



УДК 577.152.277'135

НОВЫЙ ТЕРМИНАТОР БИОСИНТЕЗА ДНК — ВОЗМОЖНЫЙ
КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛОГ СУБСТРАТА
В ДНК-СИНТЕЗИРУЮЩЕМ КОМПЛЕКСЕ

Дяткина И. Б., фон Янта-Липински М.*, Минаян Ш. Х.,
Куханова М. К., Краевский А. А., Чиджавадзе З. Г.**,
Библашвили Р. Ш.**

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

* Центральный институт молекулярной биологии Академии наук ГДР, Берлин — Бух;

** Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ
Академии медицинских наук СССР, Москва

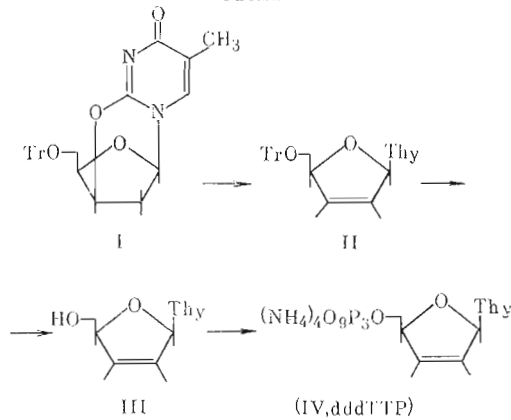
Показано, что 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидротимидин-5'-трифосфат (dddTTP) проявляет свойства терминаторного субстрата при синтезе ДНК, катализируемом ДНК-полимеразой I (фрагментом Кленова) из *E. coli*, ДНК-полимеразой β из печени крысы, концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой из тимуса теленка и обратной транскриптазой из вируса птичьего миелобластоза, но не влияет на синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой α из тимуса теленка. В случае ДНК-полимеразы I dddTTP примерно на порядок превосходит по эффективности лучшие известные терминаторные субстраты. Предполагается, что dddTTP по конформации своей углеводной части модифицирует конформацию углеводной части субстрата при связывании последнего с комплексом [ДНК-полимераза + матрица-праймер].

В 1985 г. методом ПМР было показано, что в комплексе [ДНК-полимераза + dNTP], где dNTP — dATP или dTTP, субстраты принимают уникальную конформацию; дезоксирибозильный остаток в них имеет O1'-эндо-конформацию, а атомы C1', C2', C3' и C4' лежат в одной плоскости [1]. Однако не было понятно, насколько это отвечает конформации dNTP в полном синтезирующем ДНК-комплексе [ДНК-полимераза I + матрица-праймер + dNTP], так как известно, что комплекс [ДНК-полимераза I + dNTP] при связывании матрицы-праймера теряет dNTP и лишь после образования комплекса [ДНК-полимераза I + матрица-праймер] повторно связывает dNTP в компетентное для реакции полимеризации состояние [2]. Поэтому можно было представить, что изученная в работе [1] конформация dNTP в комплексе [фермент + dNTP] может не отражать конформацию субстрата в продуктивном комплексе.

С целью дальнейшего изучения этого вопроса мы синтезировали dddTTP и изучили его свойства как субстратного терминатора в реакции синтеза ДНК, катализируемого пятью разными ДНК-полимеразами. Под термином «субстратный терминатор» имеется в виду соединение, которое специфически по отношению к природе основания в матрице реагирует с праймером в синтезирующем ДНК-комплексе, но после включения в 3'-конец праймера прерывает элонгацию цепи ДНК. Ранее было известно, что dddTTP подавляет синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой I из *E. coli*, хотя молекулярный механизм этого процесса изучен не был [3]. В 1986 г., когда настоящая работа была в стадии написания, появилось сообщение, что 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидротимидин подавляет размножение вируса иммунодефицита человека HIV (HTLV-III/LAV)

Сокращения: dNTP — 2-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты с природными нуклеиновыми основаниями (A, G, T, C); dNTP(3'F) — 3'-фтор-2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты; dNTP(3'N₃) — 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты; dNTP(3'NH₂) — 3'-амино-2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты; ddNTP — 2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты; dNTP(3'OSCH₃) — 3'-О-метил-dNTP; dNTP(3'NHAc) и dNTP(3'NH₂) — 3'-ацетиламино- и 3'-биотиниламино-2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты; aNTP(3'N₃) и aNTP(3'NH₂) — 3'-азидо- и 3'-амино-3'-дезоксарбинонуклеозид-5'-трифосфаты; dddTTP — 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидротимидин-5'-трифосфат.

