добавлением к смеси дуплекса и фермента dATP, dGTP, ddCTP. Поскольку включение терминатора происходит в активном центре фермента, получались комплексы с одинаковым расположением дуплекса относительно активного центра, но с разным примыкающим нуклеотидным окружением. Во всех случаях получена сходная картина — фермент защищает участки матричной нити +3 ÷ –15 (нумерация относительно точки включения терминатора) и остатки праймера –1 ÷ –15. При этом участки –9 ÷ –11 матрицы и –8 ÷ –10 праймера не защищаются. Кроме того, непосредственно к 5'-концу со стороны праймера к последовательности, защищаемой от действия радикалов $\cdot\text{OH}$, примыкает пара с существенно повышенной чувствительностью к модификации. На рис. 3 представлена схема футпринта матричной и праймерной цепи с помощью радикалов $\cdot\text{OH}$. Темным выделены области праймера и матрицы, защищаемые ферментом от действия радикалов между положениями +3 и –15. Гиперчувствительное место — положение усиленного расщепления матричной цепи вследствие изменений в структуре матрицы, вызванных взаимодействием с доменом РНКазы Н гетеродимера обратной транскриптазы ВИЧ-1. Область, в которой происходит это конформационное изменение дуплекса, близка к области

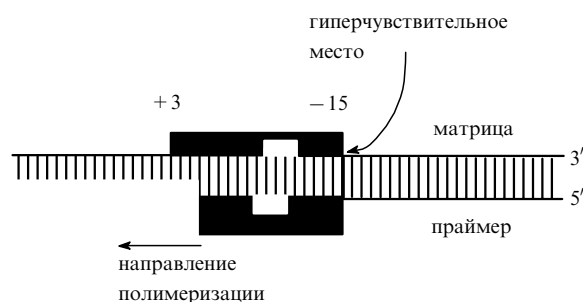


Рис. 3. Схема футпринта с помощью гидроксильных радикалов матричной и праймерной цепей.

контакта с РНКазой Н. Поэтому, возможно, что именно домен РНКазы Н индуцирует конформационный переход в этой области дуплекса. Сходные, хотя и не совсем идентичные результаты получены при использовании ферментативного футпринтинга. Независимо от точки остановки синтеза терминатором от действия ДНКазы I защищаются остатки $+7 \div -23$ матрицы и $-1 \div -25$ праймера. На стыке областей, формирующих полимеразный и Н-РНКазный центры (нуклеотиды -20 как матрицы, так и праймера) участок становится доступным атаке ДНКазой.⁵⁹

Одним из интригующих свойств обратных транскриптаз является использование ими в качестве праймера для обратной транскрипции определенных тРНК клеток хозяина. 3'-Концевые последовательности этих тРНК во всех случаях комплементарны участку связывания праймера геномной РНК. Однако в связывании как с геномной РНК, так и с самим ферментом участвуют и некоторые другие домены такой тРНК. Исследование, проведенное с помощью *транс*-Pt[(NH₃)₂Cl₂] в качестве бифункционального сшивающего агента,⁶⁰ показало, что к обратной транскриптазе ВИЧ-1 оказывается присоединенной антикодоновая петля тРНК^{Leu}.³ С помощью того же реагента было установлено, что сшивание антикодоновой петли с обратной транскриптазой ВИЧ-1 происходит и в случае тРНК, полученной транскрипцией кодирующего ее гена с помощью РНК-полимеразы фага T7, которая не содержит модифицированных гетероциклов: 5-метоксикарбонилметил-2-тиоурацила и N-(2-метилтиопурин-6-ил)треонина. Это означает, что взаимодействие не связано с наличием специфически модифицированных гетероциклов в антикодоновой петле.⁶¹

Для выявления фрагментов тРНК^{Leu}, контактирующих с ферментом, использовали также аналоги тРНК, в определенное место которых вводили остаток 4-тиоуридина.⁶² Облучение комплекса фермента с такими тРНК светом с длиной волны 365 нм приводило в большинстве случаев к сшиванию тРНК с белком. Оказалось, что в случае тРНК, содержащих фотоактивный остаток в положениях -1 и $+16$ (т.е. в составе акцепторного стебля и в дигидроуридиловой петле), сшивание проходит исключительно по субъединице р66. Если остаток тиюридина находится в положении 36 (антикодоновая петля), сшивка происходит с обеими субъединицами, хотя и преобладает реакция с р66. Когда тиюридиновый остаток находится в положении 43 (антикодоновый стебель), фотосшивка тРНК с ферментом вообще не происходит. Эти данные дают определенное представление о том, какие части тРНК-праймера непосредственно контактируют с ферментом.

Химическая модификация реагентами, специфично взаимодействующими с одонитевыми участками нуклеиновых кислот — диметилсульфатом, N-циклогексил-N'-[2-(N'-метилморфолиний)этил]карбодиимидом, диэтилпирокрбонатом,⁶³ позволила детально исследовать взаимодействие участка связывания праймера (PBS — primer binding site) геномной РНК ВИЧ-1 и тРНК^{Leu}. Отсутствие или резкое снижение уровня модификации тех или иных участков геномной РНК позволяет считать, что именно они участвуют в образовании комплементарных пар нуклеотидов. Оказалось, что 18 нуклеотидных остатков с 3'-конца тРНК образуют двойную спираль с участком 179–196 геномной РНК. Из данных, полученных с использованием более простых неприродных систем, например, дуплексов поли(гА)–олиго(дТ), известно, что обратная транскрипция не требует столь сложного и специфичного праймера. Тем не менее 3'-конец этого праймера не только соответствует определенному участку геномной РНК вируса, т.е. выполняет функцию собственно праймера, но также образует сложный комплекс с участком других фрагментов тРНК и матрицы. Гексануклеотидный фрагмент 33–39 этого праймера, образующий антикодоновую петлю, связан с комплементарным участком 162–167 матрицы с выпадением из двуспирального участка одного

минорного нуклеотида петли. Участок 40–47 образует дуплексы с участками 140–143 и 158–160 РНК вируса.⁶³

Таким образом, химические методы позволили в случае обратной транскриптазы ВИЧ-1 определить области матрицы и продукта, расположенные на ферменте в непосредственной близости от его каталитического центра, определить участки природного праймера, взаимодействующие с ферментом, и участки этого праймера, взаимодействующие с геномной РНК. Для геномной РНК также определены области, взаимодействующие с праймером.

Значительно более бедная и иногда противоречивая информация получена при исследовании химическими методами функционально значимых участков белка. Несомненный интерес представляют сведения, полученные с помощью аффинных реагентов. Они касаются распределения участков модификации аффинными реагентами между субъединицами. Прямая фотосшивка dTTP с ферментом происходит только по субъединице р66.⁶⁴

Такой же результат получен при фотоаффинном мечении фермента в комплексе матрица (олигомер из 18, 21 звеньев) – праймер (12 звеньев), элонгированным с помощью 4-тиоуридинтрифосфата,⁶⁵ а также при использовании поли(дА)–олиго(дТ) в качестве матрицы–праймера и 2',3'-дидезокси-(5E)-[4-(3-трифторметил-3H-диазиридин-3-ил)-стирил]УТР в качестве аналога dTTP.²⁰ Прямая фотосшивка была осуществлена⁶⁶ для дуплекса, образованного 40-звенным 5'-концевым фрагментом геномной РНК и 20-звенным ДНК-праймером. В этом случае праймер присоединялся исключительно к субъединице р66. В то же время после элонгации праймера до 40 нуклеотидов сшивка осуществлялась и с субъединицей р51. По мнению авторов⁶⁶, это указывает на наличие общего кармана, связывающего праймер и образованного обеими субъединицами фермента. Очевидно, во всяком случае, что субъединица р51 начинает взаимодействовать с праймером при достаточном его удалении от активного центра фермента.

