



УДК 577.152.277*7'136

ФРАГМЕНТ КЛЕНОВА ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I ИЗ *E. COLI* III. РОЛЬ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ ФОСФАТНЫХ ГРУПП МАТРИЦЫ В ЕЕ СВЯЗЫВАНИИ С ФЕРМЕНТОМ

Волчкова В. А., Горн В. В., Колодцева Т. И.,
Лаврик О. И., Левина А. С., Невинский Г. А.,
Хомов В. В.*

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск;

* Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически-активных веществ ИПО «Вектор»
Министерства медицинской-биологической промышленности, Бердск

Исследована модификация фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I олигонуклеотидами $d[(Tr)_2C(pT)_7]$ и $d[p(Tr)_2C(pT)_7]$, содержащими реакционноспособные группы *цис*-гидроксидамминолатны по остаткам цитидина — реагенты (I) и (II) соответственно. Модификация проводилась в присутствии NaF (5 мМ), который практически полностью ингибирует деградацию олигонуклеотидов 3' → 5'-экзонуклеазной активностью фрагмента Кленова. Реагенты селективно связываются с матричным участком фермента. Разрушение координационной связи между реагентами и ферментом и, как следствие, восстановление ферментативной активности достигается путем обработки модифицированного фермента NaCN.

Из данных по конкуренции лигандов с аффинными реагентами найдены величины констант диссоциации различных лигандов с матричным участком фрагмента Кленова. Из величин соответствующих энергий Гиббса оценен характер их связей с ферментом.

Показано, что минимальным лигандом, взаимодействующим с матричным участком, является ортофосфат (K_d 26 мкМ). При переходе от P_i^* к тимидиловой кислоте и затем к олиготимидилатам $d(pT)_n$ ($n = 2-20$) средство лигандов при увеличении длины на одно звено увеличивается в 1,76 раза, а при дальнейшем увеличении n остается неизменным. Как при полном этилировании межнуклеотидных фосфатных групп, так и при исключении из реакционных смесей ионов марганца наблюдается уменьшение средства фермента к олиготимидилатным матрицам примерно на порядок.

Предполагается, что одна из межнуклеотидных фосфатных групп матрицы образует с ферментом зависимый от двухвалентного катиона электростатический контакт ($\Delta G = -1,45 \div -1,75$ ккал/моль) и водородную связь за счет атома кислорода группы $P=O$ этого фосфата ($\Delta G = -4,8 \div -4,9$ ккал/моль). Остальные межнуклеотидные фосфатные группы матрицы с ферментом не взаимодействуют, а нуклеозидные группы образуют с ферментом гидрофобные контакты ($\Delta G = -0,34$ ккал/моль).

До последнего времени в литературе практически отсутствовали данные о типе связей между ДНК-полимеразами (КФ 2.7.7.7) и матрицами, а также о минимальных лигандах матричных участков ферментов. Ранее для оценки средства различных лигандов к матричному участку ДНК-полимеразы α человека нами был предложен аффинный реагент $p(Tr)_2pC^{Pt}(pT)_7$ (II), который необратимо модифицирует на ферменте участок связывания матрицы, не затрагивая участка, связывающего заправку [1—4]. С помощью этого реагента показано, что матрицы любой длины образуют с ДНК-полимеразой α человека один зависимый от двухвалентного иона металла электростатический контакт фосфатной группы ($\Delta G = -1,2 \div -1,4$ ккал/моль) и одну водородную связь за счет атома кислорода группы $P=O$ этого фосфата ($\Delta G = -4,4 \div -4,5$ ккал/моль). Остатки нуклеозидов матрицы вступают в гидрофобные взаимодействия с ферментом (ΔG в расчете на одно звено матрицы равно $-0,32$ ккал/моль).

Принятые сокращения: P_i — неорганический фосфат; $(Tr)_2C^{Pt}(pT)_7$ и $p(Tr)_2C^{Pt}(pT)_7$ — дезоксирибоолигонуклеотидные реагенты (I) и (II) соответственно, отсутствие присоединенный по N3 цитидина остаток *цис*-аквагидроксидамминолатны; префикс «d» в обозначениях дезоксинуклеотидов везде опущен.

Сродство матрицы к ферменту зависит от длины комплементарной ей затравки. Однако соотношение между величинами K_d в присутствии и в отсутствие одного и того же праймера для двух матриц различной длины остается величиной постоянной. В работах [3, 5—8] были обнаружены одинаковые закономерности взаимодействия эукариотических и прокариотических ДНК-полимераз с праймерами. Представлялось интересным сравнить механизмы узнавания матриц ДНК-полимеразами эукариот и прокариот. Однако применение аффинного реагента ДНК-полимеразы α - $\rho(\text{Tr})_2\text{C}^{32}\text{P}^t(\rho\text{T})_7$ (II) для фрагмента Кленова до последнего времени не представлялось возможным из-за проявления ферментом деградирующей олигонуклеотиды $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активности. Новые возможности в исследовании фрагмента Кленова появились недавно, после открытия избирательного подавления $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активности фрагмента Кленова с помощью NaF [9].

Использование этих данных для изучения фрагмента Кленова методом аффинной модификации требовало дополнительного анализа влияния фторида натрия на количественные характеристики реакции полимеризации. Было показано, что NaF в концентрациях до 5—6 мМ примерно в 2 раза активирует реакцию полимеризации, а при концентрациях 15—30 мМ заметно ее ингибирует. Активация фермента при низких концентрациях NaF (1—5 мМ) обусловлена ингибированием ионами фтора $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активности. В отсутствие NaF фермент расщепляет $5'$ - P^{32} -меченый декатимидилат за 10—60 мин при 20°C с образованием набора продуктов гидролиза — $(\rho\text{T})_{1-9}$. В присутствии 5 мМ NaF продуктов деградации $(\rho\text{T})_{10}$ не было обнаружено даже после 6 ч инкубации смеси при 30°C .

