



УДК 577.113.3:547.963.057

СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА ДИНУКЛЕОЗИД-5',5''-ОЛИГОФОСФАТОВ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗОЙ ВИЧ, ДНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ I *E. coli* И РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ *E. coli*

© 2005 г. А. Ю. Скоблов, В. В. Сосунов, Л. С. Викторова[#], Ю. С. Скоблов, М. К. Куханова

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

Поступила в редакцию 13.10.2003 г. Принята к печати 04.12.2003 г.

Синтезированы динуклеозид-5',5''-олигофосфаты $d(Np_4N')$, dTp_3rA , dTp_4rA и dTp_5rA , изучены их субстратные свойства в отношении обратной транскриптазы ВИЧ, фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и РНК-полимеразы *E. coli*. Предложена модель взаимодействия обратной транскриптазы ВИЧ с динуклеозидолигофосфатами, подтвержденная экспериментально. Определены кинетические константы некоторых из синтезированных соединений для обратной транскриптазы ВИЧ.

Ключевые слова: динуклеозидолигофосфаты; обратная транскриптаза ВИЧ; фрагмент Кленова; РНК-полимераза *E. coli*.

ВВЕДЕНИЕ

При изучении ферментативных механизмов синтеза нуклеиновых кислот успешно используются различные модифицированные нуклеозид-5'-трифосфаты, являющиеся аналогами природных субстратов в биосинтезе ДНК или РНК. Такие соединения могут содержать как отдельные модификации гетероциклического основания, углеводной или фосфатной части молекулы, так и несколько модификаций одновременно.

Модификации фосфатной части нуклеотидов, в свою очередь, могут затрагивать как α -фосфатную, так и β, γ -пирофосфатную группы. Описанные ранее фосфонатные аналоги нуклеотидов, модифицированных по α -фосфату, оказались весьма интересными как с научной, так и с прикладной точек зрения [1, 2]. В литературе описаны различные нуклеозид-5'-трифосфаты, содержащие вместо β, γ -пирофосфатной группы метилendifосфоновый или иминодифосфоновый остаток. Изучение субстратных свойств таких аналогов в отношении ферментов биосинтеза нуклеиновых кислот значительно расширило понимание механизма ферментативного действия [3, 4].

В последние годы были синтезированы и детально изучены нуклеозид-5'-трифосфаты, модифицированные по γ -фосфату [5, 6]. Было показано, что замена γ -фосфата в $dNTP$ на арилфосфонат или алкилфосфонат не препятствует их узнаванию обратными транскриптазами вируса

иммунодефицита человека (ОТ ВИЧ) и вируса мислоблостоа птиц (ОТ ВМП), но существенно снижает их сродство к ДНК-полимеразам человека. Помимо этого, многие аналоги нуклеозидтрифосфатов – нуклеозидтрифосфонаты, содержащие модификации по двум (α, γ - и β, γ -) и трем (α, β, γ -) положениям – обладали повышенной гидрофобностью и стабильностью к действию дефосфорилирующих ферментов крови человека [7].

Недавно было обнаружено, что ОТ ВИЧ в присутствии некомплементарных $dNTP$ или $dNDP$ способна к разблокированию терминированной ДНК. Иными словами, если на 3'-конце синтезирующейся ДНК находится остаток терминирующего субстрата, то при добавлении некомплементарных нуклеотидов происходит удаление этого остатка с образованием соответствующих динуклеозидтетрафосфатов или динуклеозидтрифосфатов [8]. Нами было показано, что такая реакция псевдопирофосфоролита с образованием динуклеозидтетрафосфата имеет место и в том случае, когда ДНК не содержит терминирующего остатка, а в роли пирофосфата выступает некомплементарный L - $dNTP$; такую реакцию катализируют и другие ферменты – ОТ ВМП и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I (далее – фрагмент Кленова) [9]. Эти результаты позволили предположить, что динуклеозидтетрафосфаты, являясь продуктами обратной реакции – псевдопирофосфоролита, могут быть субстратами и для прямой реакции – синтеза ДНК, катализируемой ДНК-полимеразой и обратными транскриптазами.

Ранее нами было показано, что соединения типа $dNp_x dN'$ ($x = 3$ или 4) проявляют субстратные свойства в реакциях синтеза ДНК, катализируе-

Сокращения: ОТ ВИЧ и ОТ ВМП – обратные транскриптазы вируса иммунодефицита человека и вируса мислоблостоа птиц.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 135-60-74, 135-60-65; эл. почта: lhba@eimb.relam.ru).

Таблица 1. Характеристики синтезированных соединений (I)–(XIV)

Соединение	Структура	Выход, %	³¹ P-ЯРМ (P^{α} , P^{β})	ϵ^* , М ⁻¹ см ⁻¹ (λ , нм)	τ^{**} , мин
(I)	d(Ap ₄ A)	70	11.2 м; 22.9 м	26 100 (259)	23.6
(II)	d(Ap ₄ T)	51	11.4 м; 22.9 м	24 920 (262.2)	21.4
(III)	d(Ap ₄ C)	46	11.2 м; 23.0 м	22 925 (263.3)	18.2
(IV)	d(Ap ₄ G)	44	11.3 м; 22.9 м	28 438 (256.8)	22.5
(V)	d(Tp ₄ T)	75	11.5 м; 23.1 м	17 360 (267.3)	21.0
(VI)	d(Tp ₄ C)	47	11.4 м; 22.9 м	19 650 (270.2)	15.5
(VII)	d(Tp ₄ G)	53	11.4 м; 23.1 м	20 429 (257.9)	20.6
(VIII)	d(Cp ₄ C)	68	11.1 м; 22.8 м	16 545 (272.5)	12.7
(IX)	d(Cp ₄ G)	48	11.2 м; 23.0 м	18 789 (271.3)	16.6
(X)	d(Gp ₄ G)	62	11.3 м; 22.9 м	24 700 (252.5)	21.7
(XI)	dTp ₃ rA	61	(11.3 м, 11.5 м); 22.9 м	24 920 (262.2)	20.0
(XII)	dTp ₄ rA	54	11.5 м; 23.1 м	24 920 (262.2)	19.5
(XIII)	dTp ₃ rA	36	–	24 920 (262.2)	19.3
(XIV)	p ₄ dT	49	–	9 600 (267.3)	15.8

* ϵ – молярный коэффициент поглощения при указанной длине волны (нм), принимаемый при расчете концентраций соединений.

** τ – время удерживания при ВЭЖХ в условиях, описанных в “Эксперимент. части”.

мых ДНК-полимеразами α и β человека, ДНК-полимеразой I *E. coli*, ДНК-полимеразой *Thermus aquaticus* и ОТ ВИЧ [10]. При этом они включаются в цепь ДНК одним из двух нуклеотидных остатков в соответствии с контекстом матрицы без предварительного гидролиза до динуклеозидтрифосфата и нуклеозидмонофосфата (в случае dNr₄dN'). Субстратная активность соединений зависела от длины фосфатной части (тетрафосфаты были активнее трифосфатов) и от природы фермента. Наибольшую активность, близкую к активности dNTP, динуклеозидтетрафосфаты проявляли в реакциях, катализируемых ОТ ВИЧ и фрагментом Кленова. Поскольку динуклеозидолигофосфаты можно рассматривать и как модифицированные по γ -фосфату dNTP, эти результаты хорошо согласуются с результатами, полученными ранее [5–7].