Сходный результат получен в работе⁶⁷. При облучении фермента светом с длиной волны $\lambda = 266$ нм в присутствии [³²P]d(pT)₁₀ с добавлением или без добавления комплементарной матрицы поли(гА) радиоактивность регистрировалась только в субъединице р66. В то же время при использовании производного d(pT)₁₀, содержащего фотоактивный остаток 2-нитро-5-азидобензамида или β-аланиламидоэтидия, связанные фосфамидной связью с 5'-концевым фосфатом, фотоиндуцированное присоединение происходило по обеим субъединицам. Это можно трактовать как следствие удаленности фотоактивной группы от активного центра фермента, в котором должен располагаться противоположный 3'-концевой остаток нуклеотида. В то же время введение в 3'-конец праймера остатка аналога dCTP, имеющего фотоактивную азидоперфторбензоильную группу, связанную с C(5) цитозина через спейсер CH=CHCH₂NH (AlFAB-dCTP) или с аминогруппой цитозина через спейсер CH₂CH₂NH (FAB-dCTP), также приводит к тому, что при облучении праймер связывается с обеими субъединицами.¹⁴

Такое изменение распределения при введении сравнительно небольшого фрагмента, разделяющего фотоактивную группу и праймер, показывает, что субъединица р51 находится сравнительно недалеко от каталитического центра р66. Данные кристаллографического анализа комплекса обратной транскриптазы ВИЧ-1 с ДНК и базирующиеся на РСА результаты компьютерного моделирования таких комплексов говорят в пользу участия субъединицы р51 во взаимодействии обратной транскриптазы с комплексом матрица – праймер.^{56, 57, 68}

Некоторые данные, демонстрирующие неравноценность функций субъединиц, получены и на обратной транскриптазе вируса миелобластома птиц, также состоящего из двух субъединиц. Этот фермент использует в качестве природного праймера тРНК^{Trp}. Показано,⁶⁹ что тРНК^{Trp}, окисленная

периодатом по 3'-концевой *цис*-диольной группе, инактивирует фермент. При неполной модификации тРНК^{гру} вся она оказывается связанной лишь с одной из двух субъединиц, обозначаемой как α . Последняя, по-видимому, является аналогом р66 фермента ВИЧ-1, поскольку содержит все присущие ферменту активности, включая активность РНКазы Н.

В некоторых работах получены сведения о точках или областях обратной транскриптазы ВИЧ-1, взаимодействующих с аффинными реагентами или существенных для проявления каталитических функций. В уже упомянутом выше эксперименте по прямой фотосшивке фермента с dTTP в качестве основной точки модификации зарегистрирован остаток Lys73, находящийся в субдомене «fingers».⁶¹ В отличие от этого в комплексе матрица (18–21 звеньев)–праймер (12 звеньев), элонгированном с помощью 4-тиоуридинтрифосфата, фотоаффинное мечение фермента проходило в пределах пептидного фрагмента 313–423.⁶² Этот фрагмент соответствует нижней части субдомена «thumb» и соединительному домену. Обнаружено также, что модификация фермента фенилглиоксалем — реагентом, специфичным к остаткам аргинина — приводит к полной инактивации фермента.⁷⁰ Присутствие комплекса матрица–праймер предотвращает инактивацию, причем от модификации оказывается защищенным остаток Arg277. Этот остаток также находится в субдомене «thumb», но на противоположном конце по отношению к пептиду, который модифицируется остатком 4-тиоуридина.

Для выяснения участка связывания праймера в работе⁷¹ была осуществлена прямая фотосшивка (pdT)₁₆ с гомодимером, состоящим из двух субъединиц р66. Анализ пептидов триптического гидролизата показал, что основное место присоединения олиго(dT) расположено в пептиде 288–307, находящемся в верхней части субдомена «thumb». В качестве наиболее вероятных областей модификации определены фрагменты Leu289–Thr290 и Leu295–Thr296. В работе⁷² показано, что в этой области расположен также район гомодимера обратной транскриптазы ВИЧ-1, связывающий полинуклеотид.

Следует отметить, что при использовании в составе праймера некоторых фотоактивируемых групп наряду с модификацией белка наблюдается также модификация матричной ДНК, т.е. происходит сшивание цепей праймера и матрицы. Это явление было зарегистрировано в системах фермент–матрица–праймер для обратной транскриптазы ВИЧ-1 и для комплекса ДНК-полимеразы α с праймазой при использовании праймеров, в которые был введен остаток FAV-dCTP.^{13, 14, 21}

IV. Каталитически компетентное мечение ДНК-полимераз

Метод «каталитически компетентного мечения» в применении к матричным ферментам был впервые широко использован для изучения ДНК-зависимых РНК-полимераз. Основная идея этого метода изложена в работах^{1, 73}. Он основан на химической модификации фермента каким-либо немеченым реакционноспособным аналогом dNTP с последующей элонгацией ковалентно присоединенного субстрата вторым субстратом, несущим радиоактивную метку. При этом только те остатки первого аналога, которые имеют ориентацию, подходящую для последующего катализа за счет ковалентной фиксации, будут содержать радиоактивную метку. Они называются «каталитически компетентными».

Для ДНК-полимераз впервые подобный принцип был осуществлен в случае ДНК-полимеразы I.⁷⁴ В качестве аффинных реагентов были использованы аналоги олиготимидилатов, содержащие алкилирующую группу, присоединенную к 5'-концевому фосфату (рис. 4). Аффинная модифи-

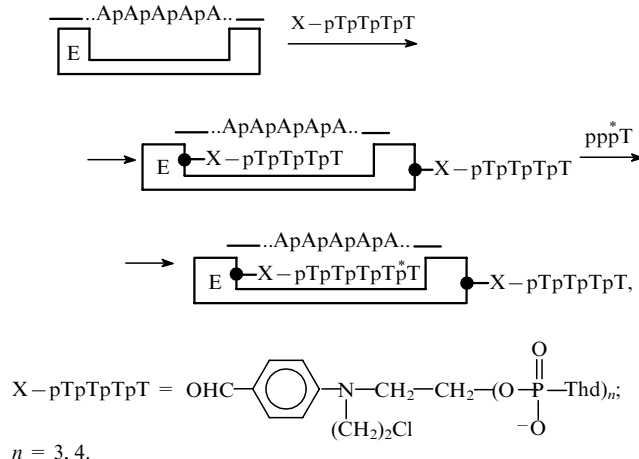


Рис. 4. Схема высокoeffективной аффинной модификации ДНК-полимеразы I *E. coli*. p* — Радиоактивно меченный атом фосфора, X-pTpTpTpT — аффинный реагент, X — остаток аффинного реагента, ковалентно связанный с ферментом, E — фермент.

кация ДНК-полимеразы I была осуществлена ковалентным присоединением реакционноспособного аналога олиготимидилата в присутствии поли(dA)-матрицы. После ковалентного присоединения олиготимидилата радиоактивная метка была введена с помощью его элонгации [α -³²P]dTTP. Таким образом, была использована каталитическая компетентность олигонуклеотидного праймера, ковалентно фиксированного за 5'-конец. Наиболее интенсивному мечению подвергался пептид Asp832–His928, расположенный в полимеразном участке фермента. Поскольку при каталитически компетентном мечении 3'-ОН-группа праймера должна находиться в активном центре фермента, более детальная локализация точки присоединения 5'-конца праймера могла бы позволить определить ориентацию праймера на ферменте. Вопрос об ориентации праймера в комплексе с ДНК-полимеразами в настоящее время является предметом интенсивных дискуссий.^{38, 75}

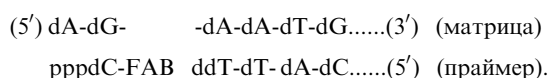
Аналогичный подход был использован в уже описанной в предыдущем разделе работе⁶⁷ для изучения вклада субъединиц обратной транскриптазы во взаимодействие с комплексом матрица–праймер. Интересно, что ковалентное присоединение праймера за 5'-конец не препятствовало последующему присоединению к растущей цепи как минимум четырех остатков тимидина. Следовательно, не исключена возможность транслокации фермента относительно дуплекса матрица–праймер. Эта система может оказаться интересной моделью для изучения стадии транслокации. Такой же результат был получен для праймазы *E. coli* в работе⁷⁶, в которой проводили ковалентное присоединение триметафосфата аденозина с последующей элонгацией с помощью [α -³²P]GTP для компетентного мечения. Элонгация с помощью [α -³²P]GTP вместе с другими dNTP приводила к тетра- и пентануклеотидам. Таким образом, ковалентная фиксация и в этом случае не препятствовала нескольким актам элонгации.

Новый вариант каталитически компетентного мечения осуществлен с использованием фотоактивных аналогов dNTP, имеющих арилазидогруппы, присоединенные с помощью спейсеров к гетероциклическому основанию нуклеотида. В отличие от описанных выше первых вариантов каталитически компетентного мечения, в которых иммобилизацию проводили по 5'-концу мономера или олигонуклеотида, в этом случае трифосфатная группа dNTP не участвует в иммобилизации субстрата на ферменте и остается немодифицированной. Тем самым она потенциально может участвовать в реакции с 3'-ОН-группой добавленного праймера.