С помощью реакции полимеризации с использованием $\text{poly}(\text{T})$ в качестве матрицы, а $(\rho\text{A})_{10}$ в качестве праймера было установлено, что NaF (5 мМ) не изменяет сродства фермента к матрице и праймеру, но увеличивает в 3—5 раз величину K_m для dNTP. Известно, что NaF при высоких концентрациях (30 мМ) ингибирует многие нуклеотид- и полинуклеотид-зависимые ферменты [10], причем ингибирование зависит от ионов двухвалентных металлов. В этом же диапазоне 20—30 мМ концентраций NaF наблюдается ингибирование полимеразной активности фрагмента Кленова. Ингибирование же нуклеазной активности происходит при концентрациях NaF, примерно на порядок меньших (2—5 мМ), как и ингибирование активности ряда неорганических пирофосфатаз [11]. В последней работе был сделан вывод, что ион фтора, имея одинаковый заряд и электронную структуру, подобную структуре иона гидроксила, замещает его, связываясь с двумя ионами магния в комплексе фермента с неорганическим пирофосфатом. Аналогичная ситуация может иметь место в $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазном центре ДНК-полимеразы. Согласно данным рентгеноструктурного анализа для комплекса фрагмента Кленова с ТМР, фосфатная группа нуклеотида образует с ферментом зависимый от двухвалентного катиона электростатический контакт, водородную связь с гидроксигруппой остатка тирозина и взаимодействует с небольшим по размеру лигандом — скорее всего, дополнительным ионом металла [12]. Таким образом, не исключено, что роль второго иона магния в этом случае выполняет ион Na^+ . Поскольку полимеризующий центр фрагмента Кленова не выполняет гидролитической функции, специфический участок связывания молекулы воды в нем может отсутствовать. Ингибирование полимеризующей активности фермента при добавлении NaF за счет его конкуренции с нуклеотидом за ион двухвалентного катиона может проявляться при более высоких концентрациях фторида. В пользу этого предположения указывает уменьшение сродства NTP к ферменту в присутствии NaF. Как видно из рис. 1, инкубация фрагмента Кленова реагентом (I) — $(\text{Tr})_2\text{C}^{32}\text{P}^t(\rho\text{T})_7$ в отсутствие NaF не изменяет полимеризующей активности фермента. В то же время в присутствии NaF наблюдается заметная инактивация фрагмента Кленова реагентом (I). Аналогичные результаты были получены в случае реагента (II). Скорости инактивации при одинаковых концентрациях реагентов

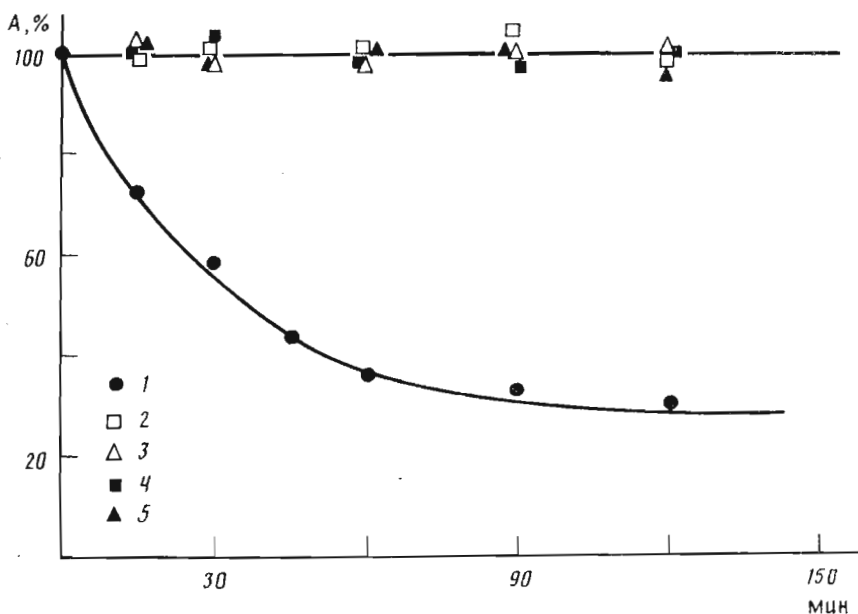


Рис. 1. Кинетические кривые инактивации фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I при его инкубации (30° С) с различными реагентами: 1 — реагент (I) (2 мкМ) + MnCl_2 (0,22 мкМ) + NaF (5 мМ); 2 — реагент (I) + MnCl_2 ; 3 — реагент (I), обработанный предварительно NaCN (5 мМ) + MnCl_2 + NaF ; 4 и 5 — NaCN (5 мМ) и $[\text{Pt}^{2+}(\text{NH}_3)_2\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ в присутствии MnCl_2 и NaF

(I) и (II) практически не различались. В то же время *cis*-аквагидроксидиаминоплатина не инактивировала фермент даже при высоких концентрациях (10—20 мкМ).

Инкубация фрагмента Кленова с 5'- ^{32}P -меченым реагентом (II) приводила к включению ^{32}P -метки в белок. На рис. 2 приведены данные электрофоретического анализа модифицированного белка. Видно, что положение метки на денситограмме геля совпадает с положением полосы белка.

Как известно, молекулы аммиака в реагентах типа (I) или (II) достаточно прочно связаны с атомом платины, а гидроксильная группа способна протонироваться, превращаясь в молекулу воды, легко замещаемую на другие нуклеофильные группы [13]. Особенно высокое сродство к иону платины имеют цианид-ионы ($K_d = 10^{-41}$ для $\text{Pt}(\text{CN})_4$) [14]. Замещение гидроксигруппы реагентов на цианид-ион должно приводить к потере их активности по отношению к нуклеофильным группам фермента. Инкубация фрагмента Кленова с NaCN не приводит к уменьшению его полимеризующей активности, предварительная же инкубация реагентов (I) или (II) с NaCN лишает их способности инактивировать фермент (рис. 1). Как видно из рис. 2, преинкубация ^{32}P -меченого реагента (II) с NaCN приводит к практически полному исчезновению включения реагента в белок по сравнению с реагентом, не обработанным цианидом.

Цианид-ион способен конкурировать за внутреннюю координационную сферу иона Pt^{2+} не только с гидроксигруппой, но и с другими нуклеофильными группами, проявляющими к Pt^{2+} высокое сродство. Например, он разрушает координационную связь иона платины с атомами азота оснований ДНК [14].

Инкубация с NaCN инактивированного с помощью реагента (I) фрагмента Кленова приводит к восстановлению полимеризующей активности фермента (рис. 3).