Схема 1



Синтез 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидротимидин-5'-фосфата

Схема 2

Последовательность нуклеотидов в новосинтезированной цепи ДНК при использовании 17- (а) и 14-членного праймера (б)

	11	21	31	41
а) GCCAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGCCGAGCTCGA				
51	61	71		
ATTCTGAATCATGGTCATAGCTGTTTCGTG				
б) TGTA AACG CAGGCCAGTGC	11	21	31	41
CAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGG				

в культурах клеток, действуя, по-видимому, на стадии обратной транскрипции [4].

Особенностью dddTTP является то, что в остатке 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидрорифофуранозы все четыре атома углерода лежат в одной плоскости, что определяется свойствами двойной связи, и только эндциклический кислород выходит из плоскости. Поэтому изучение его в системах с ДНК-полимеразами представляло интерес с точки зрения возможности конформационного анализа активного центра ДНК-полимераз.

Ранее 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидротимидин был получен обработкой 5'-О-тритил-2',3'-ангидроксилотимидина *трет*-бутилатом калия в DMSO с последующим удалением тритильной группы [5]. В другом способе 3'-гидроксильная группа в 5'-О-тритилтимидине была замещена на иод и после детритилирования, последующего 5'-трифосфорилирования и отщепления HI с невысоким общим выходом получили dddTTP [6].

Нами 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидротимидин (III) синтезирован из 5'-О-тритил-2',3'-ангидроксилотимидина (I) по методу [5] с небольшой модификацией (схема 1). Структура (III) доказана ПМР-, ИК- и масс-спектрами, а также гидрированием в 2',3'-дидезокситимидин. Далее соединение (III) превратили в трифосфат dddTTP (IV); суммарный выход (считая на (I)) 45%.

Присутствие трифосфатного остатка в соединении (IV) доказано сравнением его подвижности при ТСХ и времени удерживания при ВЭЖХ с dTTP, а также включением остатка 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидротимидин-5'-фосфата в 3'-конец ДНК, катализируемым ДНК-полимеразами.

Проведено изучение свойств dddTTP в системах с пятью ДНК-полимеразами: ДНК-полимеразой I (фрагментом Кленова) из *E. coli*, ДНК-полимеразой α из тимуса телянка, ДНК-полимеразой β из печени крыс, обратной транскриптазой, кодируемой вирусом мнелобластоа птиц, и концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой из тимуса телянка. Система испытаний включала элонгацию синтетических праймеров на ДНК фага M13mp10 в качестве матрицы, катализируемую одной из ДНК-полимераз в присут-