Такая возможность была изучена для серии фотоактивных аналогов, предварительно исследованных на субстратную активность (см. табл. 1, работы ^{11, 12, 14–16, 23}). Оказалось, что во всех случаях ковалентно присоединенные через гетероциклическое основание к ДНК-полимеразе аналоги dNTP могут взаимодействовать с комплексом матрица–праймер. При наличии [³²P]-фосфата на 5'-конце праймера это приводит к компетентному мечению области присоединения аналога dNTP. Были также проведены эксперименты по добавлению к конъюгату ДНК-полимеразы с аналогом dNTP немеченого комплекса матрица–праймер с последующим добавлением [α -³²P]dNTP, соответствующего матрице. В этом случае также происходило мечение конъюгата. Таким образом, иммобилизованный через гетероциклическое основание комплекс матрица–праймер способен участвовать в элонгации праймера.^{12, 14, 21, 23}

Получены данные, указывающие на то, что в определенных случаях фиксация такого реагента повышает селективность модификации. В разделе III описана модификация обратной транскриптазы ВИЧ-1 комплексом матрица–праймер, содержащим на 3'-конце праймера остаток FAV-dCTP или AIFAB-dCTP.¹⁴ В этих экспериментах фотоактивную группу вводили в праймер энзиматически с помощью свободного субстрата. При этом была зарегистрирована модификация обеих субъединиц. В сходном эксперименте те же фотоактивные группы вводили в праймер с помощью предварительно иммобилизованных аналогов dNTP. В этом случае модификация проходила более селективно, только по субъединице р66. Аналогичный прием в случае NAB-dUTP не привел к повышению селективности. Как с предварительной иммобилизацией, так и без нее метка обнаруживалась в обеих субъединицах.¹⁵ Эти данные также свидетельствуют о близком расположении субъединицы р51 и активных центров на субъединице р66.

Сохранение субстратной активности трифосфатной группы иммобилизованного dNTP может представить существенный интерес для изучения центра фермента, участвующего в катализе нуклеотидилтрансферазной реакции. В связи с этим важно в максимальной степени сохранить способность иммобилизованного dNTP к участию в элонгации праймера. Один из подходов был опробован на примере FAV-dCTP и обратной транскриптазы ВИЧ-1.¹² С этой целью фотоприсоединение реагента проводили в присутствии комплекса матрица–праймер, содержащего на 3'-конце праймерного компонента соответствующий дидезоксинуклеотид. Фрагмент этой системы приведен ниже:

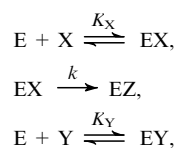


Использованный дуплекс не способен к элонгации из-за отсутствия на 3'-конце праймера группы ОН. В остальном он полностью имитировал функциональный дуплекс. После облучения дидезоксианалогом праймера вытесняли избытком ³²P-меченного нормального праймера. По количеству связанной с ферментом радиоактивности определяли уровень каталитически компетентного мечения фермента в присутствии матрицы и праймера. Было обнаружено существенное (в несколько раз) повышение уровня мечения субъединицы р66 по сравнению с полученным при фотопришивке того же аналога в отсутствие остальных компонентов. Интересно отметить, что аналогичные эксперименты с ДНК-полимеразой β человека не показали увеличения уровня присоединения к ферменту FAV-dCTP. Это может свидетельствовать о меньшей зависимости взаимодействия dNTP с активным центром этого фермента от матрицы.¹² Праймер, как ковалентно присоединенный к 3'-концу с помощью каталитически компетентной элонгации, так и содержащий после ковалентного присоединения фотоактивную группу в 3'-концевом звене, способен к дальнейшей элонгации с

помощью [α -³²P]dNTP.^{12, 14} Этот подход также может быть использован для анализа механизма транслокации ДНК-полимераз.

V. Исследование взаимодействия ДНК-полимераз с матрицами, праймерами и нуклеозид-5'-трифосфатами методом аффинной химической модификации. Количественные аспекты

Как уже говорилось, аффинная модификация биополимеров, т.е. модификация реагентами, имеющими реакционноспособную группу и обладающими специфической структурой, опознаваемой биополимером, широко используется для селективной модификации групп биополимера, расположенных в области его взаимодействия с лигандом. Иными словами, аффинная модификация используется как инструмент изучения структурной организации активных центров ферментов. Кинетику аффинной модификации можно исследовать, измеряя в ходе реакции либо степень присоединения реагента к биополимеру, либо убывание активности биополимера. Кинетические данные дают информацию о сродстве реагента к биополимеру. Измерения в присутствии какого-либо лиганда, конкурирующего с реагентом за связывание с активным центром, позволяют определить сродство к конкурирующему лиганду. В общем виде методы оценки констант диссоциации (K_d) для лигандов, конкурирующих с аффинными реагентами, были сформулированы в обзорах ^{4, 77}. Процесс аффинной модификации фермента (Е) реагентом (Х) в присутствии конкурирующего лиганда (Y) в простейшем случае может быть описан следующим образом:



где EX — комплекс фермента с реагентом, EZ — продукт модификации, EY — комплекс Y с ферментом, k — константа скорости превращения EX в EZ, K_X — константа диссоциации комплекса EX, K_Y — константа диссоциации комплекса EY.

При достаточном избытке аффинного реагента X модификация протекает как реакция первого порядка. Из зависимости степени модификации или остаточной активности ДНК-полимеразы от времени ее инкубации с реакционноспособным аналогом олигонуклеотида можно найти величины кажущихся констант скорости модификации (k_{app}) при разных концентрациях реагента и конкурирующего лиганда. Зависимость k_{app} от начальной концентрации реагента X_0 и концентрации конкурирующего лиганда Y_0 может быть записана в виде уравнения (1):

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1}{k} + \frac{K_X}{[kX_0(1 + Y_0/K_Y)]}, \quad (1)$$

k_{app} — кажущаяся константа скорости модификации, k — константа скорости превращения EX в EZ, K_X — константа диссоциации комплекса EX, K_Y — константа диссоциации комплекса EY.

Из зависимости k_{app} от Y_0 при постоянном X_0 нетрудно найти константу K_Y .

Этот метод был использован для изучения взаимодействия ДНК-полимераз с матрицами, праймерами и дезоксинуклеозид-5'-трифосфатами.⁷⁴ Для изучения участка связывания матрицы использовали аффинный реагент (pdT)₂p[(NH₃)₂Pt(N(3)-dC)(OH)](pdT)₇. За его взаимодействием с ферментом следили по изменению активности

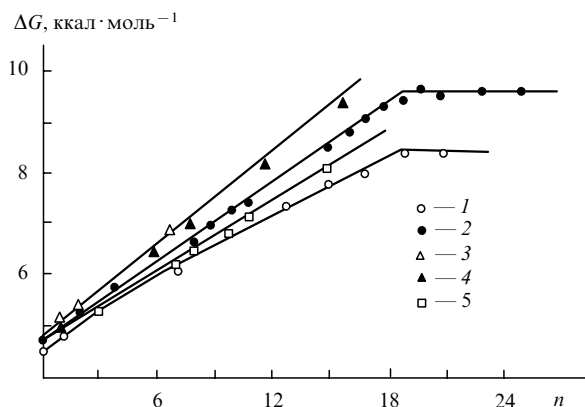


Рис. 5. Зависимость величины ΔG^0 комплекса фрагмента Кленова с олиготимидилатом (1), олиготимидилатом (2), олигогуанилатом (3), олигоаденилатом (4) и комплекса ДНК-полимеразы α из плаценты человека с олиготимидилатом (5) от длины олигонуклеотида.

ДНК-полимеразы. В качестве конкурентных ингибиторов исследован широкий спектр олигонуклеотидов различной длины и состава. Были найдены величины констант диссоциации для комплексов ДНК-полимеразы α из плаценты человека и фрагмента Кленова с олигонуклеотидами и соответствующие стандартные свободные энергии связывания (ΔG^0).^{28, 78, 79} Для серии гомоолигонуклеотидов на рис. 5 приведена зависимость ΔG^0 от их длины n . Примерно до величины $n = 20$ зависимость линейна. Это свидетельствует о том, что длина участка связывания матрицы с ферментом составляет около 20 нуклеотидных остатков. Для декатимидилатов зависимость описывается уравнением

$$\Delta G^0 = -6.0 - 0.32n \text{ (ккал} \cdot \text{моль}^{-1}\text{)}. \quad (2)$$

Это означает, что вклад каждого нуклеотидного звена составляет 0.32 ккал · моль⁻¹. Для других типов нуклеотидных звеньев эти величины различаются. Так, для наиболее гидрофильного pдC получено значение -0.28 ккал · моль⁻¹, а для наиболее гидрофобных pдA и pдG — -0.40 ккал · моль⁻¹ (см.⁷⁴). Линейный характер зависимости (2) позволяет рассчитать величину ΔG^0 , а следовательно, и K_d для взаимодействия ДНК-полимеразы с олигонуклеотидом с произвольной последовательностью мономеров (табл. 2). Рассчитанные величины хорошо согласуются с полученными экспериментально.