В данной работе представлен синтез различных динуклеозидолигофосфатов и результаты изучения их субстратных свойств в реакциях синтеза нуклеиновых кислот, катализируемых ОТ ВИЧ, фрагментом Кленова и РНК-полимеразой *E. coli*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Соединения (I)–(XII) (табл. 1) были синтезированы по описанным ранее методикам [11, 12] с некоторыми модификациями. В качестве активируемой I, I'-карбонилдимидазолом компоненты использовали нуклеозид-5'-монофосфат и конденсировали его с соответствующим нуклеозид-5'-дифосфатом или 5'-трифосфатом. Таким же образом были синтезированы соединения (XIII) и (XIV), при

этом вместо нуклеозид-5'-монофосфата активировали тимидин-5'-дифосфат с последующей конденсацией его с пирофосфатом (для соединения (XIV)) или АТФ (для соединения (XIII)). Выходы соединений (I)–(XIV) и их характеристики приведены в табл. 1.

Субстратные свойства соединений в реакциях, катализируемых ДНК-полимеразами, изучали с использованием четырех праймер-матричных комплексов, где матрицей служил 55-членный гетерогенный полинуклеотид, а праймерами – 14-членные последовательности PRA, PRG, PRC и PRT (схема). Последовательности были выбраны таким образом, чтобы каждый из четырех dNTP мог включаться в соответствующий праймер в односубстратной реакции. Эти же комплексы были использованы для определения K_m и K_i в односубстратных реакциях для этих соединений. Для синтеза протяженных цепей ДНК использовали те же праймеры в комплексе с ДНК фага M13mp10 (55-членная матричная последовательность представляет собой участок этой ДНК). Кроме того, для изучения ингибирования синтеза ДНК, катализируемого ОТ ВИЧ, в качестве праймер-матричного комплекса использовали дуплекс poly(rA)/oligo(dT).

В первой серии экспериментов в катализируемых ОТ ВИЧ и фрагментом Кленова односубстратных реакциях сравнивали активность соединений, у которых один из нуклеозидов комплементарен матрице в соответствующем праймер-матричном комплексе, а второй – варьирует, т.е. соединений (I)–(IV) (матрица/PRA), соединений (IV), (VII), (IX) и (X) (матрица/PRG), соединений (III),

Матричный олигонуклеотид (3' → 5')

d (AGGGTCAGTGCTGCAACATTTTGCTGCCGGTCACGGTTCGAACCCGACGTCCAGC

Праймеры (5' → 3'):

d (GTAAAACGACGGCC)	PRA
d (AAACGACGGCCAGT)	PRG
d (TGTA AAAACGACGGC)	PRC
d (CCCAGTCACGACGT)	PRT

Схема.

(VI), (VIII) и (IX) (матрица/PRC) и соединений (II), (V)–(VII) (матрица/PRТ).

Как показало сравнение интенсивностей полос на автографах электрофореграмм после разделения продуктов реакций, не наблюдается существенных различий в субстратной активности для этих рядов нуклеозидтетрафосфатов. То есть, независимо от нуклеозида, присоединенного к γ -фосфату, соединения (I)–(X) с близкой эффективностью включались в соответствующие праймеры. На рис. 1 продемонстрированы результаты, полученные для соединений (III) и (IV) в реакциях, катализируемых ОТ ВИЧ и фрагментом Кленова

соответственно. Видно, что в обоих случаях dATP (дорожки 2–4) примерно на порядок более эффективно включается в цепь праймера, чем соединения (IV) (дорожки 5–8) и (III) (дорожки 9–11). Для других четырех праймер-матричных комплексов различие между субстратной эффективностью природного субстрата и тестируемых соединений было даже менее выражено. Следует заметить, что на дорожках 5–8 праймер удлиняется более чем на один нуклеотид, поскольку у соединения (IV) основание второго нуклеозида комплементарно следующему нуклеиновому основанию матрицы. Ошибочное включение, которое хорошо видно на дорожках 7 и 8, часто возникает в модельных реакциях синтеза ДНК с ограниченным набором субстратов [13].

В системе полного синтеза ДНК на гетерогенной матрице фага M13mp10 анализ продуктов ферментативных реакций показал, что для ОТ ВИЧ и фрагмента Кленова динуклеозидтетрафосфаты (I)–(X) являются хорошими субстратами и образуют довольно протяженные цепи ДНК. На рис. 2 в качестве примера приведен радиоавтограф электрофореграммы разделения продуктов матричного синтеза ДНК, катализируемого ОТ ВИЧ, при одновременном присутствии в пробах dAr₄dC (III) и dTr₄dG (VII). Видно, что при равных концентрациях они с близкой эффективностью заменяют все четыре природных dNTP (дорожки 9–11 и 6–8 соответственно). Для остальных соединений – (II), (IV), (VI), (VIII)–(X) – автографы электрофореграмм не приведены, так как были получены сходные результаты. Аналогичные результаты были получены и в системе с фрагментом Кленова (данные также не приведены).

Влияние длины фосфатного остатка на субстратные свойства динуклеозидолигофосфатов. Ранее нами было показано [10], что в дезокси-ряду субстратная активность динуклеозидтетрафосфатов выше, чем динуклеозидтрифосфатов. Поэтому представлялось интересным выяснить, способны ли динуклеозидолигофосфаты, включающие как рибо-, так и дезоксирибонуклеозиды, быть субстратами ОТ ВИЧ и ДНК- и РНК-полимераз *E. coli* и зависит ли активность этих соеди-

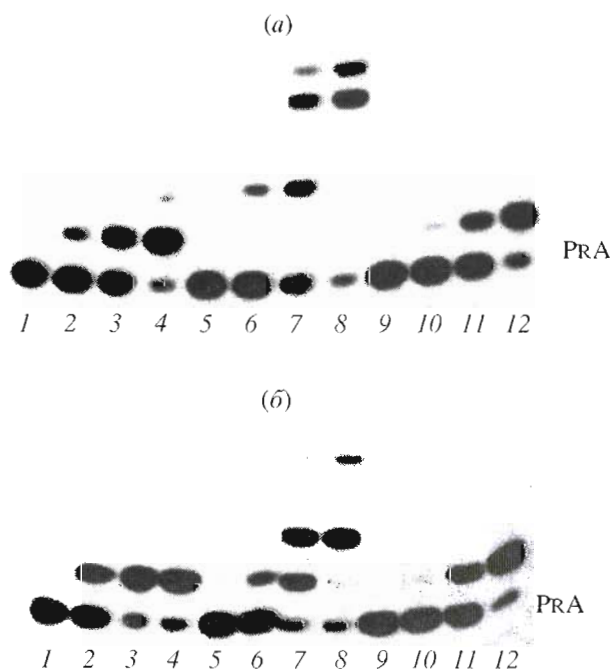


Рис. 1. Включение остатка dAMP по 3'-концу праймера, катализируемое ОТ ВИЧ (а) и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (б) в комплексе матрица/PRA (дорожка 1, контроль), в присутствии: dATP в концентрации 0.002 (2), 0.02 (3) и 0.2 мкМ (4); d(Ar₄G) (IV) в концентрации 0.002 (5), 0.02 (6), 0.2 (7) и 2 мкМ (8); d(Ar₄C) (III) в концентрации 0.002 (9), 0.02 (10), 0.2 (11) и 2 мкМ (12).