При разрушении связи между цитозином реагента и остатком платины, когда последний остается связанным с белком, не должно происходить восстановления активности фермента. Однако при 30° С активность восстанавливается на 60—70% за 1,5—2 ч. В то же время разрушения связи между атомом платины и атомом азота N3 остатка цитидина реагента (I)

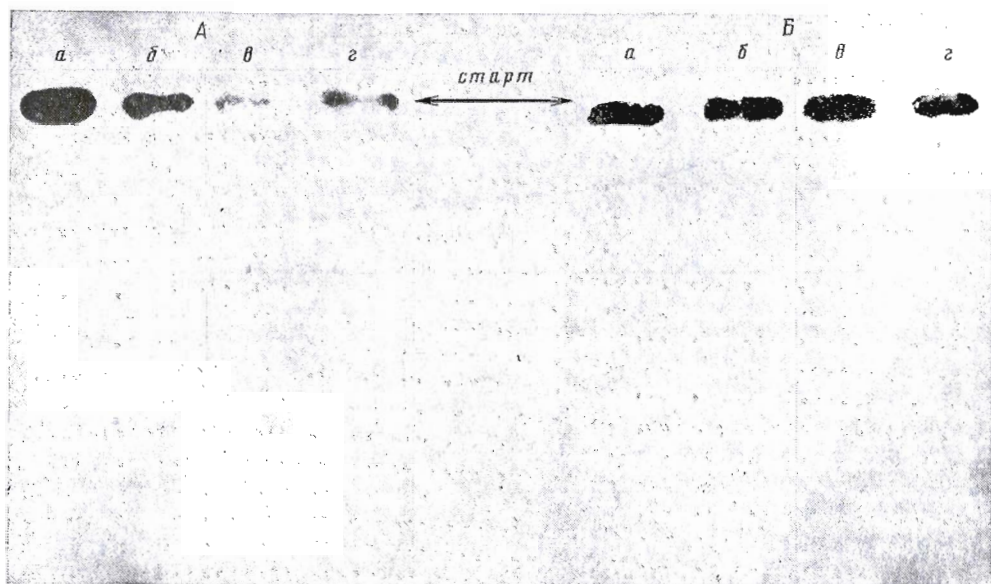


Рис. 2. Электрофоретический анализ фрагмента Кленова, модифицированного 5'-³²P-меченым реагентом (II), в присутствии SDS. а — модификация, проведенная в течение 4 ч при 30° С в отсутствие других лигандов; б — то же, но после модификации проведена обработка 5 мМ NaCN в течение 3 ч при 30° С; в — модификация реагентом (II) после его предварительной обработки NaCN; г — то же, что «а», но в присутствии двукратного избытка d(pT)₂C(pT)₇. А — радиоавтограф геля, Б — окрашивание геля кумасси

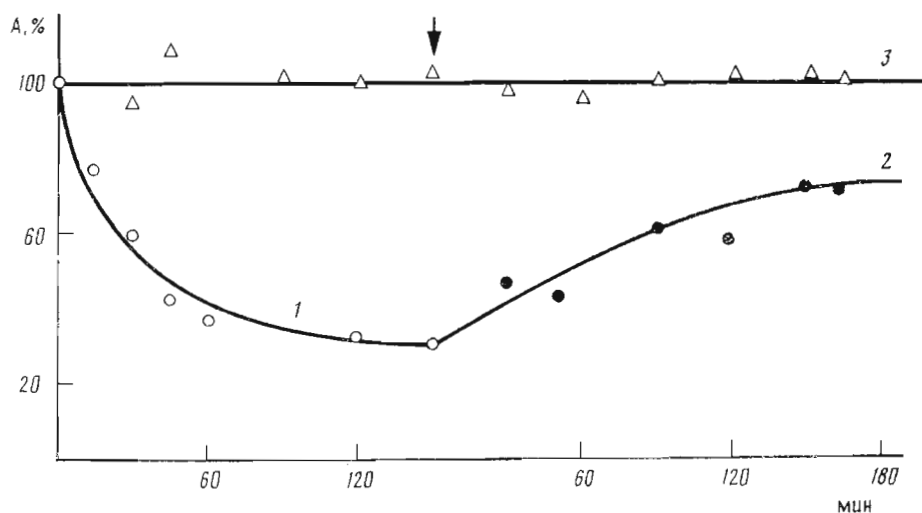


Рис. 3. Кинетические кривые инактивации (1) фрагмента Кленова реагентом (I) (10 мкМ) и восстановления активности инактивированного фермента при его инкубации с NaCN (5 мМ) (2), 3 — инкубация фермента с d(Tr)₂C(pT)₇ до и после добавления NaCN. Все эксперименты проведены при 30° С. Стрелкой показан момент добавления NaCN

скорее всего не происходит, поскольку $\tau_{1/2}$ разрушения этой связи даже при 70° С составляет ~ 30 ч (рис. 4). Кроме того, инкубация фрагмента Кленова, модифицированного ³²P-меченым реагентом (II), с NaCN приводит к отщеплению радиоактивной метки (рис. 2). Следовательно, отщепление реагента и параллельное восстановление активности инактивированного фермента при инкубации с NaCN обусловлено разрушением связи между платиной и нуклеофильной группой фермента.

Зависимость логарифма остаточной полимеризующей активности от времени модификации фермента реагентом (I) имеет линейный характер

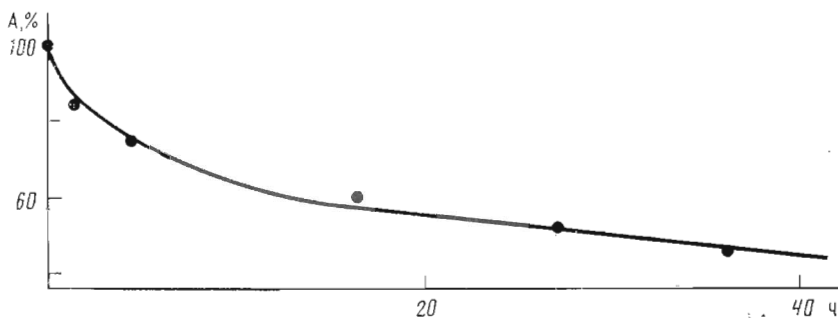


Рис. 4. Кинетическая кривая отщепления при 70° С Pt^{2+} -содержащей группы от реагента (I) под действием 0,1 M NaCN

(рис. 5). Это указывает на псевдопервый порядок реакции модификации и позволяет оценить кажущиеся константы скоростей инактивации ($k_{\text{инак}}$) полимеразы при фиксированных концентрациях реагента. С помощью зависимостей величин $k_{\text{инак}}$ инактивации фрагмента Кленова от концентрации реагента (I) в обратных координатах найдены величины K_d комплекса в присутствии ионов Mn^{2+} ($K_d = 0,3 \text{ мкМ}$) и в их отсутствие ($K_d = 4,3 \text{ мкМ}$). Аналогичные величины K_d получены для реагента (II). Величины констант скорости модификации фрагмента Кленова обоими реагентами в присутствии ($k = 2 \pm 0,3 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$) и в отсутствие ($k = 1,5 \pm 0,5 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$) ионов марганца практически не различались.