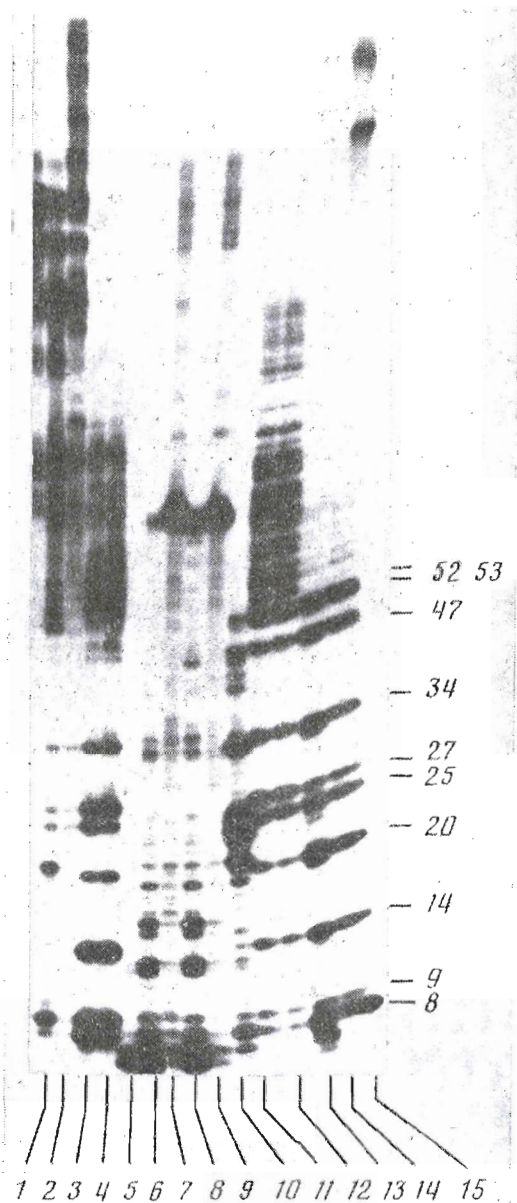


Рис. 1. Синтез ДНК в присутствии 5'-[³²P]-17-членного праймера d(GTAAAACGACG·GCCAGT), катализируемый обратной транскриптазой (1-5), ДНК-полимеразой α (6-10) и ДНК-полимеразой I (Фрагмент Кленова) (11-15). Условия опыта с обратной транскриптазой: пробы в объеме 10 мкл содержали 0,1 мкг ДНК фага M13mp10, 6 ед. акт. фермента, четыре dNTP (10 мкМ каждый). Инкубировали 2 мин при 42° С (1), затем добавляли терминаторный субстрат до конечной концентрации 0,5 мМ, инкубировали еще 60 мин при 42° С (2, 4) и, наконец, инкубировали третий раз, добавляя четыре dNTP до конечной концентрации каждого 250 мкМ и еще 6 ед. акт. фермента (3, 5). Условия опыта с ДНК-полимеразой α: пробы в объеме 10 мкл содержали 0,1 мкг ДНК фага M13mp10, 2 ед. акт. фермента, четыре dNTP (каждый 10 мкМ). Инкубировали 1 мин при 37° С (6), вносили терминаторный субстрат до конечной концентрации 0,5 мМ, инкубировали 60 мин при 37° С (7, 9) и затем инкубировали третий раз 60 мин при 37° С с 250 мкМ dNTP и дополнительно 2 ед. акт. фермента (8, 10). Условия опыта с ДНК-полимеразой I: в пробу вносили по 3 ед. акт. фермента и по 1 мкМ dNTP, инкубировали 10 с при 37° С (11), затем добавляли терминаторный субстрат до 500 мкМ, инкубировали 20 мин при 37° С (12, 14) и, наконец, инкубировали третий раз, внося dNTP до концентрации каждого 250 мкМ при 37° С (13, 15). Добавленные терминаторные субстраты: dUTP(3'ОСН₃) (2, 3, 7, 8), dTTP(3'F) (12, 13), dddTTP (4, 5, 9, 10, 14, 15). Здесь и далее справа указаны номера модифицированных тимидиновых остатков в ново- синтезированной ДНК. Смеси анализировали электрофорезом в 10% ПААГ