Рис. 2. Элонгация праймера, катализируемая ОТ ВИЧ в комплексе ДНК M13mp10/PRA (дорожка 1, контроль), в присутствии суммы дезоксирибонуклеотидтрифосфатов dATP, dGTP, dCTP и dTTP при концентрации каждого 0.02 (6), 0.2 (7) и 2 мкМ (8); в присутствии d(Ap₄C) (III) и d(Tp₄G) (VII) при концентрации каждого 0.02 (9), 0.2 (10) и 2 мкМ (11), а также терминирование синтеза ДНК в присутствии 1 мкМ дидезоксирибонуклеотидтрифосфатов: ddATP (2), ddGTP (3), ddCTP (4), ddTTP (5).

нений от длины их фосфатной части. С этой целью были синтезированы соединения (XI)–(XIII), содержащие dT и гА на концах молекул и три-, тетра- и пентафосфатный остаток.

В системе с ОТ ВИЧ (рис. 3а) наблюдалась следующая зависимость способности соединений

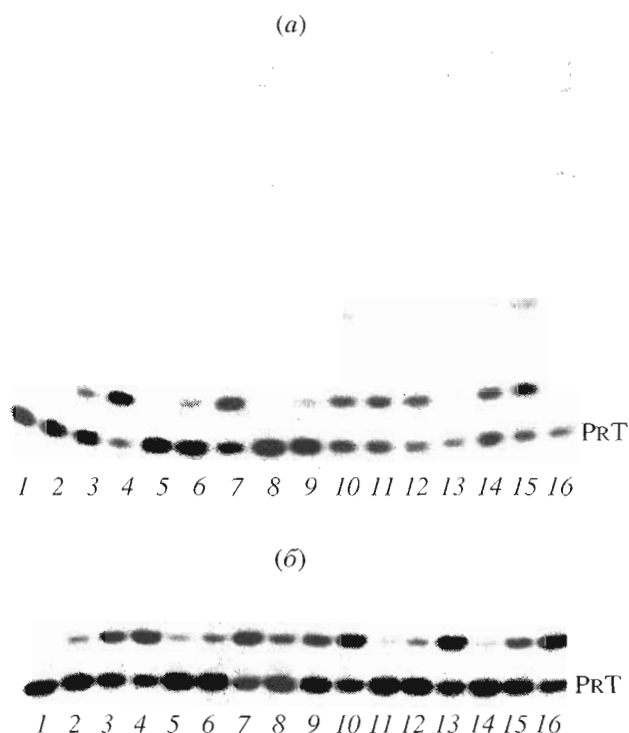


Рис. 3. Продукты односубстратной реакции удлинения праймера, катализируемой ОТ ВИЧ (а) и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (б) в комплексе матрица/PRT (дорожка 1, контроль), в присутствии: а) dTTP в концентрации 0.01 (2), 0.1 (3) и 1 мкМ (4); p₄dT (XIV) в концентрации 0.01 (5), 0.1 (6) и 1 мкМ (7); dTp₃rA (XI) в концентрации 0.1 (8), 1 (9) и 10 мкМ (10); dTp₄rA (XII) в концентрации 0.1 (11), 1 (12) и 10 мкМ (13); dTp₅rA (XIII) в концентрации 0.1 (14), 1 (15) и 10 мкМ (16). б) dTTP в концентрации 0.1 (2), 1 (3) и 10 нМ (4); p₄dT (XIV) в концентрации 0.1 (5), 1 (6) и 10 нМ (7); dTp₃rA (XI) в концентрации 0.1 (8), 1 (9) и 10 мкМ (10); dTp₄rA (XII) в концентрации 0.001 (11), 0.01 (12) и 0.1 мкМ (13); dTp₅rA (XIII) в концентрации 0.01 (14), 0.1 (15) и 1 мкМ (16).

(XI)–(XIII) удлинять праймер PRT на одно звено. Соединения dTp₄rA (XII), dTp₅rA (XIII) и контрольное соединение – 5'-тетрафосфат тимидина, p₄T (XIV) (дорожки 11–13, 14–16 и 5–7 соответственно) проявляли на порядок меньшую активность, а dTp₃rA (XI) был на два порядка менее активным в односубстратной реакции, чем dTTP (дорожки 8–10 и 2–4 соответственно). Удлинение праймера более чем на одно звено, наблюдаемое для соединений (XI)–(XIII), свидетельствует об ошибках этого фермента в модельных реакциях, о чем уже упоминалось выше.

Эти соединения с различной эффективностью участвовали в элонгации праймера PRT при катализе фрагментом Кленова (рис. 3б). Следует отметить, что в этом случае наблюдалась иная зависимость субстратных свойств соединений (XI)–(XIII) от длины фосфатного остатка. Контрольное со-

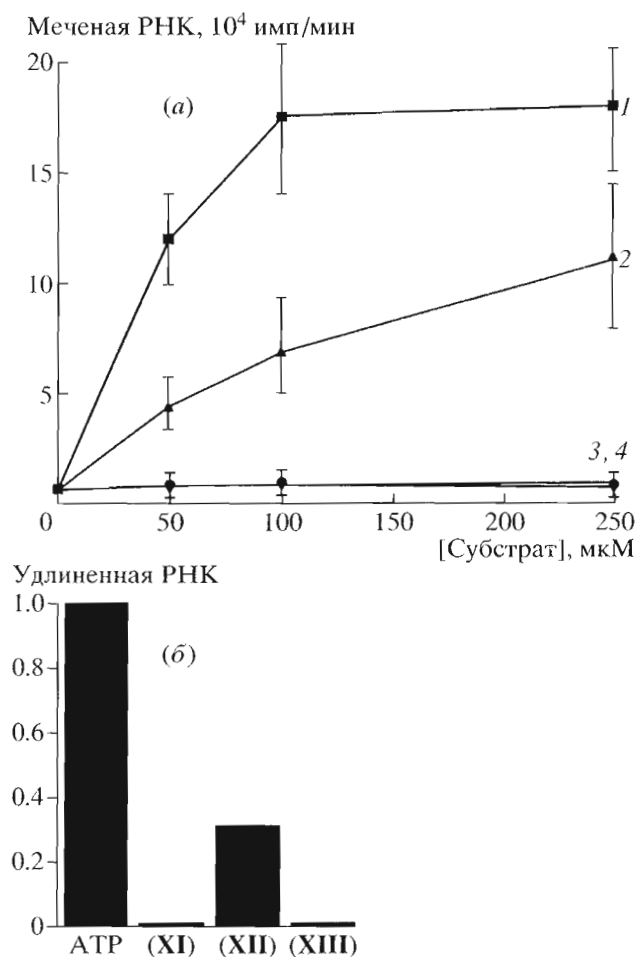


Рис. 4. Субстратная активность соединений (XI)–(XIII) в синтезе РНК при катализе РНК-полимеразой *E. coli*. а) Концентрационная зависимость образования радиоактивной РНК, катализируемой РНК-полимеразой *E. coli*, в присутствии [α -³²P]rUTP, rGTP, rCTP и либо гАТР (дорожка 1 – контроль), либо соединений (XI) – дорожка 3, (XII) – дорожка 2 и (XIII) – дорожка 4. б) Относительное количество радиоактивно меченой РНК, образующейся при удлинении на одно звено 21-членной РНК, содержащей на 3'-конце [α -³²P]rUMP, в присутствии гАТР или соединений (XI)–(XIII) в концентрации 1 мкМ.

единение р₄T (XIV) и dTr₄gA (XII) (дорожки 5–7 и 11–13 соответственно) были на порядок, пентафосфат (XIII) (дорожки 14–16) – на два порядка, а трифосфат (XI) (дорожки 8–10) – на три порядка менее активны в удлинении праймера на один нуклеотидный остаток, чем dTTP (дорожки 2–4).