Олигонуклеотиды $(pT)_{10}$ и $(Tr)_2C(pT)_7$ защищали фрагмент Кленова от инактивации реагентами как в присутствии, так и в отсутствие ионов марганца. На рис. 2 приведены данные по защите фрагмента Кленова от присоединения $5' \text{-}^{32}P$ -меченого реагента (II) (0,5 мкМ) олигонуклеотидом $(Tr)_2C(pT)_7$. Видно, что при 1 мкМ концентрации последнего происходит практически полная защита фермента от присоединения реагента. Из зависимостей обратных величин $k_{\text{инак}}$ инактивации фермента от концентрации $(pT)_{10}$ в присутствии ионов Mn^{2+} (рис. 6) и концентрации $(Tr)_2C(pT)_7$ в отсутствие ионов металла при фиксированной концентрации реагента (I) были найдены величины K_d комплексов фермента с этими декапуклеотидами. Они оказались равными соответственно 0,07 и 4,5 мкМ. Это указывало на то, что введение Pt^{2+} -содержащей группы в состав реагента не приводит к существенному изменению его сродства по сравнению с немодифицированными декануклеотидами как в отсутствие, так и в присутствии ионов марганца.

В принципе ДНК-полимеразы имеют два участка, способных связывать олиго- и полинуклеотиды: участки связывания матрицы и праймера. Однако в работе [15] показано, что сначала ДНК-полимераза α связывает одноцепочечную нуклеиновую кислоту (матрицу) и только после этого

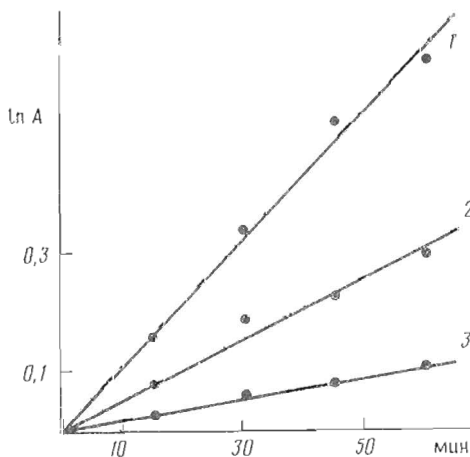


Рис. 5. Зависимость логарифма остаточной активности фрагмента Кленова от времени его инкубации при 30° С с реагентом (I) в концентрациях: 30 (1), 6 (2), 0,7 мкМ (3). Активность фермента в начальный момент инкубации принята за единицу

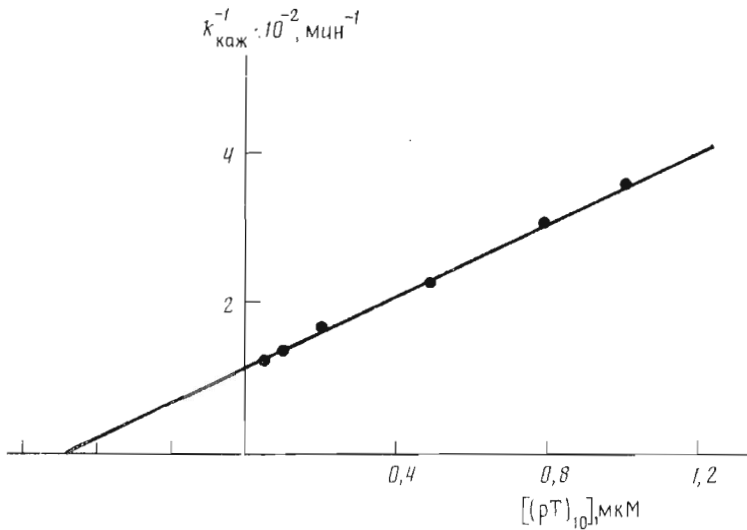


Рис. 6. Зависимость обратных величин $k_{\text{каж}}$ реакции инактивации фрагмента Кленова реагентом (I) (2 мкМ) от концентрации декантимидилата

она потенциально способна узнать и связать праймер. На примере ДНК-полимеразы α человека и фрагмента Кленова в работах [6—8] нами показано, что при любой длине праймера в пределах каталитических субъединиц ДНК-полимераз находятся 9—10 мононуклеотидных звеньев и только одно из них (первое с 3'-конца) взаимодействует с ферментом. Остальные звенья праймера вступают в комплементарные взаимодействия с матрицей. Это приводит к разнице в средстве минимального праймера — мононуклеотида и декануклеотида примерно в 200 раз. Эффективность взаимодействия с ферментом затравок — $(pN)_n$ при $n \leq 10$, содержащих некомплементарные матрице основания, определяется не их общей длиной, а числом оснований от первого с 3'-конца до первого некомплементарного матрице основания [8]. Величина K_d комплекса праймера любой длины с участком его связывания на ферменте за вычетом комплементарных взаимодействий с матрицей оценки равной 50—100 мкМ [6]. Найденные величины K_d комплексов фрагмента Кленова с реагентами (I) и (II), $(pT)_{10}$ и $(Tr)_2C(pT)_7$ примерно на 2—3 порядка меньше этой величины. Таким образом, совокупность рассмотренных данных может указывать на специфическую модификацию реагентами (I) и (II) матричного участка фермента. При этом реагенты удовлетворяют всем критериям аффинных процессов модификации.

Ранее в работах [2—4] с помощью реагента (II) были получены величины K_d комплексов матричного участка ДНК-полимеразы α человека с ортофосфатом и $(pT)_{1-15}$. Оказалось, что зависимость логарифмов значений K_d от длины олигонуклеотида (n) линейна. Величина K_d , полученная для P_i экстраполяцией кривой до значения $n = 0$, на оси абсцисс соответствовала экспериментально найденной величине K_d для P_i . Аналогичные результаты, полученные в данной работе для фрагмента Кленова, приведены на рис. 7. Видно, что при переходе от P_i к тимидиловой кислоте и далее к $(pT)_{2-20}$ при увеличении длины на одно мононуклеотидное звено наблюдается возрастание средства к ферменту в 1,76 раза. Иначе говоря, изменение ΔG связывания этих лигандов можно описать следующим образом: $\Delta G = -(6,5 + 0,34 \cdot n)$ ккал/моль, где $-6,5$ ккал/моль — ΔG связывания P_i , а n равно числу мононуклеотидных звеньев в $(pT)_n$.