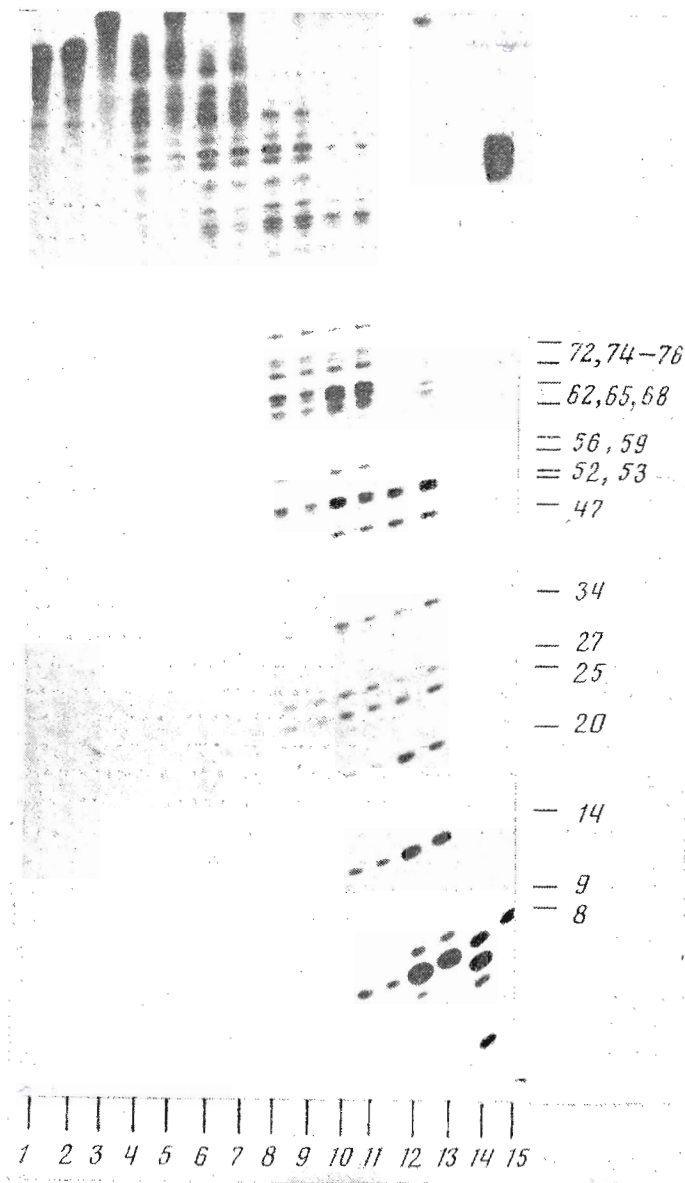


Рис. 2. Концентрационная зависимость терминации синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой I (фрагмент Клевова) в присутствии dddTTP на 5'-[³²P]-17-членном праймере. Пробы в объеме 10 мкл содержали 0,1 мкг ДНК фага M13mp10, 3 ед. акт. фермента, четыре dNTP (каждый 1 мкМ). Смесь инкубировали 20 с при 37° С (1), вносили dddTTP до конечной концентрации, мкМ: 1 (2, 3), 10 (4, 5), 20 (6, 7), 50 (8, 9), 100 (10, 11), 200 (12, 13), 500 (14, 15)

ствии четырех dNTP и dddTTP по ранее описанной методике [7]. После проведения реакции терминаторные свойства dddTTP выявляли с помощью гель-электрофореза по набору фрагментов новосинтезированной ДНК, оканчивающихся остатком Т, точнее, модифицированным нуклеозидом, занимающим в 3'-конце цепи место тимидина.

На рис. 1 приведены результаты испытаний dddTTP при элонгации ДНК тремя ДНК-полимеразами. Структура новосинтезированного фрагмента ДНК показана на схеме 2а. Как видно из треков 4-5, наблюдается терминация синтеза ДНК при катализе процесса обратной транскриптазой, причем эффективность терминации значительно выше, чем в контрольных треках, где использовали dUTP(3'ОСН₃) (треки 2-3) [8]. Большая эффективность терминации синтеза ДНК в присутствии dddTTP проявляется в наборе более коротких фрагментов ДНК (фрагменты, оканчи-

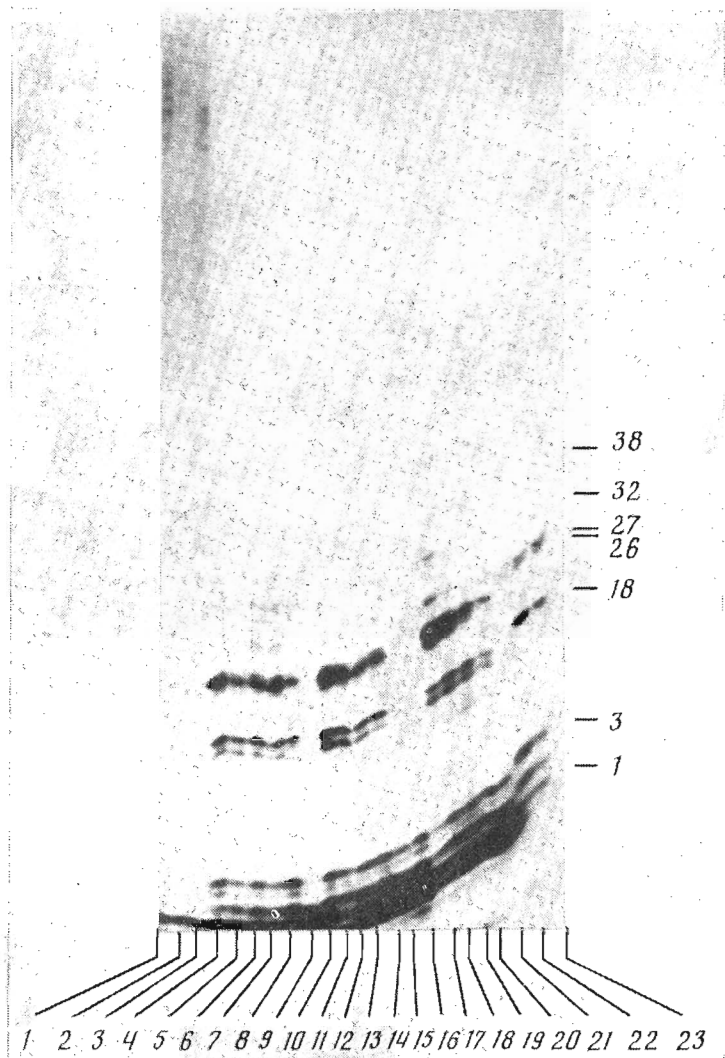
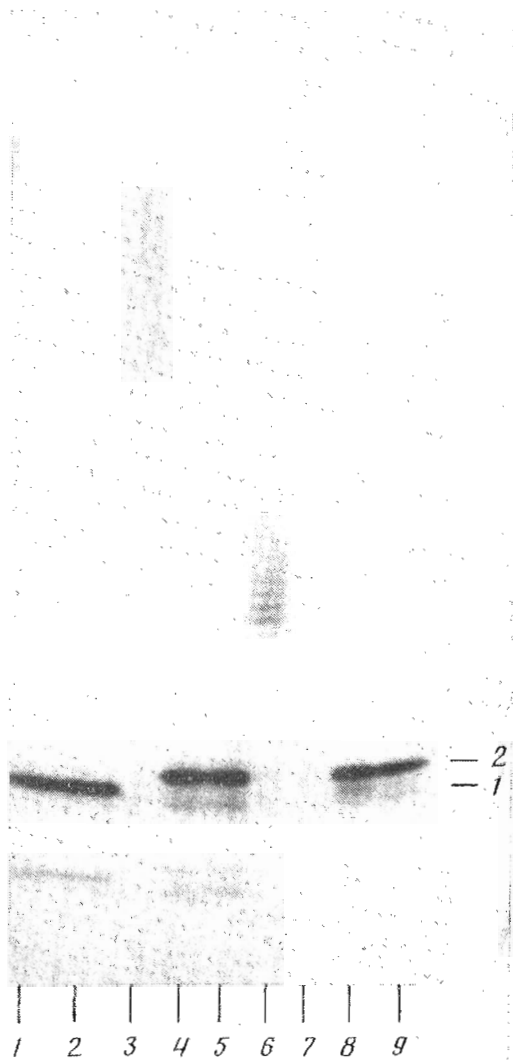


