

16. Bambara R. A., Uyemura D., Choi T. On the processive mechanism of *E. coli* DNA polymerase I. Quantitative assessment of processivity. — *Ibid.*, 1978, 253, N 1, p. 413—423.
17. Fisher P. A., Wang T. S.-F., Korn D. Enzymological characterization of DNA polymerase α : Basic catalytic properties, processivity, and gap utilization of the homogeneous enzyme from human KB cells. — *Ibid.*, 1979, 254, N 12, p. 6128—6137.

Тихоокеан. ин-т биоорг. химии
ДВНЦ АН СССР, Владивосток

Получено 22.01.85

УДК 547.963.32.057:577.152.277.145

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА I *E. COLI*: ЗАВИСИМАЯ ОТ ПРАЙМЕР-МАТРИЧНОГО КОМПЛЕКСА ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА ИМИДАЗОЛИДАМИ ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ

Г. А. Невинский, С. В. Доронин, О. И. Лаврик

Метод аффинной модификации, как отмечается в монографии [1], лишь начинают применять к ДНК-полимеразам (КФ 2.7.7.7). Можно перечислить несколько работ, в которых достигнуто ковалентное присоединение к полимеразам dNTP прямой фотосшивкой нуклеотидов с ферментами [2, 3] или при использовании аналогов dNTP, содержащих дополнительные алкилирующие группы, присоединенные по γ -фосфату нуклеотидов [4—6]. Эпоксипроизводное АТФ [7] и окисленный по рибозе периодатом натрия 6-метил-тиопуририбозид [8] также инактивируют ДНК-полимеразу I.

Материалы и методы. В работе использовали препараты ДНК-полимеразы I из *E. coli* MRE-600 производства НИС НГУ и ИЦиГ СО АН СССР (Новосибирск) с удельной активностью $3 \cdot 10^3$ ед. акт./мг [2]. Препараты фермента были свободными от примесных экзо- и эндонуклеаз и содержали по данным электрофореза в полиакриламидном геле не более 3—5 % примесных белков [2].

В работе использовали HEPES («Ferah», ФРГ), бычий сывороточный альбумин (БСА) («Koch-Light Laboratories», Англия), поли(dA)-, поли(dT)-, поли(dC)-, поли(dG)-, поли(rA)-натриевые соли, dATP-, dCTP-, dGTP-, dTTP-натриевые соли (НИКТИ БАВ, г. Бердск), [^3H]dTTP с удельной активностью 836 ТБк/моль и [^3H]dATP — 900 ТБк/моль («Изотоп», СССР), остальные реактивы квалификации х. ч. и ос. ч.

ТСХ в препаративном варианте проводили на пластинках Kieselgel F₆₀ 254 («Merck», ФРГ) в системе диоксан — вода — концентрированный аммиак (6:3:1), в аналитическом — на пластинках Silufol UV-254 («Kavalier», ЧССР) в системе диоксан — вода — аммиак (6:4:1).

Синтез им-dNTP проводили, согласно [10], с некоторыми модификациями. Очистку продуктов проводили с помощью ТСХ в указанных системах. Концентрацию им-dNTP определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярного поглощения для нуклеотидов, приведенные в работе [12]. Для доказательства структуры продуктов проводили их кислый гидролиз в 0,1 М Na-ацетатном буферном растворе, pH 4,0. Продукты гидролиза идентифицировали с помощью ТСХ и микроколоночной хроматографии на ионообменной смоле АС111300 производства НИС НГУ в градиенте концентраций $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (pH 7,0), 7 М мочевины. Поглощение элюата регистрировали с помощью микроспектрофотометра «Миллихром» отечественного производства. Величины R_f для им-dATP, dCTP, dGTP и dTTP были равными 0,5; 0,41; 0,43; 0,45 соответственно. Препараты им-dNTP использовали сразу после очистки с помощью ТСХ. В этом случае они содержали не более 1—3 % примеси dNTP.

Принятые сокращения: им-dNTP — γ -имидазолид dNTP; HEPES — 2-N-гидрокси-этилпиперазин-N'-2-этансульфокислота.

Изучение устойчивости им-dNTP проводили на примере аналога dATP в условиях, используемых для модификации фермента: 1 мМ им-dATP, 0,05 М HEPES/NaOH-буфер, pH 8,5, 2,5 мМ MgCl₂. Было показано, что за 3 ч гидролизует не более 12—14 % им-dATP.