Известно, что при взаимодействии молекулы лиганда с биополимером несколькими типами связей величина ΔG образования комплекса белка с лигандом равна сумме величин ΔG , относящихся к отдельным типам взаимодействий. Поскольку вклад в средство к ферменту ортофосфата

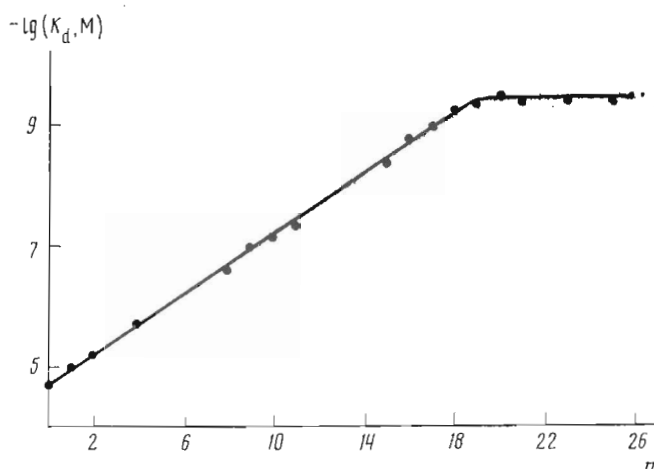


Рис. 7. Зависимость величины логарифмов констант диссоциации (K_d) комплексов фрагмента Кленова с олиготимидилатами (и ортофосфатом) от числа мононуклеотидных звеньев (n) в олигонуклеотиде

достаточно велик ($\Delta G = -6,5$ ккал/моль) и ΔG изменяется линейно при увеличении длины олигонуклеотида, следует полагать, что только одна из межнуклеотидных фосфатных групп матрицы взаимодействует с ферментом.

Как уже обсуждалось в работах [1—4] по исследованию ДНК-полимеразы α человека, изменение ΔG , равное $-0,34$ ккал/моль, меньше обычно наблюдаемого для электростатических взаимодействий или водородных связей и сравнимо с величинами для слабых гидрофобных взаимодействий белков с лигандами. Эта величина соответствует также энергии переноса тимина из воды в 6 М водный метанол [16]. По-видимому, справедливо предположение о том, что $\Delta G = -0,34$ ккал/моль отражает выигрыш в энергии при переносе одного нуклеотидного звена олиготимидилатных лигандов из водного окружения в гидрофобную полость матричного участка фермента. В то же время полученные данные не позволяют полностью исключить вклад других типов взаимодействия.

При $n > 19-20$ сродство олиготимидилатов к фрагменту Кленова перестает изменяться. Это может свидетельствовать в пользу того, что только 19—20 звеньев матрицы контактируют с белковой глобулой. Интересно, что наличие контакта 20 нуклеотидных звеньев матрицы с ДНК-полимеразой I из *E. coli* было предположено Корнбергом на основе оценки

Величины констант диссоциации (K_d) комплексов фрагмента Кленова с олиготимидилатами различной длины

Олигодезоксирибонуклеотид	K_d^* , мкМ	Олигодезоксирибонуклеотид	K_d , мкМ
KH_2PO_4	26	(Tp) ₁₀ T	0,065
$(C_2H_5O)_3PO$	290	(Tp) ₁₄ T	0,0040
TMP	10,4	(pT) ₁₆	0,0012
(pT) ₂	6,5	(pT) ₁₇	0,00091
(pT) ₄	2,1	(pT) ₁₈	0,00051
(Tp) ₇	0,26	(pT) ₁₉	0,00056
$[Tp'(Et)Tp]_3Tp'(Et)T^{**}$	0,48	(pT) ₂₀	0,00039
$[Tp''(Et)Tp]_3Tp''(Et)T^{**}$	0,48	(pT) ₂₁	0,00029
$[Tp(Et)]_7T$	4,8	(pT) ₂₃	0,00035
(Tp) ₈ T	0,1	(pT) ₂₅	0,00034
(pT) ₁₀	0,07		

* Ошибка определения величин K_d не превышала 20—30%.

** Обозначения p', p'' соответствуют различным диастереомерам по атому фосфора, абсолютная конфигурация которых неизвестна [5].

диаметра молекулы (65 Å) фермента и размера одной комплементарной пары дуплекса ДНК [17].

Роль межнуклеотидных фосфатных групп матриц в их связывании с фрагментом Кленова исследована нами также с помощью аналогов олиготимидилатов, частично или полностью этилированных по межнуклеотидным фосфатным группам. Величины K_d для этих лигандов приведены в таблице. Видно, что частичное этилирование межнуклеотидных фосфатных групп приводит к небольшому уменьшению сродства (в 1,5—2 раза). В то же время сродство полностью этилированных олигонуклеотидов примерно в 16—20 раз меньше, чем неэтилированных олигонуклеотидов той же длины. Как указывалось выше, из линейного изменения ΔG при переходе от P_i к тимидиловой кислоте и далее до $(pT)_{19-20}$ следует, что только одна из межнуклеотидных фосфатных групп матрицы взаимодействует с ферментом. Если бы сродство к межнуклеотидной фосфатной группе определялось только образованием электростатического контакта, то при блокировании всех межнуклеотидных групп сродство фермента к олигонуклеотидам (как следует из величины K_d для ортофосфата, равной 26 мкМ) должно было уменьшиться на 4,5—5 порядков, а не на порядок, как это наблюдается в эксперименте. Это различие можно объяснить, если предположить, что кроме электростатического контакта ортофосфат (или одна межнуклеотидная фосфатная группа в составе олигонуклеотида) образует с ферментом водородную связь между кислородом группы $P=O$ и ферментом. Для проверки этого предположения было проведено сравнение сродства фермента к ортофосфату и триэтилфосфату. Комплекс полимерызы с триэтилфосфатом имел $K_d = 290$ мкМ, что в 11,2 раза больше величины K_d для P_i . Аналогичное уменьшение сродства реагента (I) к ферменту (в 14,3 раза) наблюдается, как указано выше, при исключении из инкубационной смеси ионов Mn^{2+} . Снижение сродства, вызванное отсутствием ионов металла (14,3 раза) и этилированием фосфата или всех межнуклеотидных фосфатных групп (11—18 раз), в случае фрагмента Кленова сопоставимо с найденным ранее (9—11,3 раза) для ДНК-полимерызы α человека.

На основании этих данных величину ΔG образования зависящего от двухвалентного катиона электростатического контакта между матрицей и ферментом можно оценить близкой к $-1,45 \div -1,74$ ккал/моль.