Рис. 3. Синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой β , в присутствии 5'-[^{32}P]-14-членного праймера d(CCCAGTCACGACGT). Пробы в объеме 5 мкл содержали 10 нг ДНК фага M13mp10, 2 ед. акт. фермента, четыре dNTP (каждый 40 мкМ). Инкубировали при 37° С 15 мин (1), 30 мин (2) и 1 ч (3). Далее вносили dddTTP, инкубировали дополнительно в присутствии четырех dNTP (каждый 2 мМ) 15 мин при 37° С (4-9), 30 мин (10-15) и 1 ч (16-21). Концентрация dddTTP: 10 мкМ (4, 10, 16), 20 мкМ (5, 11, 17), 50 мкМ (6, 12, 18), 100 мкМ (7, 13, 19), 0,5 мМ (8, 14, 20) и 1 мМ (9, 15, 21). 22 и 23 - контроли с 25 мкМ dTTP(3'NH₂), 30 мин, 37° С; 22 - с дополнительной инкубацией; 23 - без нее

вающиеся на 8T и 9T, 14T, 20T, 25T и 27T, 34T* и далее) по сравнению с фрагментами ДНК, полученными в треках 2-3. В то же время ни dddTTP (треки 9, 10), ни dUTP(3'ОСН₃) (треки 7, 8) не терминировали синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой α , что видно из набора полос, соответствующих в этом случае обычным паузам синтеза. В случае ДНК-полимеразы I эффект dddTTP сравнивали с действием dTTP(3'F) [9], наиболее эффективного терминатора синтеза ДНК, катализируемого этим ферментом. Как видно из рис. 1, оба соединения терминируют синтез ДНК, но эффект dddTTP значительно больше (треки 12, 13 и 14, 15). Об этом говорит и набор интенсивных полос, соответствующих фрагментам, оканчивающимся на 8T и 9T, 14T, 20T, 25T, 27T, 34T, 47T и 52-53T, тогда как более протяженные фрагменты почти не обнаруживаются (тре-

* Здесь и далее символ T в таком контексте соответствует используемому терминатору, который заменяет в элонгируемой цепи звено T.

Рис. 4. Синтез ДНК, катализируемый концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой в присутствии 1 мкМ 5'-[³²P]-17-членного олигонуклеотида d(GTAAAAACGACGG·CCAGT). 1 — контрольный олигонуклеотид в объеме 5 мкл. Далее в среду вносили 1 ед. акт. фермента и инкубировали 60 мин при 37° С (2) с дополнительным количеством dTTP с конечной концентрацией 200 мкМ (4-9). Пробы треков 5, 7 и 9 дополнительно содержали по 200 мкМ dTTP, 1 ед. акт. фермента. Инкубировали еще 20 мин при 30° С. Треки 4 и 5 содержали dTTP·(3'NH₂), 6, 7 — dGTP(3'ОСН₃), 8, 9 — dddTTP. Полоса 1 справа соответствует 17-членному олигонуклеотиду, полоса 2 — 18-членному



кл 14, 15). В случае dTTP (3'F) при равной с dddTTP концентрации интенсивно проявляются лишь фрагменты ДНК начиная с 25T и 27T.