Влияние природы нуклеотида на величину вклада во взаимодействие дает основание считать, что взаимодействие не является электростатическим и, скорее всего, имеет гидрофобную природу. Интересно в связи с этим отметить, что по данным прямой фотосшивки участок фрагмента Кленова 759–774, непосредственно взаимодействующий с

Таблица 2. Значения K_d комплексов фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* с олигонуклеотидами разной длины и структуры.²⁸

Олигонуклеотид	K_d , мкМ	
	рассчитанная	экспериментальная
d(pTpApApTpApCpGpA)	0.140	0.170
d(pCpTpGpCpGpTpTpApC)	0.120	0.130
d(pApApTpCpApTpGpGpTpCpApT)	0.013	0.015
d(pCpA) ₅	0.070	0.060
d(pGpA) ₅	0.024	0.015
d(pGpA) ₃	0.400	0.450
d(pGpT) ₆	0.011	0.009

ДНК-дуплексом, не содержит заряженных аминокислотных остатков,³⁹ но имеет восемь высокогидрофобных остатков (Ile760, Phe762, Leu764, Ile765, Tyr766, Met768, Phe771, Leu773).

Это подтверждается и экспериментами с олиготимидилатами, этерифицированными (этилированными) по межнуклеотидным фосфатам, т.е. лишенными отрицательного заряда.²⁶ Константы диссоциации (K_d) для комплекса ДНК-полимеразы α из плаценты человека с октануклеотидом d(Tp)₇T и с этилированным по четырем межнуклеотидным фосфатам октануклеотидом d[Tr(C₂H₅)Tp]₃Tr(C₂H₅)T составляют соответственно 0.4 и 0.33–0.39 мкМ (в зависимости от конфигурации хиральных атомов фосфора). Иными словами, ликвидация четырех зарядов в молекуле олигонуклеотида практически не влияет на его сродство к ферменту. В то же время при полной этерификации октануклеотида d[Tr(C₂H₅)]₇T сродство падает на порядок ($K_d = 2.8$ мкМ).²⁶

Существенно, что приведенная зависимость не экстраполируется к нулю при $n = 0$. Это означает, что с ферментом взаимодействует ортофосфат с $\Delta G^0 = -6.0$ ккал · моль⁻¹. Это было подтверждено также прямыми экспериментами по торможению инактивации фермента реагентом в присутствии ортофосфата. Более того, конкурентным ингибитором инактивации оказался лишенный заряда нейтральный триэтилфосфат ($\Delta G^0 = -4.5$ ккал · моль⁻¹). Возможно, этот факт свидетельствует о роли водородных связей при взаимодействии фосфатного фрагмента с ДНК. На основании совокупности полученных результатов сделан вывод о существенном вкладе только одного межнуклеотидного фосфата в комплексобразование матрицы и ДНК-полимеразы.

При исследовании связывания ДНК-полимеразы в комплекс с праймером в основном в качестве характеристики сродства праймера к комплексу использовали константу Михаэлиса K_m . Предварительно, с использованием аффинной модификации, было показано, что ее величина незначительно отличается от величины константы диссоциации комплекса с праймером. Показано,⁸⁰ что 2',3'-ангидроАТР в присутствии комплекса матрица–праймер–(поли(dT)–олиго(dA)) инактивирует фермент, причем скорость инактивации зависит от концентрации комплекса. Поскольку концентрация комплекса зависит от концентрации праймера, то из зависимости скорости инактивации от концентрации праймера можно рассчитать константу диссоциации комплекса с праймером. Уравнение для расчета (3) было выведено⁸⁰ в предположении, что праймер и 2',3'-ангидроАТР связываются независимо с константами диссоциации соответственно K_Y и K_X , но реакция идет только при одновременном присутствии праймера и реагента.

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{(1 + K_X/X_0)(1 + K_Y/Y_0)}{k}. \quad (3)$$

В качестве примера в табл. 3 приведены значения, полученные для нескольких олигодезоксиаденилатов и ДНК-полимеразы α из плаценты человека. Видно, что различия в величинах констант невелики. Из этого следует, что константой Михаэлиса можно пользоваться в качестве меры сродства праймера. Для фрагмента Кленова совпадение еще лучше. Поэтому основные закономерности взаимодействия ДНК-полимераз с праймером характеризовали с использованием величин K_m .^{78, 81} Преимущественно исследовали систему поли(dA)–олиго(dT). Величины K_m определяли традиционным методом из зависимости скорости реакции удлинения праймера от его концентрации. Зависимость $-\lg K_m$ от длины праймера (числа нуклеотидных остатков n) оказалась линейной вплоть до $n = 9–12$. Было проведено сравнение величин K_m для серии олиготимидилатов этилированных по межнуклеотидным фосфатам. Оказалось, что на сродство праймера к комплексу фермент–матрица существенно влияет наличие заряженной фосфатной группы у 3'-конце-

Таблица 3. Величины K_d и K_m комплексов ДНК-полимеразы α человека и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* с праймерами.

Праймер	ДНК-полимераза α		Фрагмент Кленова	
	K_d , мкМ	K_m , мкМ	K_d , мкМ	K_m , мкМ
d(pA) ₂	70	—	120	—
d(pA) ₅	9	32	30	34
d(pA) ₆	10	20	15	16
d(pA) ₇	1.8	6.5	—	—
d(pA) ₈	1.5	4.7	7	8
d(pA) ₁₀	0.33	0.44	1.2	1.3
d(pA) ₁₂	0.2	0.37	—	—

вого нуклеотидного остатка. Этилирование всех остальных межнуклеотидных фосфатов практически не сказывается на величине K_m . Чрезвычайно существенно наличие на 3'-конце праймера группы ОН. Олигонуклеотид d(pT)₉(ddT), имеющий на 3'-конце остаток 2',3'-дидезокситимидилата, лишенный ОН-группы, является неконкурентным ингибитором по отношению к праймеру. В тех же самых экспериментах с варьированием концентрации матрицы олигонуклеотид d(pT)₉p(ddT) ведет себя как типичный конкурентный ингибитор. Это свидетельствует о его связывании с матричным участком фермента.^{81,82}

Зависимость $-\lg K_m$ от длины праймера экстраполируется к значению ~ 4 при $n = 1$. Из этого следует, что и мононуклеотид может служить праймером для ДНК-полимеразы. Это было показано прямыми экспериментами для ДНК-полимеразы α из плаценты человека с использованием поли(dT) в качестве матрицы, dATP в качестве субстрата и [³H]dAMP в качестве праймера. После разделения реакционной смеси с помощью обращеннофазовой хроматографии обнаружено, что преимущественно образуется динуклеотид d(pA)₂ наряду с некоторым количеством более длинных олигомеров. Существенное преобладание димера над более длинными олигомерами свидетельствует в пользу дистрибутивного характера синтеза. Те же результаты были получены при использовании в качестве праймера [³H]dATP. Фактически это означает, что ДНК-полимеразы могут инициировать синтез ДНК *in vitro*, хотя, как уже указывалось, инициация синтеза ДНК *in vivo* во всех исследованных случаях начинается с синтеза рибоолигонуклеотидного праймера.⁸¹ Полученные результаты говорят в пользу общих закономерностей во взаимодействии ДНК-дуплекса с ДНК-полимеразой про- и эукариот и достаточно хорошо укладываются в неспецифическую, независимую от последовательности модель узнавания ДНК. Действительно, для однокитевых участков важным является вклад гидрофобных взаимодействий оснований, а для ДНК-дуплекса — взаимодействие сахаро-фосфатного остова. Характерно, что число электростатических взаимодействий с ферментом как матричной, так и праймерной цепи ограничено. Данные РСА комплексов фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I,³⁶ ДНК-полимеразы β ³⁸ с ДНК не противоречат выводам об ограниченном числе контактов заряженных аминокислотных остатков с ДНК. Например, в случае ДНК-полимеразы β был обнаружен только один заряженный остаток Arg254. Полагают, что он образует водородную связь с фосфатом вновь введенного в праймер 3'-концевого dNMP.³⁸ Моделирование взаимодействия ДНК-дуплекса с обратной транскриптазой ВИЧ-1, проведенное на основании данных РСА, также выявило только ограниченное число электростатических контактов: один — два остатка лизина в районе связывания 3'-конца праймера и несколько, но не более 5–6, остатков вблизи матрицы.⁶⁸ Это не противоречит представлению об электростатической природе ДНК-связывающего участка ДНК-полимеразы и о наличии существенного электростатического

поля в этом районе.⁸³ Такая структура может быть необходима для первоначальной диффузии ДНК, однако число реально сформированных «сильных» контактов может быть ограниченным для обеспечения «мобильности» ДНК на стадиях транслокации и диссоциации продуктов.