Из сравнения величин K_d для неэтилированных, частично и полностью этилированных олиготимидилатов видно, что этильные группы межнуклеотидных фосфатов матриц (за исключением одной из них, блокирующей атом кислорода, образующего с ферментом металлзависимый электростатический контакт) существенного вклада в сродство к ферменту не вносят. В связи с этим эффективное связывание триэтилфосфата ($K_d = 290$ мкМ, $\Delta G = -4,9$ ккал/моль) может происходить, вероятно, только за счет образования связи между белком и атомом кислорода группы $P=O$. Величина ΔG образования комплекса с триэтилфосфатом сопоставима с величинами ΔG образования водородных связей между белками и их лигандами [18].

На основании рассмотренных данных можно сделать вывод, что только одна из межнуклеотидных фосфатных групп матрицы образует с ферментом водородную связь и электростатический контакт. Величина ΔG ($-6,5$ ккал/моль) суммы этих взаимодействий в случае ортофосфата или межнуклеотидной фосфатной группы матрицы равна сумме величин ΔG остальных взаимодействий ($-4,9$ и $-1,4 \div -1,74$ ккал/моль). Величину K_d (26 мкМ) для ортофосфата можно получить путем перемножения величины K_d для триэтилфосфата ($K_d = 290$ мкМ, характеризует образование водородной связи) и $K_d = 0,07-0,09$ мкМ, относящейся к образованию зависящего от двухвалентного катиона электростатического контакта. С учетом гидрофобных взаимодействий оснований матрицы с ферментом ($\Delta G = -0,34$ ккал/моль на одно звено) величину ΔG образования комплекса матричного участка с $(pT)_{20}$ можно оценить близкой к 13,3 ккал/моль.

Ранее в работе [1] были найдены величины K_m для матриц, полученные с помощью реакции полимеризации в присутствии комплементарных

им праймеров. Эти величины практически не отличаются от величин K_d , найденных с помощью метода аффинной модификации в присутствии праймеров. В данной работе проведено сравнение сродства матриц $(pT)_{10}$ и $(pT)_{15}$ к фрагменту Кленова в присутствии и в отсутствие комплементарного им праймера $r(pA)_7$. Величины K_m , найденные с помощью реакции полимеризации, оказались равными 40 и 2,4 нМ соответственно (их отношение равно 16,7). Величины K_d для этих олигонуклеотидов в отсутствие праймера (таблица) равны соответственно 66 и 4 нМ, а отношение величин K_d в присутствии и в отсутствие праймера, как и в первом случае, 16,7. Следовательно (как и для ДНК-полимеразы α человека), добавление праймера приводит к возрастанию сродства матриц. Однако отношение величин K_d для двух матриц разной длины в присутствии и в отсутствие одного и того же праймера является величиной постоянной.

Результаты, полученные в данной работе для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, полностью согласуются с опубликованными ранее для ДНК-полимеразы α человека, что свидетельствует в пользу одинаковой роли межнуклеотидных фосфатных групп матрицы и ее нуклеозидных остатков в связывании с ДНК-полимеразами эукариот и прокариот.

Авторы глубоко признательны М. Ф. Могилевкиной и О. П. Слюдкину (НГУ, Новосибирск) за препарат *цис*-дихлордиамминоплатины, А. Г. Веньяминовой за $(pA)_7$, В. В. Горну, Е. М. Ивановой и А. В. Лебедеву за препараты некоторых олиготимидилатов, Н. В. Булычеву за проведение экспериментов по разделению ^{32}P -меченых олиготимидилатов в ПААГ, В. Ф. Зарытовой за постоянный интерес и внимание к работе.

Экспериментальная часть

Гомогенный по данным электрофореза в ПААГ фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I из *E. coli* с удельной активностью $3,7 \cdot 10^4$ ед. акт./мг был выделен из штамма суперпродукента *E. coli* и не содержал $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной активности, характерной для ДНК-полимеразы I.

В работе использованы дезокси-нуклеотиды NMP, NTP, poly(A), ДНК из тимуса теленка (НИКТИ БАВ, Бердск), бычий сывороточный альбумин (Koch Light, Англия), $MgCl_2$, $MnCl_2$ (Merck, ФРГ), $[^3H]NTP$ с удельной активностью 900—1400 ТБк/моль (Изотоп, СССР), остальные реактивы квалификации ос.ч.

Использованные в работе олигодезоксирибонуклеотиды синтезированы и проверены на гомогенность (по данным ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии) как описано в работе [5].

Аффинные реагенты (I) и (II) получали по методу [1] с некоторыми модификациями: к 20 нмоль $(Tr)_2C(pT)_7$ или $(pT)_2pC(pT)_7$ в 0,2 мл 2 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинтансульфоната калия (HEPES-буфер), pH 6,5, добавляли 100 нмоль *цис*-аквагидроксидиамминоплатины, полученной обработкой *цис*-дихлордиамминоплатины нитратом серебра, согласно работе [19]. Смесь оставляли на 6—8 ч при 20° С. Гомогенные препараты реагентов получали ионообменной хроматографией реакционной смеси на DEAE-целлюлозе DE-41 (Whatman, Англия) в градиенте концентраций KCl, содержащем 20% этанола и 2 мМ HEPES-буфер (pH 7,0) с последующим удалением KCl гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (Pharmacia, Швеция).

Степень превращения исходных декануклеотидов и гомогенность полученных реагентов (I) и (II) анализировали с помощью микроколоночной хроматографии (МКХ) на DE-41 в градиенте концентраций KCl, содержащем 8 М мочевины, как описано в работе [1]. Было показано, что за 6—8 ч исходные декануклеотиды превращаются на 90—95% в продукты с зарядом, на единицу меньшим.

Известно, что тимидиновые остатки менее реакционноспособны, чем остатки цитидина, по отношению к *цис*-аквагидроксидиамминоплатине [13], и все же нельзя было исключить возможности заметного включения ионов платины по остаткам тимидина. Однако, согласно микроколоночной хроматографии, заметного образования продуктов модификации $d(Tr)_nT$ *цис*-аквагидроксидиамминоплатиной не происходило даже после 2 сут инкубации в описанных выше условиях.

Содержание платины в составе реагентов (I) и (II) определяли после их связывания в кварцевых сосудах при 700—800° С и стандартной обработки царской водкой с помощью колориметрической реакции со $SnCl_2$ по методу [20]. Поглощение растворов окрашенных комплексов определяли при 400 нм с помощью спектрофотометра Spectord M-40 (ГДР). Для получения калибровочной кривой использовали растворы *цис*-дихлордиамминоплатины известной концентрации. Содержание платины в реагентах составляло $1,1 \pm 0,2$ моль Pt на 1 моль декануклеотида.