Активность фермента определяли при 37 °С в смеси объемом 70 мкл, содержащей: 0,05 М HEPES/NaOH-буфер, pH 8,5, 5,0 мМ MgCl₂, 0,1 мг/мл БСА, 30 мМ KCl, 10 мкМ dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2 ед. A₂₆₀/мл активированной ДНК спермы лосося (активация панкреатической ДНКазой I, согласно [11], на 16—20 %) и по 1 МБк одного из [³H]-меченных dTTP или dATP. Реакцию начинали добавлением 0,02—0,05 ед. акт./мл ДНК-полимеразы I. В процессе инкубации отбирали аликвоты (10 мкл) и обрабатывали их, как описано в работе [9].

Модификацию ДНК-полимеразы им-dNTP проводили при 37 °С следующим образом. Реакционная смесь объемом 50—100 мкл содержала 0,05 М HEPES/NaOH-буфер, pH 8,5, 0,1 мг/мл БСА, 2 мкМ ЭДТА, 2,5 мМ MgCl₂, 3 мМ KCl и 0,3—0,4 ед. акт./мл ДНК-полимеразы. В качестве матрицы-праймера использовали активированную ДНК (2 ед. A₂₆₀/мл), поли(dA)·поли(dT), поли(rA)·поли(dT), поли(dC)·поли(dG) в концентрации 2—4 ед. A₂₆₀/мл при соотношении цепей 1:50—5:1 в расчете на мононуклеотид (получены одинаковые результаты при таком варьировании соотношения полинуклеотидов). Концентрации им-dNTP варьировали в диапазоне 0,01—5,0 мМ. В процессе инкубации из реакционной смеси отбирали аликвоты (1—5 мкл) и добавляли их в смесь для определения активности фермента.

Результаты и обсуждение. Как следует из работ по исследованию связывания dNTP с ДНК-полимеразой I из *E. coli* методами равновесного диализа [13] и прямой фотосшивки [2, 3], фермент связывает dNTP с достаточно высоким сродством (5—50 мкМ) в отсутствие матрично-затравочного комплекса (дуплекса комплементарных цепей). В то же время, как видно из рис. 1, инкубация полимеразы с любым из им-dNTP даже при использовании аналогов в высоких концентрациях (1—3 мМ) в отсутствие матрицы-затравки не приводит к изменению его начальной активности. Аналогичный результат был получен при добавлении к смеси полимеразы с одним из аналогов dATP или dTTP только поли(dA), поли(rA) или поли(dT). Одинаковым образом фермент инактивировали им-dATP и dTTP в присутствии дуплексов поли(rA)·поли(dT), поли(dA)·поли(dT); им-dCTP — в присутствии поли(dC)·поли(dG) (рис. 1). На основании этих результатов можно было бы сделать предположение о том, что им-dNTP не образуют комплексов с ферментом в отсутствие матрично-затравочного комплекса. Однако скорее всего это не так. Эффективность образования комплексов свободного фермента с нуклеотидами в определенной степени зависит от числа фосфатных групп в их полифосфатной цепи, но остается достаточно высокой даже для dNMP [13]. В связи с этим также следует отметить, что, согласно работе [14], во время присоединения праймера и матрицы к комплексу фермента с нуклеотидом сначала происходит диссоциация субстрата, а затем его повторное связывание с образованием нового продуктивного комплекса. Причем неизвестно, является ли участок первоначального и последующего связывания нуклеотида одним и тем же центром связывания нуклеотида на белке. Очевидно, что если им-dNTP и образуют комплексы с ДНК-полимеразой в отсутствие матрицы-затравки, то инактивация фермента в таком комплексе невозможна. Поскольку одной цепи матрицы недостаточно для достижения модификации полимеразы им-dNTP, разумно предположить, что существенную роль в этом процессе играет связывание с ферментом инициирующего субстрата.

Для оценки сродства им-dNTP к полимеразе была исследована зависимость скорости инактивации фермента от концентрации им-dATP в присутствии поли(rA)·поли(dT). Скорость возрастала при увеличении концентрации им-dATP в реакционной смеси. Зависимость логарифма остаточной активности фермента от времени его инкубации с им-dATP линейна только на начальных участках кривых (10—20 мин). На протяжении всей кривой (2—3 ч) она не соответствует реакции псевдо-

первого порядка. Это может быть связано с гидролизом им-dATP (12—14 % за 3 ч) и проявлением защитного эффекта dATP или уменьшением числа молекул поли(гА), способных служить затравками после включения появляющегося dATP в цепь праймера. Начальные участки кинетических кривых были использованы для оценки кажущихся констант скоростей инактивации ($k_{\text{каж}}$) фермента при фиксированных концентрациях аналога. График рис. 2 демонстрирует зависимость величин $k_{\text{каж}}$ от концентрации им-dATP в обратных координатах. С помощью этой