Мы проверили, способны ли эти соединения включаться в РНК, синтезируемую РНК-полимеразой *E. coli*. На рис. 4 представлены результаты, полученные в системе полного синтеза РНК (а) и в системе включения остатка гАМР в РНК по 3'-концу в односубстратной реакции (б). Видно, что в обоих случаях активность динуклеозидтетрафосфата (XII) (кривая 2) всего в 2–3 раза ниже активности гАТР (рис. 4а, кривая 1 и рис. 4б), а три-

фосфат (XI) и пентафосфат (XIII) практически не проявляют субстратных свойств по отношению к этому ферменту (рис. 4а, кривые 3, 4 и рис. 4б). Таким образом, было показано, что динуклеозидтетрафосфаты являются субстратами как ДНК-, так и РНК-полимераз *E. coli* с активностью, практически не уступающей активности dNTP и rNTP соответственно.

Для объяснения полученных результатов по влиянию длины фосфатного мостика в соединениях (XI)–(XIII) на их субстратные свойства была построена модель активного центра ОТ ВИЧ. За основу была взята структура тройного элонгационного комплекса фермент–праймер–матрица–dTTP [14]. С γ -фосфатом dTTP из исходной структуры мы соединили либо аденозин (через 5'-ОН-группу), либо остаток гАМР (через концевой фосфат), смоделировав таким образом dTr₃gA (XI) и dTr₄gA (XII) соответственно (рис. 5а и 5б). Расположение аминокислотных остатков, праймера, матрицы, dTTP и ионов магния (А и В) в предлагаемой модели полностью соответствует их расположению в исходной структуре [14]. Моделирование динуклеозидтетрафосфатов осуществлялось таким образом, чтобы не возникало их стерических перекрытий с молекулой фермента. В случае динуклеозидтетрафосфата (XII) остаток аденозина и фосфатная часть были расположены приблизительно так же, как и в модели из работы [15], в которой было представлено положение АТР в активном центре фермента при реакции псевдопирофосфоролита (реакции, обратной включению dNr₄gA в цепь ДНК). Экспериментальные данные демонстрируют, что dTr₄gA (XII) и dTr₃gA (XIII) на порядок эффективнее, чем dTr₃gA (XI), включаются в ДНК при катализе ОТ ВИЧ. Из модели следует, что стерических затруднений при связывании dTr₄gA (XII) (рис. 5б) с активным центром полимеразы не возникает. В случае пентафосфата (XIII) остаток аденозина, вероятно, находится за пределами молекулы. Модель, представленная на рис. 5в, демонстрирует, что активный центр фермента расположен на краю молекулы, и даже в случае dTr₄gA (XII) аденозин находится практически за его пределами. В случае трифосфата (XI) в непосредственной близости с аденином оказывается остаток Glu40, а с С5'-атомом – остаток Lys65. И хотя dTr₃gA (XI) удается расположить без стерических перекрытий с молекулой фермента, возможно, что эти остатки все-таки могут затруднять образование продуктивного фермент-субстратного комплекса. Помимо этого, меньшую активность dTr₃gA по сравнению с динуклеозидтетра- и пентафосфатами (XII) и (XIII) можно отчасти объяснить тем, что теоретически этот субстрат может менее эффективно связывать ион Mg²⁺.

Из нашей модели следует, что как в случае dTr₃gA (XI), так и в случае dTr₄gA (XII) остаток

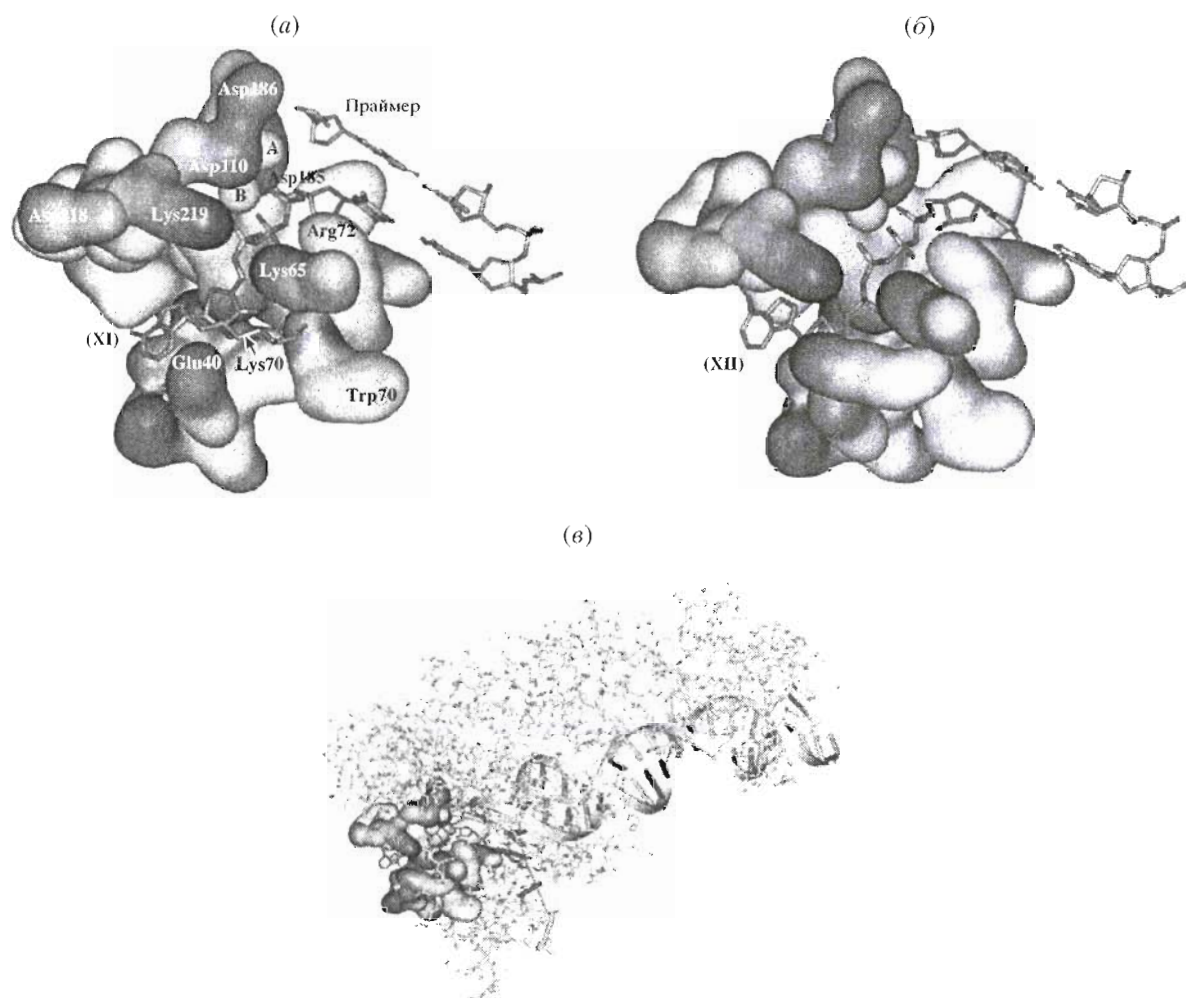


Рис. 5. Модель активного центра ОТ ВИЧ в присутствии $d\text{Trp}_3\text{A}$ (а) и $d\text{Trp}_4\text{A}$ (б). Общий вид субъединицы r66 (в), аминокислотные остатки в районе активного центра показаны в виде поверхностей; виден расположенный в активном центре $d\text{Trp}_4\text{A}$.