Определение содержания платины в реагентах проводили также методом атомно-адсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией на приборе Hitachi (Япония). В качестве стандартов использовали эквивалентную смесь олигонуклеотида

с *цис*-дихлордиамминоплатиной в различных концентрациях. Содержание Pt было найдено равным $1,2 \pm 0,2$ моль Pt на 1 моль реагента.

Синтез ^{32}P -реагента (II) проводили по аналогии с меченым реагентом (II), используя $(pT)_2pC(pT)_7$ после 5'-фосфорилирования его с помощью $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ и T4-полинуклеотидкиназы по стандартной методике [21]. Удельная радиоактивность ^{32}P реагента (II) составляла 2,4 ТБк/моль.

Полимеризующую активность фрагмента Кленова в экспериментах по его инактивации определяли следующим образом: в реакционную смесь объемом 60 мкл, содержащую 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 30 мМ KCl, 10 мМ EDTA, dATP, dGTP, dTTP, dCTP, каждый 30 мМ (один из NTP был мечен тритием, удельная активность 5—20 ТБк/моль), и 2 ОЕ₂₆₀/мл активированной согласно работе [22] ДНК, добавляли 0,2—2 ед. акт. фермента и с 1—2-мин интервалами отбирали аликвоты, которые наносили на диски из бумаги FN-16. Предварительную и последующую обработку дисков осуществляли как описано в работах [1, 2].

Модификацию фрагмента Кленова реагентами (I) и (II) проводили при 30° С в инкубационной смеси объемом 50—100 мкл, содержащей 50 мМ HEPES-буфер (pH 7,0), 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,22 мМ $MnCl_2$ и 5 мМ NaF, 2,5—10 ед. акт. фермента. При исследовании средства фермента к лигандам в отсутствие $MnCl_2$, когда фермент не проявлял экзонуклеазной активности, инкубационная смесь не содержала NaF. Реакцию инактивации начинали добавлением аффинных реагентов, концентрацию которых варьировали в диапазоне 0,001—100 мкМ. При определении защитных эффектов различных лигандов в присутствии $MnCl_2$ концентрация реагентов была 2 мкМ, а в отсутствие соли — 10 мкМ. В некоторых случаях инкубационная смесь с $MnCl_2$ не содержала NaF. Аликвоты (5—10 мкл) отбирали через каждые 10—20 мин в течение 1—3 ч и вносили их в смеси для определения активности фермента (см. выше). По кинетическим кривым включения меченых dNMP в ДНК определяли ингибирование ДНК-полимеразной активности. Из зависимости логарифма остаточной активности фермента от времени его инкубации с реагентом рассчитывали величины кажущихся констант скоростей инактивации ($k_{каж}$) при фиксированных концентрациях реагентов. Величину константы диссоциации комплекса K_x (K_d) для реагента рассчитывали с помощью линейной анаморфозы [23]:

$$1/k_{каж} = -1/k + K_x X_0,$$

где X_0 — концентрация реагента.

Зависимость $k_{каж}$ от начальной концентрации реагента X_0 и начальной концентрации I_0 конкурентного ему лиганда описывается линейной анаморфозой вида [23]:

$$1/k_{каж} = 1/k + K_x/X_0 k (1 + Y_0/K_y),$$

где K_y — величина K_d комплекса фермента с лигандом, а Y_0 — его концентрация. С помощью этой анаморфозы легко определить значение K_y , если известна концентрация X_0 .

Исследование влияния NaF проводили при 30° С в оптимальных условиях для существования $poly(T) \cdot d(pA)_{10}$ -матрично затравочного комплекса. Реакционная смесь содержала трис-HCl-буфер (pH 7), 5,1 мМ EDTA, 2 мМ KCl, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,5 ОЕ₂₇₀/мл $poly(T)$, 1 мкМ $(pA)_{10}$, 40 мкМ ^{32}H ATP с удельной активностью 100 ТБк/моль и 0,01—50 мМ NaF. При определении величин K_m для $poly(T) \cdot (pA)_{10}$ или ATP использовали 5 мМ NaF.

В экспериментах по исследованию влияния NaF на 3' → 5'-экзонуклеазную активность фрагмента Кленова реакционная смесь не содержала ATP. Расщепление 5'- ^{32}P -меченого $(pT)_{10}$ проводили как в присутствии, так и в отсутствие $poly(A)$ и NaF. Тестирование продуктов расщепления осуществляли радиоавтографическим методом после электрофореза реакционной смеси в ПААГ в денатурирующих условиях [24].

В эксперименте по исследованию влияния ионов CN^- на модифицирующую способность реагентов (I) и (II) использовали стандартную для инактивации фермента инкубационную смесь (см. выше), содержащую 10 мкМ реагент (I) и 5 мМ NaCN. После 3 ч инкубации при 20° С к ней добавляли фермент. Дальнейшее тестирование активности проводили так же, как и в случае реагентов, не обработанных цианидом. В качестве контролей использовали растворы реагентов, инкубированные в аналогичных условиях в отсутствие NaCN.

Для исследования устойчивости координационных связей между атомом азота N3 остатка цитидина и атомом платины реагента реакционную смесь объемом 0,1—5,0 мл, содержащую 5 мМ HEPES-буфер (pH 7,0), 10 мкМ реагент (I) и NaCN в различных концентрациях, инкубировали при 30 или 70° С. Затем 1 мл реакционной смеси подвергали хроматографии на DEAE-целлюлозе в градиенте концентраций KCl в присутствии мочевины, как описано в работе [1]. Фракции, соответствующие олигонуклеотидному реагенту, высушивали упариванием раствора и остаток сжигали. Количество платины в сожженных образцах измеряли колориметрически с помощью реакции со $SnCl_2$, как описано выше.

В условиях разрушения связи между ионом платины реагента (II) и нуклеофильной группой фермента (30° С, 5 мМ NaCN) заметного образования олигонуклеотида dPTTCTTTT не происходило в течение 1—2 сут. Увеличение концентрации NaCN

до 100 мкМ и температуры реакции до 70° С приводило к отщеплению Pt от реагента ($\tau_{1/2} \approx 30$ ч).