Механизм взаимодействия dNTP с ДНК-полимеразой проанализирован с помощью аффинной модификации ферментов γ -Р-имидазолидами дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов и Р-имидазолидами дезоксинуклеозид-5'-монофосфатов.^{79,84,85} Важно, что использованные реагенты инактивируют ДНК-полимеразы только при одновременном присутствии матрицы и праймера, причем только в случае, если матрица комплементарна основанию реагента. Это свидетельствует о том, что реагенты связываются с участком, в котором происходит отбор субстрата для последующего переноса нуклеотидного остатка на 3'-концевую гидроксильную группу праймера. Количественные оценки связывания нуклеотидов с разным числом фосфатных групп получали из защитных эффектов от инактивации фермента имидазолидом-dTMP в присутствии поли(dA) и олиго(dT)₁₅. Найденные таким способом величины констант диссоциации комплексов dNMP, dNDP, dNTP с ДНК-полимеразой α человека приведены в табл. 4.⁸⁵ Величины K_d для различных dNMP и dNDP близки друг другу. Это указывает на отсутствие заметного вклада β -фосфата в комплексообразование dNTP с ДНК-полимеразой.

Таблица 4. Величины K_d комплексов ДНК-полимеразы α человека с нуклеотидами в присутствии матрицы поли(dA) и праймера d(pT)₁₅.⁸⁴

Основание	K_d (K_i или K_m), мкМ				
	dNMP	dNDP	dNTP	NTP	γ -метиламид dNTP
C	15	11	7(15)	3	—
T	9 (28)	7	0.06(3.1)	0.05	0.03
G	7 (6)	6.0	0.3(0.64)	0.3	—
A	3 (7.8)	—	0.8	0.7	0.3

Сродство dNMP к ферменту возрастает в следующем порядке: dCMP < dTMP < dGMP < dAMP. Корреляция ΔG^0 для связывания dNMP со временем удерживания соответствующих им нуклеозидов на обращеннофазовом сорбенте оказалась линейной. Следовательно, α -фосфатная группа различных dNMP вносит одинаковый вклад в общую эффективность их комплексообразования с ферментом. Различие в сродстве как dNMP, так и dNDP к активному центру ДНК-полимеразы в основном обусловлено разницей в эффективности гидрофобных взаимодействий оснований этих нуклеотидов с ферментом и никак не отражает их комплементарности матрице. В то же время для трифосфатов наблюдается существенно отличающаяся картина. Самым высоким сродством к комплексу фермент–поли(dA)–олиго(dT) обладает dTTP, основание которого комплементарно матрице. Для всех dNTP сродство выше, чем для ди- и монофосфатов. Это позволяет сделать вывод, что для обеспечения комплементарного взаимодействия нуклеотидов с матрицей необходима целостность трифосфатной группировки dNTP.

Аналогичные результаты были получены и для фрагмента Кленова.⁸⁶ Следует, однако, подчеркнуть, что, судя по приведенным выше данным, особенно для dATP и dGTP, целостность трифосфатной группировки существенна и для неспецифического комплексообразования dNTP с ДНК-полимеразой. Вывод о важной роли трифосфатной группировки для узнавания dNTP позднее подтвердился данными РСА, согласно которым каталитический центр ДНК-полимеразы имеет три карбоксильные группы, которые через Mg^{2+} ориентируют трифосфатный фрагмент dNTP.^{37,87}

VI. Химические методы исследования репликативных комплексов

Как уже отмечалось, ферменты, катализирующие процесс репликации, функционируют в составе сложных многосубъединичных структур. Два основных вопроса, которые стоят на сегодняшнем этапе исследований — выявление контактов между полинуклеотидными компонентами и отдельными полипептидами комплекса и выявление контактов между отдельными полипептидами.

В этом плане наиболее изучена реплицирующая ДНК-полимераза *E. coli* — ДНК-полимераза III, которая, по существу, уже представляет собой репликативный комплекс. Он состоит из 10 субъединиц: α , ϵ , β , τ , γ , δ , δ' , χ , ψ и θ .⁸⁸ В ходе выделения фермента обычно наблюдается частичная диссоциация полного комплекса, поэтому объектами изучения являются несколько промежуточных неполных комплексов, получаемых при выделении: комплекс III, состоящий из α , ϵ и θ ; комплекс III', дополнительно содержащий субъединицу τ ; комплекс III*, содержащий все субъединицы, кроме β . Первый комплекс составляет ядро полного фермента ДНК-полимеразы. В его состав входят собственно ДНК-полимераза α , 3',5'-экзонуклеаза ϵ и субъединица с еще неустановленной функцией θ . Этот набор субъединиц обеспечивает две важнейшие функции: посадку комплекса III' на область инициации, содержащую 3'-конец праймера, связанный с матрицей, и последующее продвижение фермента вдоль матрицы без диссоциации комплекса фермента с матрицей.

Для изучения вопроса, с какими субъединицами соединяется ДНК по мере элонгации, были синтезированы и использованы²⁹ праймеры с различным положением фотоактивной группы относительно 3'-конца растущей цепи. Получение серии таких соединений описано в разделе II обзора. Были использованы праймеры с положением фотоактивной арилизидной группы в положениях 3, 9, 13, 18, 22, 27 и 46 относительно 3'-концевого фрагмента. После образования комплекса фермента с матрицей и праймером проводили его облучение. Оно приводило к сшиванию определенного нуклеотидного остатка с ферментом. Исследование субъединиц облученного комплекса показало, что наличие фотоактивной группы в положениях 3 и 9 приводит к мечению α -субъединицы, в положении 13 — α - и γ -субъединиц, в положении 18 — только γ -субъединицы, а в положении 22 — γ - и β -субъединиц. Праймеры с фотоактивной группой в положениях 27 и 46 от 3'-конца праймера ни с какими субъединицами не сшивались. Полагая, что 3'-конец праймера во всех комплексах находится в одном и том же положении относительно фермента, можно интерпретировать полученные результаты как подтверждение перемещения продукта относительно компонентов полного фермента.

Вторая система, подвергнутая достаточно детальному изучению — это ДНК-полимераза в комплексе со вспомогательными белками бактериофага T4. Бактериофаг T4 содержит ~150 генов, в том числе гены, кодирующие белки репликативного комплекса. Их обычно обозначают номерами, соответствующими номеру гена, и обозначают символом gr (gene product). Эффективно работающая система состоит из собственно ДНК-полимеразы gr43 и вспомогательных белков gr44, gr62 и gr45. Кроме того, она требует участия белка, связывающего одностороннюю ДНК (gr32). Вспомогательные белки выполняют функцию зажима. Для образования прочного комплекса между 3'-концом комплекса матрица-праймер и тремя вспомогательными белками существенно присутствие негидролизуемого аналога АТР — АТР γ S, содержащего атом S при γ -атоме Р. Отметим, что ДНК-полимераза с таким комплексом не связывается; для ее связывания необходимо добавление в систему нормального гидролизуемого АТР.⁸⁹

Система изучалась путем определения прямых фотосшивок при облучении мощным лазером с использованием одного или нескольких 8 нс импульсов с мощностью облучения $5-8 \cdot 10^{16}$ фотонов. Наиболее интенсивная пришивка зарегистрирована для белка gr32. При этом (dT)₁₀ пришивается существенно эффективнее, чем (dC)₁₀. Прямая фотосшивка с (dT)₁₀, хотя и менее интенсивная, происходит также с индивидуальными белками gr43 и gr45. При этом практически не наблюдается модификации gr44 и gr62. В то же время в системе, содержащей ансамбль всех трех вспомогательных белков, фотомодификации подвергается только gr62. Отметим, что для его модификации требуется присутствие АТР.⁹⁰

Сильное влияние АТР выявлено также при исследовании, проведенном с использованием комплекса матрица-праймер, содержащего фотоактивный аналог тимидина (NAB-dTTP) в нескольких определенных положениях относительно 3'-конца праймера.⁹¹ Добавление АТР и ДНК-полимеразы приводило к существенным изменениям контактов вспомогательных белков с праймером. Например, связывание белка gr62 с праймером в присутствии остальных вспомогательных белков существенно сильнее в случае добавления АТР γ S, а не АТР. Эти данные позволяют предполагать, что при добавлении АТР в результате его гидролиза происходит конформационный переход, либо существенно перемещающий gr62 относительно праймера, либо совсем вытесняющий этот белок.