аденозина оказывается в окружении негидрофобных аминокислотных остатков (Thr215, Glu44, Lys46). Это означает, что фермент должен слабо дискриминировать второй нуклеозидный остаток субстрата. Дальнейшие эксперименты, результаты которых изложены ниже, подтверждают справедливость гипотезы о том, что природа второго нуклеотидного остатка не влияет на включение в праймер первого.

Аналогичная модель была построена нами и для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I на основе структуры закрытого тройного элонгационного комплекса фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *T. aquaticus* [16]. Основным отличием от модели для ОТ ВИЧ, приведенной на рис. 5, является большая компактность активного центра и наличие консервативного остатка аргинина (Arg659), который взаимодействует с γ -фосфатом входящего субстрата. Вследствие этого фрагмент Клено-

ва ДНК-полимеразы I оказывается способным к дискриминации $d\text{Trp}_x\text{A}$ ($x = 3, 4, 5$) в зависимости от количества фосфатных остатков в молекуле. Таким образом, построенные модели согласуются с экспериментальными данными по субстратной специфичности динуклеозидолигофосфатов.

Влияние второго нуклеотидного остатка на субстратные свойства соединений. На следующем этапе исследований было изучено влияние второго нуклеотидного остатка $d\text{Np}_x\text{dN}'$ на субстратную активность первого. Для соединений (II), (V)–(VII), одним из нуклеиновых оснований у которых является тимин, были определены значения K_m и V_{\max} в односубстратной реакции присоединения остатка $d\text{TMP}$ к праймеру в комплексе матрица/PRT, катализируемой ОТ ВИЧ (табл. 2). Константы определяли графическим методом как описано в работах [17, 18].

Таблица 2. Константы Михаэлиса (K_m) и отношения скоростей реакций ($V_{max}/V_{max} \text{ dTTP}$) для соединений (II), (V)–(VII) в катализируемых ОТ ВИЧ реакциях удлинения праймера на остаток dTMP в комплексе матрица/PRT. Приведены средние значения пяти независимых экспериментов

Соединение	K_m , мкМ	$V_{max}/V_{max} \text{ dTTP}$
dTTP	0.40 ± 0.15	1
d(Tr ₄ T) (V)	0.72 ± 0.21	0.73
d(Ap ₄ T) (II)	2.11 ± 0.69	0.81
d(Tr ₄ C) (VI)	2.22 ± 1.19	0.91
d(Tr ₄ G) (VII)	1.74 ± 0.79	0.66

Следует отметить, что значения V_{max} для всех четырех соединений несколько ниже, чем для dTTP, и отличаются между собой менее чем на 30%, что не превышает ошибки измерения. Для соединений (II), (VI) и (VII) значения K_m оказались практически одинаковыми и примерно в 5 раз большими, чем для dTTP, что свидетельствует об уменьшении сродства фермента к динуклеозидтетрафосфатам независимо от природы их второго нуклеотидного остатка. У симметричного субстрата dTr₄dT (V) сродство к ферменту выше, чем у остальных соединений, и только в 2 раза отличается от сродства dTTP. Это, возможно, отчасти объясняется тем, что после присоединения к праймеру остатка TMP продуктами реакции являются удлиненный на одно звено праймер в комплексе с матрицей и dTTP. Величина K_m dTTP для ОТ ВИЧ, определенная нами, близка к недавно опубликованной [19]. При этом следует отметить, что измеряемая K_m для любого субстрата зависит

от конкретных условий проведения реакции, поэтому полученные разными авторами значения K_m для субстратов ДНК-полимераз могут сильно различаться.

Ингибирование синтеза ДНК динуклеозидтетрафосфатами. Определение K_m и V_{max} для всех соединений (I)–(XIV) – очень трудоемкая и дорогостоящая задача. Поэтому для дальнейшей оценки взаимодействия ОТ с изучаемыми соединениями мы воспользовались их способностью конкурировать с dNTP в ходе элонгации цепи ДНК и, как следствие, ингибировать эту реакцию. Сначала мы качественно оценили влияние соединений (V)–(VII) на РНК-зависимый синтез ДНК, катализируемый ОТ ВИЧ, по ингибированию ими включения остатка [³H]dTMP в oligo(dT) на матрице poly(rA). В качестве положительного контроля использовали нерадиоактивный dTTP, что фактически приводило к изотопному разбавлению исходного [³H]dTTP. Как видно на рис. 6, соединения (V)–(VII) уменьшают включение [³H]dTTP в ДНК, но существенно хуже, чем dTTP. При этом соединения (VI) и (VII) влияли на реакцию практически одинаково, а симметричный тетрафосфат (V) по своему действию занимает промежуточное положение между соединениями (VI), (VII) и dTTP. Видимо, это обусловлено не столько влиянием на фермент природы заместителя по γ-положению субстрата, сколько возможностью участия в дальнейшей реакции образующегося продукта реакции – dTTP, как и в случае описанного выше определения K_m соединения (V) в односубстратной реакции.

Аналогичный подход мы использовали для изучения влияния динуклеозидтетрафосфатов на ДНК-зависимый синтез ДНК, а именно, ингибирования этими соединениями включения в ДНК радиоактивно меченных dNTP в односубстратной реакции. Таким образом, для комплекса матрица/PRT в качестве меченого субстрата использовали [³²P]dTTP, реакцию проводили в присутствии соответствующих соединений (II), (V) и (VI) и без них, а для комплекса матрица/PRA использовали [³²P]dATP с соединениями (II), (III) и (IV) и без них. При определении констант ингибирования для обработки полученных результатов использовали графический метод Диксона (см. “Эксперимент. часть”). На рис. 7 в качестве примера приведены графики ингибирования соединением (III) включения в PRA остатка [³²P]dAMP для трех концентраций dATP: 0.5, 0.75 и 1 мкМ. Характер пересечения экспериментальных линий говорит о конкурентном ингибировании реакции, а абсцисса точки пересечения соответствует $-K_i$.

Следует подчеркнуть, что для выяснения влияния природы второго основания на субстратные свойства соединений не так важны абсолютные величины K_i , как количественное сравнение по-

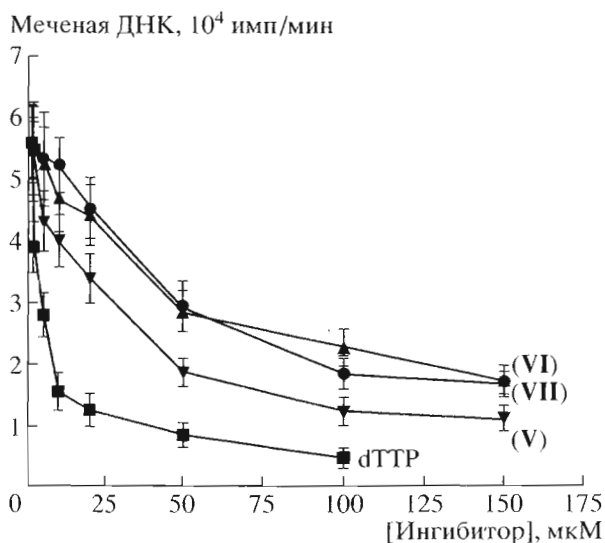


Рис. 6. Ингибирование динуклеозидтетрафосфатами (V)–(VII) включения [³H]dTMP в poly(rA)/oligo(dT) в реакциях, катализируемых ОТ ВИЧ.