Концентрационная зависимость терминции синтеза ДНК в присутствии dddTTP при катализе процесса ДНК-полимеразой I (рис. 2) показывает, что достоверная картина терминции проявляется уже при концентрации dddTTP 20 мкМ (трек 7) и особенно 30 мкМ (трек 9) и 100 мкМ (трек 11), т. е. превышающих концентрацию субстрата в 30-100 раз. Эта величина значительно ниже, чем для ddTTP, dTTP (3'F) или dTTP (3'NH₂); для этих соединений в аналогичной системе терминция столь же эффективна лишь при соотношении терминатор — субстрат 500 : 1 — 1000 : 1 [7, 10]. Таким образом, dddTTP примерно на порядок более эффективен, чем другие известные терминаторы синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой I.

Для изучения влияния dddTTP на синтез ДНК в присутствии ДНК-полимеразы β использовался 14-членный праймер; структура новосинтезированного участка ДНК показана на схеме 2б. На рис. 3 представлены три серии экспериментов. Время основной реакции в первой серии 15 мин, во второй — 30 мин, в третьей — 1 ч, молярное соотношение dddTTP — dTTP изменяется от 1 : 1 до 100 : 1. Во всех случаях (треки 4-21) наблюдается четкая терминционная картина (полосы, соответствующие 1T и 3T, 48T, 25T и 27T, 32T), даже при соотношении терминатор — субстрат 1 : 1 (треки 4, 6 и 16). При такой концентрации dddTTP

(10 мкМ) терминационная картина наилучшая, так как удается прочесть наибольший фрагмент ДНК, а при более высоких концентрациях синтез подавляется слишком рано. Такая же картина наблюдается при терминеции синтеза в присутствии dTTP(3'NH₂) при соотношении терминатор — субстрат 2,5 : 1 (треки 22, 23). Непонятным на рис. 3 является присутствие при терминеции dddTTP двух неспецифических полос, соответствующих нуклеотидным остаткам 2G и 17G, которые не проявляются в случае dTTP(3'NH₂).

На рис. 4 показаны данные по терминеции элонгации 17-членного олигонуклеотида в присутствии dddTTP под действием концевой дезокси-нуклеотидилтрансферазы. Исходный нуклеотид (треки 1, 2) хорошо удлиняется в присутствии dTTP (трек 3), но полностью терминируется (удлиняется на один нуклеотидный остаток) в присутствии dTTP(3'NHbt) [7] (треки 4, 5), не терминируется и даже слегка удлиняется (из-за наличия примеси dGTP) в присутствии dGTP(3'OSCH₃) [7] (треки 6, 7), но полностью терминируется dddTTP (треки 8, 9).

Резюмируя полученные результаты, можно утверждать, что dddTTP терминирует синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразами I, β, обратной транскриптазой и концевой дезокси-нуклеотидилтрансферазой, и не терминирует синтез, катализируемый ДНК-полимеразой α из тимуса теленка при 50-кратном мольном избытке dddTTP относительно dNTP.

Принимая во внимание высокую терминирующую активность dddTTP, особенно в случае ДНК-полимеразы I, значительно превосходящую активность всех других ранее описанных терминаторных субстратов, а также плоскостное расположение атомов C1', C2', C3' и C4' остатка дидезокси-гидрорибозы, мы полагаем, что dddTTP моделирует конформационное состояние субстрата в комплексе [фермент+матрица-праймер+dNTP]. Таким образом, можно думать, что соединения такого типа открывают возможность изучения конформации субстратов в полном синтезирующем ДНК-комплексе [фермент+матрица-праймер+субстраты].

Остается невыясненной природа высокой специфичности ДНК-полимеразы α, не узнающей в качестве терминаторных субстратов ddNTP, dNTP(3'F), dNTP(3'OSCH₃), dNTP(3'N₃), aNTP(3'N₃) [10], а также dddTTP. Можно полагать, что одним из определяющих признаков субстрата (или субстратного ингибитора) для селекции ДНК-полимеразой α должно быть присутствие способного к образованию водородной связи протона при C3'. До настоящего времени субстратные (терминаторные) свойства для ДНК-полимеразы α помимо истинных субстратов dNTP показаны только для dNTP(3'NH₂) [11], dNTP(3'NHAc) [10], а также aNTP(3'NH₂) [12]. Все эти соединения характеризуются присутствием такого протона при заместителе в 3'-положении.