Для эукариотических систем наиболее изучен фрагмент репликативного комплекса, состоящий из ДНК-полимеразы α и праймазы. Каждый из этих ферментов содержит две субъединицы. Они легко могут быть получены в виде единого комплекса, состоящего из четырех субъединиц — 180 кДа (собственно ДНК-полимераза, иногда в виде полученной в результате частичного протеолиза субъединицы 165 кДа), 72 кДа (функция неизвестна), 60 и 50 кДа (γ - и δ -субъединицы праймазы). При прямой фотосшивке [α -³²P]АТР с комплексом из дрожжей метка обнаружена только в δ -субъединице.⁹² Модификация комплекса *P*-*n*-формилфениловым эфиром аденозинтрифосфата с последующим проявлением точек модификации каталитически компетентным мечением привела к появлению радиоактивности в обеих субъединицах. При модификации аналогичного комплекса из плаценты человека *P*-формилфениловыми эфирами аденилатов с последующим введением радиоактивной метки с помощью [α -³²P]АТР показано, что в присутствии поли(dT) эфир АТР присоединяется только по δ -субъединице, а в отсутствие поли(dT) — по обеим субъединицам праймазы.⁹³

Для изучения комплекса ДНК-полимераза-праймаза из плаценты человека был также использован дуплекс матрица-праймер (соответственно 25 звеньев и 10 звеньев), элонгированный с помощью FAV-dCTP. При этом оказалось, что фотоприсоединение праймера происходит не только к субъединице 165 кДа ДНК-полимеразы, но и к субъединицам праймазы. Однако мечения полипептида с молекулярной массой 72 кДа не наблюдается. При фотоприсоединении FAV-dCTP к комплексу с последующим присоединением праймера (каталитически компетентное мечение) наблюдалась модификация только субъединицы ДНК-полимеразы (165 кДа) и малой субъединицы праймазы (50 кДа).²¹ Сходные результаты получены и для комплекса ДНК-полимераза-праймаза из тимуса теленка. Однако в последнем случае при использовании каталитически компетентного мечения вообще не наблюдалось мечения субъединиц праймазы.²³ Эти данные позволяют считать, что с помощью фотоаффинной модификации можно получать сведения о роли различных субъединиц комплекса в формировании активных структур и о переключении комплекса в ходе его функционирования с работы в качестве

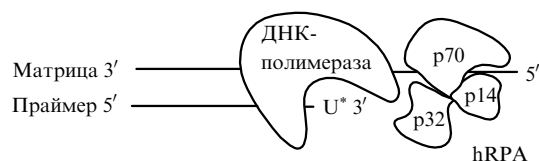


Рис. 6. Взаимодействие эукариотического фактора репликации (hRPA) с ДНК-дуплексом, содержащим фотоактивный остаток dNMP(U*), введенный ДНК-полимеразой в 3'-конец праймера; p70, p32, p14 — субъединицы RPA.

праймазы на работу по элонгации вновь синтезируемой ДНК.²¹

Метод фотоаффинной модификации был также применен для изучения взаимодействия ДНК с эукариотическим фактором репликации RPA. Этот белок состоит из трех субъединиц с молекулярными массами 70, 32 и 14 кДа. Функции RPA состоят в стабилизации конфигурации денатурированной ДНК и организации специфических контактов ДНК с другими белками, участвующими в репликации, репарации и рекомбинации ДНК.⁹⁴ Чтобы изучить взаимодействие субъединиц RPA с ДНК-дуплексом, имеющим протяженную матричную цепь, фотоактивную группу вводили в 3'-конец радиоактивно меченного праймера с помощью ДНК-полимеразы α , а также ДНК-полимеразы β с использованием в качестве субстрата 5-[N-(2-нитро-5-азидобензоил)]-дезоксигуанидин-5'-трифосфата.⁹⁵ При УФ-облучении наиболее интенсивному мечению подвергались субъединицы p32 и p70. Малая субъединица p14 при этом не модифицировалась. На основании полученных данных предложена модель взаимодействия субъединиц RPA с ДНК-дуплексом, показанная на рис. 6. Предполагается, что субъединица p70 взаимодействует с однонитевым участком ДНК-дуплекса, субъединица p32 расположена вблизи 3'-конца праймера, а субъединица p14 удалена от 3'-конца. Предложенный подход весьма продуктивен для изучения характера взаимодействия ДНК с другими факторами репликации, такими как PCNA, RFC, а также для изучения формирования всего репликативного ансамбля в ходе синтеза ДНК.

VII. Заключение

Химические подходы к исследованию механизма действия ферментов не ограничиваются использованием методов химической модификации для изучения матричного биосинтеза ДНК. Широкое применение в энзимологии находят разнообразные аналоги субстратов, получаемые по большей части химическим путем. Применительно к ДНК-полимеразам этот подход активно развивается в работах Краевского^{96,97}.

Приведенные в обзоре данные показывают, что использование химической, в особенности аффинной, модификации, как подхода к установлению природы активных центров ДНК-полимераз, является, несомненно, полезным. Однако получаемые при этом результаты необходимо анализировать вместе с данными РСА. Не менее важно рассмотрение этих данных совместно с результатами, получаемыми с помощью сайт-направленного мутагенеза. В настоящее время для исследования этой проблемы все чаще привлекают методы компьютерного моделирования, что позволяет более глубоко осмыслить информацию, получаемую экспериментальными методами.

Процессы, катализируемые ДНК-полимеразами, характеризуются высокой динамичностью. Стадия отбора мономера, на которой перед осуществлением нуклеотидилтрансферазной реакции проводится проверка мономера на комплементарность кодирующему элементу матрицы, ста-

дия транслокации, в ходе которой комплекс матрица–продукт элонгации перемещается относительно активного центра фермента, и стадия коррекции с помощью 3' → 5'-экзонуклеазы, на которой, по-видимому, происходит существенное перемещение 3'-конца синтезируемой цепи из полимеразного в экзонуклеазный центр, происходят в миллисекундном диапазоне. Одним из немногих возможных способов проследить за такими быстротекущими изменениями областей контакта фермента, матрицы и продукта является быстрое фотохимическое мечение фермента фотоактивными аналогами субстрата или праймера. Его можно осуществить за миллисекунды, используя импульсное облучение. Хотя такого рода эксперименты еще только начинают зарождаться, для их осуществления уже создана основательная химическая база в виде фотоактивных аналогов dNTP и методов введения фотоактивных нуклеотидных остатков в определенные участки праймера.

Важным и многообещающим результатом последних исследований является появление новых вариантов каталитически компетентного мечения ферментов с помощью производных dNTP, содержащих реакционноспособную группу в гетероциклическом основании. Такие производные сохраняют в ковалентно связанном с ферментом состоянии трифосфатный фрагмент и в ряде исследованных случаев способны выступать донорами нуклеотидного остатка. Это открывает интересные возможности для исследования механизма катализируемого ферментом нуклеотидилтрансферазного акта. Перспективными представляются также работы по изучению процесса элонгации ковалентно фиксированных на ферменте праймеров. Поскольку, несмотря на ограничение подвижности праймера, в такой системе сохраняется возможность протекания нескольких актов элонгации, а следовательно, и нескольких актов транслокации, можно рассчитывать на создание удобной модели для изучения механизма транслокации.

Специфической особенностью исследования полимераз нуклеиновых кислот методом химической модификации является одновременное присутствие в системе одно- и двунитевых нуклеиновых кислот и исследуемого белка (или группы белков). Как уже отмечалось, в случае праймеров, несущих связанную с гетероциклическим основанием азидоперфторбензоильную группу, зарегистрированы параллельно протекающие процессы модификации фермента и матрицы.^{14,21} В некоторых случаях это может затруднять интерпретацию данных по аффинной модификации белка, например, при невозможности расхождения цепей ДНК или при связывании двух или более фотоактивных групп праймера одновременно и с матрицей, и с ферментом с образованием трудно идентифицируемых продуктов. Поэтому реагенты, избирательно модифицирующие белки без параллельного сшивания праймера с матрицей, могут оказаться более предпочтительными. По данным работы¹⁵ таким реагентом может быть праймер, содержащий остатки NAB-dUMP. Исследование на модельной системе, в которой остаток аминокислоты и фотоактивная группа (азидо-перфторбензоильная, 5-азидо-2-нитробензоильная или *n*-азидоанилидная) искусственно сближены путем присоединения соответственно к 3'- и 5'-концевым фосфатам комплементарных олигонуклеотидов, показали, что только в первом случае сшивание происходит и при отсутствии на 3'-конце аминокислотного остатка.⁹⁸ Таким образом, из рассмотренных арилазидов для модификации белков предпочтительны производные с 5-азидо-2-нитробензоильной или *n*-азидоанилидной группами.