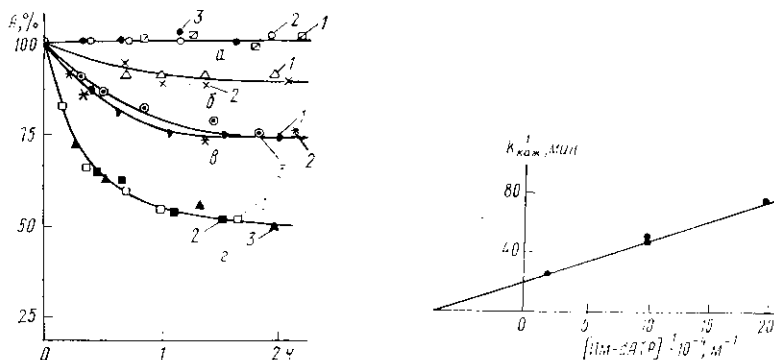


Рис. 1. Кинетические кривые инактивации ДНК-полимеразы при 37 °С им-dNTP в присутствии и отсутствие матрично-затравочных комплексов. Кривые серий а: 3 мМ им-dATP в отсутствие матрицы-затравки (1), присутствии поли(гА) — (2), поли(dT) — (3); б — 1 мМ им-dATP (1) и 1 мМ им-dTTP (2) в присутствии поли(dC)·поли(dG); в — 0,1 мМ им-dATP (1), 1 мМ им-dTTP (2), 1 мМ им-dCTP (3) в присутствии активированной ДНК; г — 0,1 мМ им-dATP (1), 0,1 мМ им-dTTP (2) в присутствии поли(dT)·поли(гА), 0,1 мМ им-dCTP (3) в присутствии поли(dC)·поли(dG).

Fig. 1. The time dependence of residual activity of *E. coli* DNA-polymerase I under enzyme incubation with imidazolides of dNTP at 37 °C in the presence and absence of template-primer complexes. Curves of а: 3 mM Im-dATP in the absence of template-primer (1), with poly(rA) — (2), poly(dT) — (3); б — 1 mM Im-dATP (1) and 1 mM Im-dTTP (2) in the presence of poly(dC)·poly(dG); в — 0.1 mM Im-dATP (1), 1 mM Im-dTTP (2), 1 mM Im-dCTP (3) in the presence of activated DNA; г — 0.1 mM Im-dATP (1), 0.1 mM Im-dTTP (2) with poly(dT)·poly(rA), 0.1 mM Im-dCTP (3) in the presence of poly(dC)·poly(dG).

Рис. 2. Зависимость величин $k_{\text{каж}}$ при 37 °С от концентрации им-dATP в обратных координатах.

Fig. 2. The dependence of $k_{\text{каж}}$ values at 37 °C on the Im-dATP concentration ($1/k_{\text{каж}} - 1/[\text{Im-dATP}]$ plot).

кривой, согласно методу Китса—Вилсона [15], была найдена величина K_d комплекса полимеразы и поли(гА)·поли(dT) с им-dATP, равная 13 мкМ. Эта величина примерно на порядок меньше K_M для dATP (250 мкМ) [4] и сравнима с величиной K_i для другого аналога dATP — 4-(2-N-окси-N-метиламино)бензил-γ-амида dATP (38 мкМ) [4], также несущего заместитель по концевому фосфату нуклеотида. Очевидно, что введение остатка имидазола по γ-фосфату dNTP не приводит к уменьшению сродства аналогов dNTP к полимеразе по сравнению с исходными нуклеотидами.

Особый интерес представлял анализ данных о глубине и скорости инактивации фермента им-dNTP в присутствии различных матрично-затравочных комплексов. Из рис. 1 видно, что глубина инактивации фермента любым из им-dNTP в присутствии дуплекса гомополимерных цепей, одна из которых комплементарна используемому аналогу нуклеотида, не превышает 50 %. В то же время каждый из им-dNTP инактивирует фермент в присутствии активированной ДНК только на 25 % (рис. 1). Такая ситуация объяснима, если предположить, что инактивация фермента имидазолидами dNTP протекает в строго комплементарных комплексах матрицы и используемых аналогов. В случае дуплекса поли(гА)·поли(dT) связывание цепей с ферментом может происходить таким образом, что 50 % молекул полимеразы находятся в комплексе, где в участке связывания матрицы находится поли(гА), а в участке

связывания затравки — поли(dT). Другие 50 % молекул фермента связывают цепи дуплекса альтернативным образом. При условии модификации фермента только в комплементарном комплексе матрицы и им-dNTP инактивация полимеразы аналогами dATP и dTTP должна составлять 50 %. В случае активированной ДНК согласно статистическому распределению четырех нуклеотидов в цепи матрицы следует ожидать 25 % инактивации фермента имидазолидом любого из dNTP, что и