Экспериментальная часть

Использовали ДНК-полимеразу I (фрагмент Кленова) (КФ 2.7.7.7), выделенную из *E. coli* NM182 по аналогии с работой [10], ДНК-полимеразу α (КФ 2.7.7.7), выделенную по методу [13], ДНК-полимеразу β (КФ 2.7.7.7), полученную по методу [14] и предоставленную А. М. Атрайевым (ИМБ АН СССР), концевую дезокси-нуклеотидилтрансферазу (КФ 2.7.7.31) (низкомолекулярная фракция), выделенную по методу [15], обратную транскриптазу (КФ 2.7.7.49), предоставленную В. М. Кавсаном (Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев), 17-членный олигонуклеотидный праймер d(GTAAAACGACGGCCAGT) синтезировал Б. К. Черновым, 14-членный праймер d(CCCAGTACGACGT) — А. В. Ажаевым (ИМБ АН СССР); оба олигонуклеотида были превращены в 5'-[³²P]фосфаты с помощью T4-поли-нуклеотидилкиназы и [^γ-³²P]АТФ с уд. акт. 5000 Ки/ммоль («Изотоп»). dNTP(3'NH₂) и dNTP(3'N₃) получены как описано ранее [16], dNTP(3'F) предоставлен И. А. Михайлоуло (ИВХ АН БССР) [9], dNTP(3'OSCH₃) — В. Л. Флорентьевым (ИМБ АН СССР) [8], dNTP(3'NHAc) получен по методу [10].

ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Gilson (Франция). Нуклеозид анализировали на колонке (0,46×25 см) Whatman Partisil 5 ODS-3 при скорости потока 1 мл/мин в линейном градиенте метанола (0–60%) в 0,1 М NH₄OAc в течение 30 мин. Нуклеотид анализировали в течение 25 мин на колонке (0,46×25 см) Nucleosil 120–7NH₂ в линейном градиенте KH₂PO₄ (pH 5), 0,05–1 М.

Масс-спектры регистрировали на приборе MS 902S, AEI, Manchester (США), ПМР-спектры — на приборе Bruker WH360 в растворе с тетраметилсиланом в качестве внутреннего стандарта.

2',3'-Дегидро-2',3'-дидезокситимидин (III). Суспензию 2,3'-ангидро-5'-О-трифилксилотимидина (I), (150 мг, 0,3 ммоль), цианида натрия (75 мг, 1,5 ммоль) и *n*-толуолсульфокислоты (52 мг, 0,3 ммоль) в 6 мл гексаметиламиниде фосфорной кислоты перемешивали 8 ч при 150°С. По охлаждению распроделяли между 15 мл воды и 15 мл эфира, водный слой отделяли и экстрагировали эфиром (2×7 мл). Объединенные экстракты промывали водой, сушили и упаривали. Полученное соединение (II) растворяли в 10 мл 80% АсОН, нагревали 4 ч при 50°С, реакционную массу упаривали, остаток хроматографировали на колонке (2,5×10 см) с силикагелем L40/100 в линейном градиенте метанола в хлороформе (0–10%). Выход соединения (III) 39 мг (58%). ВЭЖХ, время удерживания 16,9 мин (для 2',3'-дидезокситимидина – 18,1 мин), т. пл. 165°С (из MeOH) (лит. [5]: т. пл. 165–166°С). УФ (вода): λ_{\max} 267 нм (ϵ 10 100). ИК (KBr): 1669 см^{-1} (CH=CH), ПМР (δ , м. д.): 7,74 с (1H, H-6), 6,94м (1H, H-1'), 6,40м (1H, H-2'), 5,90м (1H, H-3'), 4,86м (1H, H-4'), 3,78–3,75м (2H, H-5' а, б), 1,84с (3H, CH₃). Масс-спектр: m/z 224 (M⁺), 124 (M⁺–C₅H₇O₂), 99 (M⁺–C₅H₈N₂O₂).

2',3'-Дегидро-2',3'-дидезокситимидин-5'-трифосфат (IV). К раствору 110 мг (1,6 ммоль) триазола в 1,5 мл абс. CH₃CN и 218 мкл (1,6 ммоль) триэтиламина добавляли 47 мкл (0,5 ммоль) POCl₃, выдерживали 40 мин и центрифугировали. Супернатант прибавляли к 45 мг (0,2 ммоль) нуклеозида (III), предварительно высушенного 3-кратным упариванием с абс. пиридином. Через 20 мин к реакционной массе добавляли 3 мл 0,2 М раствора бис-(три-*n*-бутилламмоний)пирофосфата, выдерживали 4 ч при 20°С, обрабатывали 2 мл воды и через 12 ч упаривали. Остаток хроматографировали на Toyopearl DEAE в градиенте NH₄HCO₃ (pH 8,5; 0–0,5 М, общий объем 2 л) и объединенные фракции обессоливали многократным упариванием с водой. Выход трифосфата (IV) 85 мг (78%), R_f (диоксан – аммиак – вода, 6:1:4) 0,3. УФ (вода): λ_{\max} 267 нм. Время удерживания 20 мин (для dTTP 15 мин).