Химические подходы, в первую очередь ковалентное связывание реакционноспособных комплексов матрица–праймер с реакционноспособными фрагментами в определенных точках этих комплексов, незаменимы для изучения как РНК-полимераз и транскрипционных комплексов, так и репликативных комплексов, в частности для

выявления взаимного расположения отдельных компонентов комплексов (например, в случае эукариот собственно ДНК-полимеразы и вспомогательных белков, таких как SSB, PCNA, RFC) и их перемещения относительно комплекса матрица – праймер в ходе процесса элонгации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 96–04–50114).

Литература

- Д.Г.Кнорре, Н.В.Кудряшова, О.И.Лаврик. *Успехи химии*, **66**, 401 (1997)
- Д.Г.Кнорре, С.Д.Мызина. *Биологическая химия*. Высш. шк., Москва, 1992
- J.Kuriyan, M.O'Donnell. *J. Mol. Biol.*, **234**, 915 (1993)
- Г.А.Невинский, О.И.Лаврик. В кн. *Биоорганическая химия. Т.13. (Итоги науки и техники)*. Изд-во ВИНТИ, Москва, 1988. С.4
- М.А.Грачев, Д.Г.Кнорре, О.И.Лаврик. В кн. *Успехи биологической химии. Т.27*. Наука, Москва, 1986. С.30
- В.Н.Бунева, Т.В.Демидова, Д.Г.Кнорре, Н.В.Кудряшова, А.Г.Ромашенко, М.Г.Старообразова. *Молекуляр. биология*, **14**, 1080 (1980)
- В.Н.Бунева, Н.В.Кудряшова, Л.Т.Небрат, А.Г.Ромашенко, Т.А.Чимитова, Л.Ф.Юшкова. *Докл. АН СССР*, **268**, 243 (1983)
- Г.А.Невинский, С.В.Доронин, О.И.Лаврик. *Биополимеры и клетка*, **1**, 247 (1985)
- С.В.Доронин, Г.А.Невинский, В.В.Хомов, О.И.Лаврик. *Молекуляр. биология*, **25**, 358 (1991)
- Н.В.Кудряшова, М.Ю.Шаманина, Т.С.Годовикова, Е.А.Ананько, Ф.Ф.Ахмадиева, А.Г.Ромашенко. *Биохимия*, **58**, 224 (1993)
- W.A.Wlasoff, M.I.Dobrikov, I.V.Safronov, R.Y.Dudko, V.S.Bogachev, V.V.Kandaurova, G.V.Shishkin, G.M.Dymshits, O.I.Lavrik. *Bioconjug. Chem.*, **6**, 352 (1995)
- O.I.Lavrik, R.Prasad, W.A.Beard, I.V.Safronov, M.I.Dobrikov, D.K.Srivastava, G.V.Shishkin, T.G.Wood, S.H.Wilson. *J. Biol. Chem.*, **271**, 21891 (1996)
- М.И.Добриков, С.В.Доронин, И.В.Сафронов, Г.В.Шишкин, О.И.Лаврик. *Химия в интересах устойчивого развития*, **2**, 529 (1994)
- S.V.Doronin, M.I.Dobrikov, M.Buckle, P.Roux, H.Buc, O.I.Lavrik. *FEBS Lett.*, **354**, 200 (1994)
- Н.В.Щербик, С.Н.Ходырева, В.А.Власов, М.И.Добриков, Г.М.Дымшиц, О.И.Лаврик. *Молекуляр. биология*, **31**, 344 (1997)
- И.В.Сафронов, Н.В.Щербик, С.Н.Ходырева, В.А.Власов, М.И.Добриков, Г.В.Шишкин, О.И.Лаврик. *Биоорг. химия*, **23**, 576 (1997)
- J.Rush, W.H.Konigsberg. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4821 (1990)
- B.M.Moore II, R.K.Jalluri, M.B.Doughty. *Biochemistry*, **35**, 11642 (1996)
- B.M.Moore II, K.Li, M.B.Doughty. *Biochemistry*, **35**, 11634 (1996)
- T.Yamaguchi, M.Saneyoshi. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 3364 (1996)
- S.V.Doronin, M.I.Dobrikov, O.I.Lavrik. *FEBS Lett.*, **313**, 31 (1992)
- T.S.Godovikova, D.M.Kolpashchikov, T.N.Orlova, V.A.Richter. *FASEB J.*, **11**, 1367 (1997)
- I.A.Potapova, S.N.Khodyreva, O.V.Vladimirova, T.V.Safronov, M.I.Dobrikov, W.A.Wlasoff, G.V.Shishkin, O.I.Lavrik. *Bioconjug. Chem.*, (1998) (in the press)
- R.K.Evans, J.D.Johnson, B.E.Haley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5382 (1986)
- C.E.Catalano, S.J.Benkovic. *Biochemistry*, **28**, 4374 (1989)
- Г.А.Невинский, А.С.Левина, В.Н.Подуст, О.И.Лаврик. *Биоорг. химия*, **13**, 58 (1987)
- T.I.Kolochova, G.A.Nevinsky, V.A.Volchkova, A.S.Levina, V.V.Khomov, O.I.Lavrik. *FEBS Lett.*, **248**, 97 (1989)
- T.I.Kolochova, G.A.Nevinsky, A.S.Levina, V.V.Khomov, O.I.Lavrik. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **9**, 169 (1991)
- J.A.Reems, S.Wood, C.S.McHenry. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5606 (1995)
- C.R.Guest, R.A.Hochstrasser, C.G.Dupuy, D.J.Allen, S.J.Benkovic, D.P.Millar. *Biochemistry*, **30**, 8759 (1991)
- N.F.Insdorf, D.F.Bogenhagen. *J. Biol. Chem.*, **264**, 21491 (1989)
- R.A.Bambara, C.B.Jessee. *Biochim. Biophys. Acta*, **1088**, 11 (1991)
- C.M.Joyce, T.A.Steitz. *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 288 (1987)
- H.Klenow, I.Henningsen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **65**, 168 (1970)
- L.S.Beese, J.M.Friedman, T.A.Steitz. *Biochemistry*, **32**, 14095 (1993)
- L.S.Beese, V.Derbyshire, T.A.Steitz. *Science*, **260**, 352 (1993)
- M.R.Sawaya, H.Pelletier, A.Kumar, S.H.Wilson, J.Kraut. *Science*, **264**, 1930 (1994)
- H.Pelletier, M.R.Sawaya, A.Kumar, S.H.Wilson, J.Kraut. *Science*, **264**, 1891 (1994)
- V.N.Pandey, N.Kaushik, M.J.Modak. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21828 (1994)
- V.N.Pandey, K.R.Williams, K.L.Stone, M.J.Modak. *Biochemistry*, **26**, 7744 (1987)
- C.E.Catalano, D.J.Allen, S.J.Benkovic. *Biochemistry*, **29**, 3612 (1990)
- О.И.Лаврик, Г.А.Невинский, И.А.Потапова, В.В.Хомов. *Молекуляр. биология*, **22**, 485 (1988)
- A.Basu, M.J.Modak. *Biochemistry*, **26**, 1704 (1987)
- V.N.Pandey, M.J.Modak. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6068 (1988)
- D.G.Knorre, V.N.Buneva, G.I.Baram, T.S.Godovikova, V.F.Zarytova. *FEBS Lett.*, **194**, 64 (1986)
- Ю.Н.Воробьев. *Биоорг. химия*, **17**, 211 (1991)
- P.M.Mohan, A.Basu, S.Basu, K.I.Abraham, M.J.Modak. *Biochemistry*, **27**, 226 (1988)
- M.Cowart, K.J.Gibson, D.J.Allen, S.J.Benkovic. *Biochemistry*, **28**, 1975 (1989)
- D.J.Allen, S.J.Benkovic. *Biochemistry*, **28**, 9586 (1989)
- D.K.Srivastava, R.K.Evans, A.Kumar, W.A.Beard, S.H.Wilson. *Biochemistry*, **35**, 3728 (1996)
- F.di Marzo Veronese, T.D.Copeland, A.L.DeVico, R.Rahman, S.Oroszlan, R.C.Gallo, M.G.Sarnadharan. *Science*, **231**, 1289 (1986)
- J.Hansen, T.Schulze, K.Moelling. *J. Biol. Chem.*, **262**, 12393 (1987)
- J.Hansen, T.Schulze, W.Mellert, K.Moelling. *Embo J.*, **7**, 239 (1988)
- L.Ratner, W.Haseltine, R.Patarca, K.J.Livak, B.Starcich, S.F.Josephs, E.R.Doran, J.A.Rafalski, E.A.Whitehorn, K.Baumeister, L.Ivanoff, S.R.Pettewing, M.K.Pearson, J.A.Lautenberger, T.S.Papas, J.Ghrayeb, N.I.Chong, R.C.Gallo, F.Wong-Staal. *Nature (London)*, **313**, 277 (1985)
- S.P.Becerra, G.M.Clore, A.M.Gronenborn, A.R.Karlstrom, S.J.Stahl, S.H.Wilson, P.T.Wingfield. *FEBS Lett.*, **270**, 76 (1990)
- L.A.Kohlstaedt, J.Wang, J.M.Friedman, P.A.Rice, T.A.Steitz. *Science*, **256**, 1783 (1992)
- A.Jacobo-Molina, J.Ding, R.G.Nanni, A.D.Clark Jr., X.Lu, C.Tantillo, R.L.Williams, G.Kamer, A.L.Ferris, P.Clark, A.Hizi, S.H.Hughes, E.Arnold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6320 (1993)
- W.Metzger, T.Hermann, O.Schatz, S.F.Le Grice, H.Heumann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5909 (1993)
- B.M.Wohrl, C.Tantillo, E.Arnold, S.F.Le Grice. *Biochemistry*, **34**, 5343 (1995)
- C.Barat, V.Lullien, O.Schatz, G.Keith, M.T.Nugeyre, F.Gruninger-Leitch, F.Barre-Sinoussi, S.F.Le Grice, J.L.Darlix. *Embo J.*, **8**, 3279 (1989)
- C.Barat, S.F.Le Grice, J.L.Darlix. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 751 (1991)
- Y.Mishima, J.A.Steitz. *Embo J.*, **14**, 2679 (1995)
- C.Isel, C.Ehresmann, G.Keith, B.Ehresmann, R.Marquet. *J. Mol. Biol.*, **247**, 236 (1995)
- N.Cheng, B.M.Merrill, G.R.Painter, L.W.Frick, P.A.Furman. *Biochemistry*, **32**, 7630 (1993)
- N.Sheng, D.Dennis. *Biochemistry*, **32**, 4938 (1993)
- J.A.Peliska, S.J.Benkovic. *Science*, **258**, 1112 (1992)
- S.N.Khodyreva, A.S.Levina, M.I.Dobrikov, A.A.Koshkin, O.I.Lavrik, M.Ricchetti, P.Roux, H.Buc. *Eur. J. Biochem.*, (1998) (in the press)
- T.Hermann, T.Meier, M.Gotte, H.Heumann. *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4625 (1994)
- A.Arava, E.Havia, S.Litvak. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4009 (1980)
- L.L.W.Mitchell, B.S.Cooperman. *Biochemistry*, **31**, 7707 (1992)
- A.Basu, K.K.Ahluwalia, S.Basu, M.J.Modak. *Biochemistry*, **31**, 616 (1992)