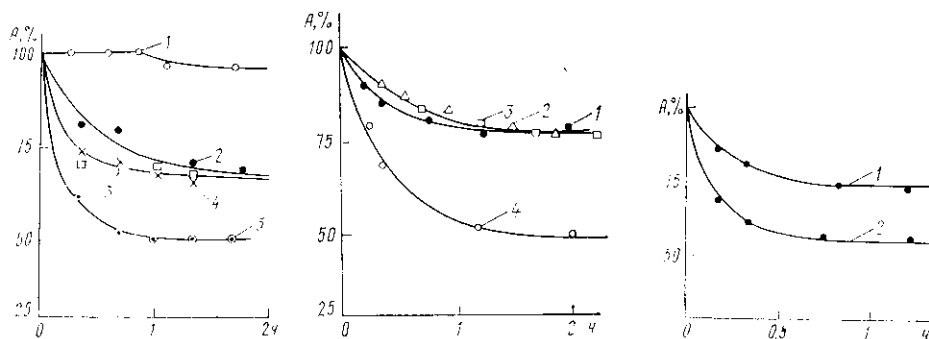


Рис. 3. Кинетические кривые инактивации ДНК-полимеразы в комплексе с поли(гА)×поли(dT) им-dATP (0,1 мМ) в присутствии и отсутствии dNTP: 1 — в присутствии 0,1 мМ dATP; 2 — 1 мМ dCTP; 3 — 1 мМ dTTP; 4 — 1 мМ dGTP; 5 — в отсутствие dNTP.

Fig. 3. The time dependence of DNA-polymerase residual activity under enzyme incubation with imidazolide of ATP (0.1 mM) in the presence and absence of dNTP (all experiments in the presence of poly(dT)·poly(gA): 1 — with 0.1 mM dATP; 2 — 1 mM dCTP (2); 3 — 1 mM dTTP (3); 4 — 1 mM dGTP (4); 5 — without dNTP.

Рис. 4. Кинетические кривые инактивации ДНК-полимеразы при 37 °С различными им-dNTP в присутствии активированной ДНК: 1 — 1 мМ им-dATP; 2 — 1 мМ им-dCTP; 3 — 1 мМ им-dGTP; 4 — им-dATP+им-dCTP+им-dGTP (каждый в концентрации 1 мМ).

Fig. 4. The time dependence of *E. coli* DNA-polymerase residual activity at 37 °C in the presence of different Im-dNTP and activated DNA: 1 — 1 mM Im-dATP; 2 — 1 mM Im-dCTP; 3 — 1 mM Im-dGTP; 4 — 1 mM Im-dATP+1 mM Im-dCTP+1 mM Im-dGTP.

Рис. 5. Кинетические кривые инактивации ДНК-полимеразы при 37 °С им-dATP (0,14 мМ) в отсутствие dNTP (1) и в присутствии dCTP, dGTP, dTTP (0,5 мкМ каждый из dNTP) (2).

Fig. 5. The time dependence of *E. coli* DNA-polymerase residual activity at 37 °C in the presence of Im-dATP (0.14 mM) without dNTP (1) and with 0.5 μM dTTP+0.5 μM dCTP+0.5 μM dGTP (2).

наблюдается в приведенных выше экспериментах. Дополнительное доказательство инактивации полимеразы им-dNTP только при образовании комплементарных комплексов матрицы и аналога было получено при добавлении им-dATP и им-dTTP к комплексу фермента с поли(dC)·поли(dG). В этом случае не наблюдалось заметного уменьшения активности при использовании аналогов dNTP в концентрациях, сравнимых с величиной K_d комплекса фермента с им-dATP (0,01—0,05 мМ). Глубина инактивации не превышала 10—15 % при добавлении им-dATP и dTTP в концентрациях 1—5 мМ (рис. 1). Эти данные указывали на возможность образования комплексов фермента с им-dNTP в присутствии некомплемментарных нуклеотидов матриц при высоких концентрациях аналогов. Образование такого рода неправильных комплексов им-dNTP вполне согласуется с ошибочным включением нуклеотидов [16] при «считывании» матрицы полимеразой.