Ферментативные эксперименты. Все опыты проведены на ДНК фага M13mp10 в качестве матрицы с 17- или 14-членным праймером. Все методики аналогичны описанным ранее [7, 10]; концентрации субстратов и ингибиторов, время реакции и количество ферментов указаны в подписях к рис. 1–4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ferrin L. J., Mildvan A. S. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 24. P. 6904–6913.
2. Bryant F. R., Johnson K. A., Benkovic S. J. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. № 15. P. 3538–3546.
3. Atkinson M. R., Deutscher M. P., Kornberg A., Russell A. F., Moffatt J. G. // *Biochemistry*. 1969. V. 8. № 12. P. 4897–4904.
4. Balzarini J., Bauwels R., Herdewijn P., De Clercq E., Conney D. A., Kang G.-J., Dalal M., Johns D. G., Broder S. // *BBRC*. 1986. V. 140. № 2. P. 735–742.
5. Horwitz J. P., Chua J., Da Rooge M. A., Noel M., Klundt I. L. // *J. Org. Chem.* 1966. V. 31. № 1. P. 205–211.
6. Russell A. F., Moffatt J. G. // *Biochemistry*. 1969. V. 8. № 12. P. 4889–4896.
7. Beabealashvili R. Sh., Scamrov A. V., Kutateladze T. V., Mazo A. M., Krayevsky A. A., Kukhanova M. K. // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. V. 868. № 2. P. 136–144.
8. Kutateladze T. V., Kritsyn A. M., Florentyev V. L., Kavsan V. M., Chidgevadze Z. G., Beabealashvili R. Sh. // *FEBS Letters*. 1986. V. 207. № 2. P. 205–212.
9. Chidgevadze Z. G., Scamrov A. V., Beabealashvili R. Sh., Kvasyuk E. L., Zaytseva G. V., Mikhailopulo I. A., Kowwolik G., Langen P. // *FEBS Letters*. 1985. V. 183. № 2. P. 275–278.
10. Chidgevadze Z. G., Beabealashvili R. Sh., Krayevsky A. A., Kukhanova M. K. // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. V. 868. № 2. P. 145–152.
11. Chidgevadze Z. G., Beabealashvili R. Sh., Atrazhev A. M., Kukhanova M. K., Azhayev A. V., Krayevsky A. A. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 3. P. 1671–1686.
12. Панчихин А. В., Лурыгин П. П., Ажаев А. В., Краевский А. А., Кутателадзе Т. В., Чиджевадзе З. Г., Библашвили Р. Ш. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. № 10. С. 1367–1379.
13. Grosse F., Krauss G. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. № 19. P. 5470–5475.
14. Атражев А. М., Куханови М. К. // *Биоорганическая химия*. 1985. Т. 11. № 12. С. 1627–1635.
15. Bollum F. J., Chang L. M. S., Triapolis C. H., Dorson J. W. // *Meth. Enzymol.* 1974. V. 24. P. 374–395.
16. Зайцева В. Е., Дяткина Н. Б., Краевский А. А., Скацова Н. В., Турина О. В., Гнучев Н. В., Готтих Б. П. // *Биоорганическая химия*. 1984. Т. 10. № 5. С. 670–680.

Поступила в редакцию

9.1.1987

После доработки

30.IV.1987

A NEW TERMINATOR OF DNA BIOSYNTHESIS SUPPOSEDLY MODELLING THE
CONFORMATIONAL STATE OF THE SUBSTRATE IN THE DNA SYNTHESISING
COMPLEX

DYATKINA N. B., von JANTA-LIPINSKI M.*, MINASYAN Sh. Kh.,
KUKHANOVA M. K., KRAYEVSKY A. A., CHIDGEAVADZE Z. G.**,
BEABEALASHVILLI R. SH.**

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
**Central Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the GDR,*
Berlin-Buch;
***Institute of Experimental Cardiology, National Cardiology Research Center,*
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

2',3'-Dideoxy-2',3'-dehydrothymidine 5'-triphosphate (dddTTP) reveals the termination substrate properties in the DNA synthesis catalyzed by *E. coli* polymerase I (Klenow fragment), rat liver DNA polymerase β , calf thymus terminal deoxynucleotidyl transferase, and reverse transcriptase of avian myeloblastosis virus but does not affect calf thymus DNA polymerase α . For DNA polymerase I, dddTTP by an order of magnitude is more effective than any known termination substrate. It is supposed that dddTTP models the conformational state of the substrate's carbohydrate moiety in the complex DNA polymerase+template-primer.