Эксперименты по модификации фрагмента Кленова (0,1—0,2 мг/мл) 5'-³²P-меченым реагентом (II) (0,5 мкМ) в присутствии и в отсутствие (Trp)₂C(pT)₇ (1 мкМ), а также эксперименты по демодификации инактивированного фермента действием 5 мМ NaCN проводили по описанному выше методикам аналогичных экспериментов с использованием немеченых реагентов. Анализ включения в белок радиоактивной метки проводили электрофорезом в 10% ПААГ в присутствии 0,4% додецилсульфата натрия. Электрофорез вели 2 ч до выхода из геля 5'-³²P-меченого реагента (II) (следили по выходу из геля бромфенолового сияего). Гель радиоавтографировали и окрашивали с помощью кумасси [25].

Величину K_m для праймеров, дезоксинуклеозидтрифосфатов и K_d для матриц рассчитывали графически с помощью прямого линейного графика Эйзенталь и Корниш-Боудена [6, 26].

ЛИТЕРАТУРА

1. Невинский Г. А., Подуст В. Н., Левина А. С., Халабуда О. В., Лаерик О. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 357—386.
2. Невинский Г. А., Левина А. С., Подуст В. Н., Лаерик О. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 58—68.
3. Nevinsky G. A., Levina A. S., Doronin S. V., Podust V. N., Lavrik O. I. // Biophosphates and their analogues. Synthesis, structure, metabolism and activity / Eds Brusik K. S., Stec W. J. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987. P. 391—394.
4. Lavrik O. I., Levina A. S., Nevinsky G. A., Podust V. N. // FEBS Lett. 1987. V. 2168. № 2. P. 225—228.
5. Левина А. С., Невинский Г. А., Лаерик О. И. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 357—369.
6. Невинский Г. А., Фролова Е. И., Левина А. С., Подуст В. Н., Лебедев А. В. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 45—57.
7. Веняминова А. Г., Левина А. С., Невинский Г. А., Подуст В. Н. // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. Вып. 5. С. 1378—1385.
8. Невинский Г. А., Левина А. С., Фролова Е. И., Подуст В. Н. // Молекулярн. биология. 1987. Т. 21. Вып. 5. С. 1193—1200.
9. Михайлов В. С., Атаева Д. О., Мурынев К. А., Атражес А. М. // Молекулярн. биология. 1989. Т. 23. Вып. 1.
10. Srivastava Sh. K., Gillerman E., Modak M. // Biochem and Biophys. Res. Commun. 1981. V. 101. № 1. P. 183—188.
11. Байков А. А. Структурно-кинетические закономерности катализа неорганической пирофосфатазой и ее использование в биохимическом анализе: Автореф. ... д-ра хим. наук. М.: МГУ, 1986. С. 1—20.
12. Ollis D. L., Brick P., Hamlin R., Xuong N. G., Steitz T. A. // Nature. 1985. V. 313. № 6005. P. 762—766.
13. Chu G. Y., Duncan R. E., Tobias R. S. // Inorg. Chem. 1977. V. 16. № 10. P. 2625—2636.
14. Bauer W., Gonias S. L., Kam S. K., Wu K. C., Lippard S. J. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 6. P. 1060—1068.
15. Fisher P. A., Korn D. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 20. P. 11040—11048.
16. Фрэнкс Ф. Биохимическая термодинамика / Ред. Джоунс М. М.: Мир, 1982. С. 148.
17. Корниберг А. Снятез ДНК. М.: Мир, 1977. С. 71.
18. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980. С. 272—291.
19. Гринберг А. А., Стеценко А. И., Миткинова Н. Д., Тихонова Л. С. // Журн. неорган. химии. 1971. Т. 16. Вып. 1. С. 264—270.
20. Бимши Ф. Аналитическая химия благородных металлов. Т. 2. М.: Мир, 1969. С. 247.
21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 132—134.
22. Noy G. P., Weissbach A. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 477. № 2. P. 70—83.
23. Горикова И. И., Чимитова Т. А. Аффинная модификация биополимеров / Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983. С. 58—65.
24. Махат А. М., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
25. Гааль Э., Медьеша Г., Вереуки Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. С. 212—234.
26. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1978. С. 260—266.

Поступила в редакцию
2.VI.1988

KLENOW FRAGMENT OF DNA-POLYMERASE I FROM *E. COLI*. III.
THE ROLE OF INTERNUCLEOTIDE PHOSPHATES
IN THE BINDING PROCESS OF OLIGONUCLEOTIDE TEMPLATE
WITH THE ENZYME

VOLCHKOVA V. A., GORN V. V., KOLOCHEVA T. I., LAVRIK O. I., LEVINA A. S.,
NEVINSKY G. A., KHOMOV V. V. *

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

** Research Institute of Design and Technology of Biologically Active Substances,
Berdsk, Novosibirsk Region*

The modification of Klenow fragment of DNA polymerase I *E. coli* was investigated by the affinity reagents $d(Tp)_2C[Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$ and $d(pT)_2pC[Pt^{2+}(NH_3)_2OH](pT)_7$. The template binding site of the enzyme was modified by these reagents in the presence of NaF (5 mM), which inhibits selectively the 3' → 5'-exonuclease activity of the enzyme and therefore prevents the reagent from degradation. NaCN destroyed covalent bonds between reagents and enzyme, restoring activity of the Klenow fragment. The affinity of different ligands (inorganic phosphate, nucleoside monophosphates, oligonucleotides) to the template binding site of Klenow fragment was estimated. Minimal ligands capable to bind with the template site were shown to be triethylphosphate (K_d 290 μM) and phosphate (K_d 26 μM). Ligand affinity increases by the factor 1.76 per an added (monomer unit from phosphate to d(pT) and then for oligonucleotides $d(Tp)_nT$ (n 1 to 19–20). At $n > 19-20$, the ligand affinity remained constant. The complete ethylation of phosphodiester groups lowers affinity of the oligothymidylates to the enzyme by ~10 times, and comparable decrease of Pt^{2+} -oligonucleotide affinity to polymerase is caused by the absence of Mn^{2+} -ions. The data obtained led to suggestion that one Me^{2+} -dependent electrostatic contact of the template phosphodiester group with the enzyme takes place ($\Delta G = -1.45 \dots -1.75$ kcal/mole). Formation of a hydrogen bond with the oxygen atom of P = O group of the same template phosphate is also assumed ($\Delta G = -4.8 \dots -4.9$ kcal/mole). Other template internucleotide phosphates do not interact with the enzyme but the bases of oligonucleotides take part in hydrophobic interactions with the template binding site. Gibbs energy changes by -0.34 kcal/mole when the template is lengthened by one unit.