72. R.W.Sobol, R.J.Suhadolnik, A.Kumar, B.J.Lee, D.L.Hatfield, S.H.Wilson. *Biochemistry*, **30**, 10623 (1991)
73. M.A.Grachev, T.I.Kolocheva, E.A.Lukhtanov, A.A.Mustaev. *Eur. J. Biochem.*, **163**, 113 (1987)
74. R.L.Mitina, A.A.Mustaev, E.F.Zaychikov, V.V.Khomov, O.I.Lavrik. *FEBS Lett.*, **272**, 181 (1990)
75. T.A.Steitz, S.J.Smerdon, J.Jager, C.M.Joyce. *Science*, **266**, 2022 (1994)
76. A.A.Mustaev, G.N.Godson. *J. Biol. Chem.*, **270**, 15711 (1995)
77. *Аффинная модификация биополимеров.* (Под ред. Д.Г.Кнорре). Наука, Новосибирск, 1983
78. О.И.Лаврик, Г.А.Невинский. *Биохимия*, **54**, 757 (1989)
79. D.G.Knorre, O.I.Lavrik, G.A.Nevinsky. *Biochimie*, **70**, 655 (1988)
80. V.N.Podust, T.O.Korobeinicheva, G.A.Nevinsky, A.S.Levina, O.I.Lavrik. *Mol. Biol. Rep.*, **14**, 247 (1990)
81. G.A.Nevinsky, A.G.Veniaminova, A.S.Levina, V.N.Podust, O.I.Lavrik. *Biochemistry*, **29**, 1200 (1990)
82. I.Sh.Bukhrashvili, D.Z.Chinchaladze, O.I.Lavrik, A.S.Levina, G.A.Nevinsky, D.A.Prangishvili. *Biochim. Biophys. Acta*, **1008**, 102 (1989)
83. P.N.Yadav, J.S.Yadav, E.Arnold, M.J.Modak. *J. Biol. Chem.*, **269**, 716 (1994)
84. S.V.Doronin, O.I.Lavrik, G.A.Nevinsky, V.N.Podust. *FEBS Lett.*, **216**, 221 (1987)
85. Г.А.Невинский, С.В.Доронин, В.Н.Подуст, О.И.Лаврик. *Молекуляр. биология*, **21**, 1070 (1987)
86. S.V.Doronin, G.A.Nevinsky, T.O.Malygina, V.N.Podust, V.V.Khomov, O.I.Lavrik. *FEBS Lett.*, **259**, 83 (1989)
87. H.Pelletier, M.R.Sawaya, W.Wolfe, S.H.Wilson, J.Kraut. *Biochemistry*, **35**, 12762 (1996)
88. C.S.McHenry. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19127 (1991)
89. M.C.Young, M.K.Reddy, P.H.Von Hippel. *Biochemistry*, **31**, 8675 (1992)
90. J.W.Hockensmith, W.L.Kubasek, T.A.Cross, M.K.Dolejsi, W.R.Vorachek, P.H.Von Hippel. In *Proceedings of UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. DNA Replication and Recombination. Vol.47.* (Eds R.McMacken, T.J.Kelly). Alan R.Liss, New York, 1987. P.111
91. T.L.Capson, S.J.Benkovic, N.G.Nossal. *Cell*, **65**, 249 (1991)
92. M.Foiani, A.J.Lindner, G.R.Hartmann, G.Lucchini, P.Plevani. *J. Biol. Chem.*, **264**, 2189 (1989)
93. O.D.Zakharova, V.N.Podust, A.A.Mustayev, R.O.Anarbaev, O.I.Lavrik. *Biochimie*, **77**, 699 (1995)
94. M.S.Wold. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 61(1997)
95. O.I.Lavrik, H.P.Nasheuer, K.Weisshart, M.S.Wold, R.Prasad, W.A.Beard, S.H.Wilson, A.Favre. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 602 (1999)
96. А.А.Краевский. *Молекуляр. биология*, **26**, 725 (1992)
97. A.A.Kraevsky, K.A.Watanabe. *Nucleosides Nucleotides*, **12**, 649 (1993)
98. Т.С.Годовикова, М.В.Березовский, Д.Г.Кнорре. *Биоорг. химия*, **21**, 858 (1995)

CHEMICAL APPROACHES TO INVESTIGATION OF TEMPLATE BIOSYNTHESIS: STUDY OF REPLICATION AND REVERSED TRANSCRIPTION

D.G.Knorre, N.V.Kudryashova, O.I.Lavrik

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
8, Prosp. Akad. Lavrent'eva, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)235-1665*

The chemical approaches to the study of the DNA template biosynthesis by DNA polymerases and reversed transcriptases are considered with the main emphasis on *E. coli* DNA polymerase I and HIV-1 reversed transcriptase. Special attention is paid to the comparison of the chemical modification, X-ray analysis data, as well as to the quantitative aspects of the DNA polymerases interactions with templates, primers and nucleoside-5'-phosphates. New versions of the catalytically competent labelling developed in the course of investigation of these enzymes are described. The results of application of the primer analogues with photoreactive groups to the study of the replication complexes are presented.

Bibliography — 98 references.

Received 26th September 1997