лученных в одинаковых условиях констант ингибирования для соответствующих рядов соединений (II), (III) и (IV) для включения в праймер остатка $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dAMP}$ и (II), (V) и (VI) – остатка $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ с K_i для природных dNTP. При рассмотрении взаимодействия фермента с субстратом изотопное разбавление $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ или $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ соответствующим нерадиоактивным dNTP в строгом смысле не может считаться ингибированием (за исключением особого случая – ингибирования очень высокими концентрациями субстрата). Снижение радиоактивности продукта ферментативной реакции при изотопном разбавлении субстрата обусловлено не снижением скорости ферментативной реакции (т.е. ее ингибированием), а самим изотопным разбавлением. Тем не менее, следуя сугубо формально аналогичной математической процедуре, мы обработали экспериментальные данные и определили кажущиеся K_i для dATP и dTTP. Эти K_i для dATP и dTTP, по-видимому, не имеют физического смысла (непонятно, как сравнивать эффективность конкуренции субстрата с самим собой), однако они оказались полезными в качестве эталона для сравнения с K_i для исследуемых соединений.

В табл. 3 приведены отношения констант ингибирования реакций удлинения PRA и PrT на одно звено соединениями (II)–(VI) к кажущимся константам ингибирования соответствующими немечеными dNTP. Как видно, эти данные хорошо согласуются с результатами по ингибированию РНК-зависимого синтеза ДНК и подтверждают вывод о слабом влиянии природы заместителя у γ -фосфата нуклеозид-5'-трифосфатов на ферментативную активность ОТ ВИЧ [5]. Обращают на себя внимание результаты, полученные для соединения (II). Его эффективность как конкурентного ингибитора по отношению к dATP в два раза ниже, чем к dTTP. Это объясняется большим сродством ОТ ВИЧ к dATP, чем к dTTP [20], что косвенно подтверждается и нашими результатами – соединения (II), (III) и (IV) менее эффективно ингибируют включение в ДНК dATP, чем соединения (II), (V) и (VI) – включение dTTP.

Таким образом, в настоящей работе показано, что динуклеозидтетрафосфаты являются лучшими субстратами ОТ ВИЧ, ДНК- и РНК-полимераз *E. coli*, чем динуклеозидтрифосфаты и динуклеозидпентафосфаты. Природа второго основания $\text{dNp}_2\text{dN}'$ мало сказывается на активности этих соединений в катализируемых ОТ ВИЧ реакциях синтеза ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Очистку и обезвоживание растворителей проводили по стандартным методикам. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре UV-2401PC (Shimadzu, Япония). Спектры ЯМР регистрирова-

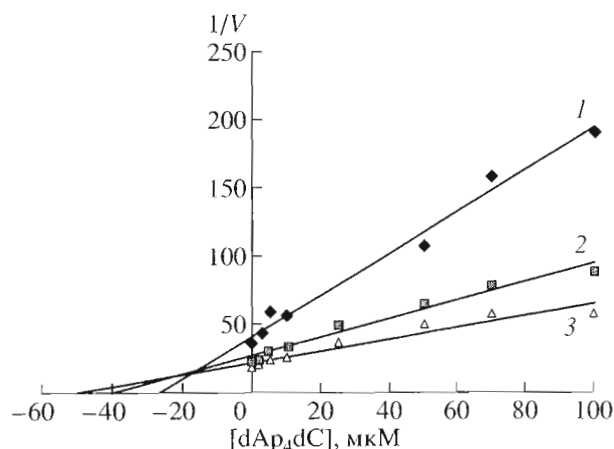


Рис. 7. Графическое определение K_i для dAp_4dC (III) в катализируемой ОТ ВИЧ реакции включения остатка $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dAMP}$ по 3'-концу праймера в комплексе матрица/PRA. Реакции проводили при трех концентрациях $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$: 0.5 (1), 0.75 (2) и 1 мкМ (3). На оси абсцисс отложены концентрации ингибитора, на оси ординат – обратная величина скорости реакции. Скорость определялась как количество радиоактивно меченного продукта в нмоль, образовавшегося за 10 мин инкубации.

ли на спектрометре AMX100 (Bruker, Германия). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel₆₀ (Merck, Германия), используя системы изопропанол – аммиак – вода, 7 : 2 : 1, и диоксан – изопропанол – аммиак – вода, 3 : 2 : 2 : 4. Анализ соединений (I)–(XII) с помощью ВЭЖХ проводили на колонке Lichrosorb C-18, 7 мкм, 4 × 150 мм с элюцией градиентом концентраций раствора А (70% EtOH) в растворе Б (50 мМ тетраэтиламмоний борат). Скорость элюции 0.5 мл/мин. Градиент: 5 мин –

Таблица 3. Относительная эффективность ингибирования соединениями (II)–(VI) реакции элонгации ДНК, катализируемой ОТ ВИЧ

Соединение	Отношения K_i/K_i dNTP* для соответствующих праймер-матричных комплексов	
	PrT	PRA
dATP**	–	1
$\text{d}(\text{Ap}_4\text{C})$ (III)	–	10
$\text{d}(\text{Ap}_4\text{G})$ (IV)	–	30
$\text{d}(\text{Ap}_4\text{T})$ (II)	7	15
$\text{d}(\text{Tp}_4\text{T})$ (V)	3	–
$\text{d}(\text{Tp}_4\text{C})$ (VI)	6	–
dTTP**	1	–

* Для расчетов использовали средние значения K_i , полученные для каждого из соединений в трех независимых экспериментах.

** Величины кажущихся K_i составляют для dATP 2 ± 0.3 мкМ, для dTTP 6 ± 2 мкМ.

0% А, 10 мин – 5% А, 30 мин – 15% А, 35 мин – 100% А.

В работе использовали dNTP, rNTP и ddNTP фирмы “Boehringer Mannheim” (Германия). Радиоактивно меченные соединения [γ - ^{32}P]rATP, [α - ^{32}P]dATP, [α - ^{32}P]dTTP и [α - ^{32}P]rUTP с уд. активностью 3000 Ки/ммоль, а также [^3H]dTTP с уд. активностью 18 Ки/ммоль производства В/о “Изотоп”.

Синтез исследуемых веществ осуществляли по описанным ранее методикам [11, 12] с некоторыми модификациями.

а) Динуклеозидолигофосфаты. К раствору 0.5 ммоль соответствующего нуклеозид-5'-монофосфата в 5 мл сухого DMF добавляли 0.55 ммоль 1,1'-карбонилдиимидазола, инкубировали 1 ч при комнатной температуре, прибавляли 0.7 ммоль трибутиламмониевой соли соответствующего нуклеозид-5'-дифосфата или нуклеозид-5'-трифосфата и оставляли на ночь при перемешивании. Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью ТСХ. Реакционную смесь разбавляли водой до 300 мл, и целевой продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии на DEAE-Toyorearl (Япония) в градиенте гидрокарбоната аммония.

б) Соединения (XIII) и (XIV). К раствору 0.5 ммоль тимидин-5'-дифосфата в 5 мл сухого DMF прибавляли 0.6 ммоль 1,1'-карбонилдиимидазола, инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем прибавляли 0.7 ммоль трибутиламмониевой соли пиродифосфата или rATP и оставляли на ночь. Дальнейшие операции аналогичны описанным выше для синтеза динуклеозидолигофосфатов.

Ферменты и ДНК. В работе использовали следующие ферменты: фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* [КФ 2.7.7.7] (Boehringer Mannheim, Германия), ОТ ВИЧ [КФ 2.7.7.49] и Т4-полиинуклеотидкиназу (Amersham Pharmacia Biotech, США). РНК-полимеразу *E. coli* [КФ 2.7.7.6], содержащую остатки His, реконструировали из индивидуальных субъединиц по методу [21]. Одноцепочечную ДНК фага M13mp10 выделяли из культуральной жидкости реципиентного штамма *E. coli* K12XL1 как описано ранее [22].

Тетрадекануклеотидные праймеры и 55-членную матричную ДНК (см. схему) фирмы “Литех” (Москва) использовали в работе без дополнительной очистки. Праймеры метили по 5'-концу, используя [γ - ^{32}P]ATP и Т4-полиинуклеотидкиназу по методу [23]. Праймер-матричные комплексы получали, инкубируя 5'-меченые праймеры с матрицей в буфере, содержащем 10 mM Трис-НСl, pH 8.0, и 5 mM MgCl₂, при 65°C в течение 10 мин и медленно охлаждая до 30°C в течение 1 ч. Затем комплексы освобождали от непрореагировавшего [γ - ^{32}P]ATP, пропуская растворы через колонку с Biogel A-1.5m, объемом 1 мл, в буфере 10 mM Трис-НСl, pH 7.6, содержащем 1 mM EDTA, объе-

дняли фракции, содержащие праймер-матричный комплекс, и хранили при –20°C. Нерадиоактивные комплексы матрица/PRA и матрица/PRT получали аналогичным образом, используя для отжига 55-членную матрицу и соответствующий праймер в соотношении 3 : 1, инкубируя 6 мин при 100°C и охлаждая до 30°C в течение 2 ч. Комплексы хранили при –20°C и использовали в реакциях без дополнительной очистки. Poly(rA)/oligo(dT) фирмы “Calbiochem” (США).

Реакции синтеза ДНК. Для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I реакционная смесь для односубстратной реакции в объеме 6 мкл содержала 10 mM Трис-НСl, pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 1 mM дитиотреит, 0.3 ед. акт. фермента, 10 нМ праймер-матричный комплекс и субстраты в различных концентрациях; реакцию проводили в течение 15 мин при 25°C. Для ОТ ВИЧ 6 мкл реакционной смеси содержали 10 mM Трис-НСl, pH 8.2, 5 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 1 mM дитиотреит, 1 ед. акт. фермента, 20 нМ праймер-матричный комплекс и субстраты; смесь инкубировали 30 мин при 37°C. В обоих случаях реакция останавливали, добавляя 3 мкл деионизованного формамида, содержащего 20 mM EDTA и по 0.1% красителей (бромфенолового синего и ксиленцианола). Пробы выдерживали 2 мин при 100°C и продукты реакций разделяли электрофорезом в денатурирующем 14 или 20% ПААГ. Экспонирование гелей с рентгеновской пленкой Retina RX проводили при –20°C.

Константы Михаэлиса и V_{\max} в односубстратных реакциях, катализируемых обратной транскриптазой ВИЧ, определяли графическим методом Лайнуивера–Бэрка. Концентрации субстратов и время реакции подбирали так, чтобы количество образовавшегося продукта (меченого пентануклеотида) было прямо пропорционально времени реакции. Скорость реакции рассчитывали как количество продукта (долю удлиненного на одно звено праймера от общего количества праймера, взятого в пробу) за единицу времени. После реакции пробы подвергали электрофоретическому разделению в 16% денатурирующем ПААГ как описано выше. Количество праймера пропорционально плотности пятен на радиоавтографе. Для определения плотности пятен использовали Molecular Dynamics 300A Computing Densitometer (США). Оптимальными условиями для проведения реакции были следующие: 3 нМ праймер-матричный комплекс, 0.2 ед. акт. фермента, 5 мин при 37°C, концентрации субстратов варьировали от 0.05 до 2 мкМ. За величины K_m для исследуемых соединений принимали средние значения, полученные по данным пяти независимых экспериментов.

Ингибирование динуклеозидтетрафосфатами включения радиоактивной метки в ДНК при ee РНК-зависимом синтезе. Способность соедине-

ний (V)–(VII) ингибировать включение [^3H]dTTP в poly(rA)/oligo(dT), катализируемое ОТ ВИЧ, определяли в условиях, описанных ранее [24]. Реакционная смесь в 10 мкл содержала 10 мМ Трис-НСl, pH 8.2, 5 мМ MgCl₂, 40 мМ KCl, 1 мМ дитиотреит и 2 мкМ (2 мкКи) [^3H]dTTP, 150 нг/мл poly(rA)/oligo(dT), 1 ед. акт. фермента и тестируемые соединения (см. подпись к рис. 6). Смесь инкубировали 10 мин при 37°C. Реакцию останавливали 0.1 М EDTA, пробы помещали на фильтры Whatman GF/C, предварительно пропитанные раствором 5% трихлоруксусной кислоты, фильтры пятикратно промывали раствором 5% трихлоруксусной кислоты, один раз спиртом, высушивали и измеряли их радиоактивность в толуоловом сцинтилляторе с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика радиоактивности фирмы “Inter-technique” (Франция).

Синтез РНК в присутствии динуклеозидолигофосфатов. Для тестирования субстратной активности соединений (XI)–(XIII) при синтезе РНК использовали две системы: полного синтеза РНК и остановленного тройного элонгационного комплекса (ТЭК). Для полного синтеза РНК реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 50 мМ Трис-НСl, pH 7.9, 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, ДНК фага T2 (100 мкг/мл), РНК-полимеразу *E. coli* (40 мкг/мл), динуклеотидную затравку CpA (100 мкМ), гУТР, гСТР, гГТР (50 мкМ каждый), 0.6 пмоль [α - ^{32}P]гУТР (2000 Ки/ммоль) и либо гАТР, либо тестируемые соединения (XI)–(XIII) (50–500 мкМ). Инкубацию проводили 30 мин при 25°C. Количество синтезированной РНК оценивали по радиоактивности, включившейся в кислотонерастворимую фракцию. Для этого после окончания инкубации реакционные смеси полностью переносили на фильтры Whatman 3ММ. Фильтры высушивали и затем промывали раствором 10% трихлоруксусной кислоты (по 5 мл на один фильтр, 10 мин) и раствором 5% трихлоруксусной кислоты (2 раза по 10 мин). Фильтры высушивали и их радиоактивность определяли по методу Черенкова в жидкостном сцинтилляционном счетчике радиоактивности фирмы “Inter-technique” (Франция).

Остановленные ТЭК получали согласно [25]. Для получения комплекса, содержащего 3'-меченую РНК, 1 пмоль РНК-полимеразы *E. coli* в 10 мкл транскрипционного буфера (50 мМ Трис-НСl, pH 7.9, 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол) смешивали с 3 мкл суспензии Ni-NTA-агарозы, предварительно уравновешенной тем же буфером, и инкубировали 3 мин при 25°C. Затем к смеси добавляли 1 пмоль матричной ДНК в объеме 1 мкл, инкубировали 5 мин при 37°C и промывали холодным транскрипционным буфером (4 × 1 мл). Реакцию транскрипции инициировали, добавляя тринуклеотид ApUpC (10 мкМ), гАТР, гГТР и гСТР (каждый 20 мкМ) и инкубиро-

вали 6 мин при 37°C для образования ТЭК-20. Затем иммобилизованный комплекс промывали тем же холодным буфером (4 × 1 мл) и добавляли к нему 0.3 мкМ [α - ^{32}P]гУТР, инкубировали 5 мин при 25°C и снова промывали холодным буфером. Реакционная смесь для односубстратной реакции содержала в объеме 20 мкл 25 нМ комплекс ТЭК-21 (РНК-полимеразу, иммобилизованную на Ni-агарозе, в комплексе с матричной ДНК, размером 397 п.о., содержащей промоторный фрагмент A1 бактериофага T7, и 21-нуклеотидную РНК с остатком [α - ^{32}P]гUMP на 3'-конце), 1-кратный транскрипционный буфер, гАТР (контроль) или тестируемые динуклеозидолигофосфаты в различных концентрациях (см. подпись к рис. 4б). Пробы инкубировали 1 мин при 21°C. Реакцию останавливали, добавляя равный объем буфера для нанесения проб на гель (7 М мочевины, 20 мМ EDTA, по 0.25% бромфенолового синего и ксиленцианола), продукты реакций разделяли электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ. Гели сканировали на приборе “Image Quant” (Applied Biosystems) и определяли количество радиоактивно меченного продукта – РНК длиной в 22 нт.

Константы ингибирования определяли графическим методом Гибсона. Пробы объемом 6 мкл содержали в соответствующем буфере для ОТ ВИЧ (см. выше) 40 нМ немеченый комплекс (матрица/PRA или матрица/PRT), радиоактивный предшественник ([α - ^{32}P]dATP или [α - ^{32}P]dTTP) в концентрациях 0.5, 0.75 и 1 мкМ (для получения нужной концентрации к меченому dNTP добавляли соответствующий немеченый) и динуклеозидтетрафосфаты в концентрациях от 1 до 100 мкМ. Реакцию инициировали добавлением 0.1 ед. ОТ ВИЧ и, после инкубации при 37°C в течение 10 мин, останавливали, добавляя 3 мкл 0.5 М EDTA, pH 8.0. Аликвоты по 4 мкл (для каждой пробы, таким образом, получалось два повтора) наносили на бумажные фильтры DE-81, фильтры высушивали, и на счетчике радиоактивности по Черенкову определяли количество метки на фильтре. Затем фильтры отмывали от несвязанной метки раствором 0.2 М NaCl, содержащим 0.5 мМ EDTA и 0.7 мМ пиррофосфат, промывали спиртом, высушивали и определяли количество радиоактивности в контрольных пробах без ингибитора и в пробах с разными количествами ингибиторов. Далее строили графики зависимостей обратных скоростей реакции от концентрации ингибиторов и находили K_i .

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной поддержке грантом Министерства промышленности, науки и технологии РФ (проект 31).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Semizarov D., Victorova L., Dyatkina N., von Janta-Lipinsky M., Krayevsky A. // FEBS Lett. 1994. V. 354. P. 187–190.
2. Викторова Л.С., Арзуманов А.А., Широкова Е.А., Ясько М.В., Александрова Л.А., Шипицын А.В., Скоблов А.Ю., Краевский А.А. // Молекуляр. биол. 1998. Т. 32. С. 162–171.
3. Martynov B.I., Shirokova E.A., Jasko M.V., Victorova L.S., Krayevsky A.A. // FEBS Lett. 1997. V. 410. P. 423–427.
4. Андреева О.И., Ефимцева Е.В., Падюкова Н.Ш., Кочетков С.Н., Михайлов С.Н., Диксон Г.Б., Карпейский М.Я. // Молекуляр. биол. 2001. Т. 35. С. 844–856.
5. Arzumanov A., Semizarov D., Victorova L., Dyatkina N., Krayevsky A. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 24389–24394.
6. Alexandrova L., Skoblov A., Jasko M., Victorova L., Krayevsky A. // Nucl. Acids. Res. 1998. V. 26. P. 778–786.
7. Krayevsky A., Arzumanov A., Shirokova E., Dyatkina N., Victorova L., Jasko M., Alexandrova L. // Nucleosides Nucleotides. 1998. V. 7. P. 681–693.
8. Meyer P.R., Matsuura S.E., So A.G., Scott W.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13471–13476.
9. Sosunov V.V., Santamaria F., Victorova L.S., Gosselin G., Rayner B., Krayevsky A.A. // Nucl. Acids. Res. 2000. V. 28. P. 1170–1175.
10. Victorova L., Sosunov V., Skoblov A., Shipitsyn A., Krayevsky A. // FEBS Lett. 1999. V. 453. P. 6–10.
11. Тарусова Н.Б., Шумянцева В.В., Крылов А.С., Карпейский М.Я., Хомутов Р.М. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. С. 838–843.
12. Тарусова Н.Б., Осипова Т.И., Пурьгин П.П., Якимова Т.А. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. С. 494–507.
13. Huang P., Farguhar D., Plunkett W. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 11914–11918.
14. Huang H., Chopra R., Verdine G.L., Harrison S.C. // Science. 1998. V. 282. P. 1669–1675.
15. Boyer P.L., Sarafianos S.G., Arnold E., Hugher S.H. // J. Virol. 2001. V. 75. P. 4832–4842.
16. Li Y., Korolev S., Waksman G. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 7514–7525.
17. Randall S.K., Eritja R., Kaplan B.E., Petrushka J., Goodmen M.F. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 6864–6870.
18. Semizarov D.G., Arzumanov A.A., Dyatkina N.B., Meyer A., Vichier-Guerre S., Gosselin G., Rayner B., Imbach J.-L., Krayevsky A.A. // J. Biol. Chem. 1997. T. 272. P. 9556–9560.
19. Mas A., Parera M., Briones C., Soriano V., Martinez M.A., Domingo E., Menendes-Arias L. // EMBO J. 2000. V. 19. P. 5752–5761.
20. Selmi B., Boretto J., Sarfati S.R., Guerreiro C., Canard B. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 48466–48472.
21. Borukhov S., Goldfarb A. // Protein Expr. Purif. 1993. V. 4. P. 503–511.
22. Краев А.С. // Молекуляр. биол. 1988. Т. 22. С. 1164–1197.
23. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 5.68–5.72.
24. Mitsuya H., Broder S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1911–1915.
25. Kashlev M., Nudler K., Borukhov S., Komissarova N., Goldfarb A. // Methods Enzymol. 1996. V. 274. P. 326–334.

Substrate Properties of Dinucleoside 5',5''-Oligophosphates in the Reactions Catalyzed by HIV Reverse Transcriptase, *E. coli* DNA Polymerase I, and *E. coli* RNA Polymerase

A. Yu. Skoblov, V. V. Sosunov, L. S. Victorova[#], Yu. S. Skoblov, and M. K. Kukhanova

[#]Phone: +7 (095) 135-6074; e-mail: lhba@eimb.relarn.ru
Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

Dinucleoside 5',5''-oligophosphates dNp₄dN', dTp₃rA, dTp₄rA, and dTp₅rA were synthesized and evaluated as substrates for HIV reverse transcriptase, the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I, and *E. coli* RNA polymerase. A model of the HIV reverse transcriptase interaction with the dinucleoside oligophosphates was proposed and experimentally confirmed. The kinetic constants of some of the synthesized compounds for the HIV reverse transcriptase were determined. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: dinucleoside oligophosphates, *E. coli* RNA polymerase, HIV reverse transcriptase, Klenow fragment