Скорее всего образование неправильных комплексов матрицы с dNTP на ферменте происходит эффективнее, чем включение связанного таким образом нуклеотида в растущую цепь. Как видно из рис. 3, одновременное добавление dATP и им-dATP в равных концентрациях в инкубационную смесь с ферментом и поли(гА)·поли(dT) приводит к полной защите полимеразы от инактивации аналогом. При сравнимых концентрациях им-dATP и любого из трех других dNTP защитного эффекта этих нуклеотидов не обнаружено. В то же время добавление некомплем-

ментарных матрице dNTP в концентрациях, на порядок превышающих концентрацию им-dATP, приводит к заметной защите фермента от инактивации. Скорость и глубина инактивации уменьшается примерно в два раза, в то время как инактивация фермента им-dNTP, некомплементарными матрице, даже при высоких концентрациях аналогов (1—5 мМ), не превышает 10—15 %. Совокупность этих данных может свидетельствовать в пользу предположения о несоответствии эффективности образования комплексов им-dNTP и некомплементарной матрицы на ферменте и образования ковалентной связи между ферментом и таким образом связанными аналогами dNTP.

Дополнительным доказательством этого факта служат эксперименты по одновременной инактивации ДНК-полимеразы несколькими им-dNTP в присутствии активированной ДНК. Как видно из рис. 4, каждый из аналогов dATP, dCTP, dGTP инактивирует фермент на 25 %. При одновременном добавлении этих аналогов к полимеразе глубина инактивации фермента составляет приблизительно 50 %. Таким образом, нет аддитивного вклада трех им-dNTP в суммарную инактивацию фермента. Каждый из аналогов, по-видимому, неэффективно инактивирует фермент при образовании неправильных комплексов с матрицей, но образование таких комплексов приводит к частичной защите фермента от инактивации другими комплементарными матрице аналогами dNTP.

При использовании в качестве матрично-затравочного комплекса активированной ДНК представлялось возможным увеличить число молекул фермента, содержащих матрицу, комплементарную одному из аналогов dNCP при добавлении трех других dNTP. Концентрации dNTP в этом случае должны быть достаточными для включения их в цепь праймера и таким образом для смещения матрицы до нуклеотидного звена, комплементарного им-dNTP, но недостаточными для проявления их защитного эффекта. Добавление dTTP, dCTP и dGTP (каждый в концентрации 0,5 мкМ) к смеси фермента с активированной ДНК и им-dATP (0,1 мМ) привело к увеличению глубины и скорости инактивации фермента примерно в два раза (рис. 5). Эти результаты также указывали на модификацию полимеразы им-dNTP только в комплементарных комплексах аналогов и матрицы.

Очевидно, что образованию ковалентной связи между ферментом и аналогом предшествует образование специфического комплекса фермента с им-dNTP. Инактивация ДНК-полимеразы им-dNTP протекает в соответствии с критериями аффинной модификации биополимеров [1]. Интересно, что им-dNTP в присутствии активированной ДНК инактивируют фермент только на 25 %, тогда как алкилирующие бензиламиды dTTP и dATP в тех же условиях полностью инактивируют белок. Возможно, что благодаря относительно хорошей подвижности и большого размера «спейсера» между алкилирующей группой и γ -фосфатом dNTP-бензиламидные производные могут «находить» свой акцептор даже в том случае, если аналог некомплементарен цепи матрицы. Для протекания же реакции фосфорилирования в активном центре γ -фосфат им-dNTP должен быть сближен с его нуклеофильными группами, что, по-видимому, требует образования комплементарного комплекса им-dNTP с матрицей.

На основании совокупности полученных данных мы предположили следующую гипотетическую схему инактивации ДНК-полимеразы им-dNTP в присутствии матрицы-затравки. Связывание им-dNTP с ферментом происходит независимо от того, комплементарен ли добавленный аналог матрице. Однако в случае комплементарности связывание аналога dNTP протекает более эффективно примерно на порядок. После образования первичного комплекса им-dNTP с ферментом происходит образование комплементарной пары аналога с цепью матрицы. Это может приводить к дополнительному изменению комплекса и «подгонке» нуклеотида до состояния, имитирующего реакционноспособное состояние нуклеозид-5'-трифосфата. На последнем этапе подгонки скорее

всего происходит сближение концевой фосфата аналога с нуклеофильными группами активного центра фермента, что в конечном итоге приводит к их фосфорилированию и инактивации фермента. При отсутствии комплементарной пары аналога с цепью матрицы этап подгонки отсутствует и небольшая инактивация фермента достигается только при высоких концентрациях аналогов путем случайного сближения концевой фосфата с нуклеофильными группами при образовании или диссоциации неправильных комплексов им-dNTP с ферментом.

Авторы глубоко признательны А. Г. Ромашенко за предоставленную ДНК-полимеразу I, В. Г. Будкеру — за полезные обсуждения при написании статьи, Д. Г. Кнорре — за внимание к работе и ценные советы.

E. COLI DNA POLYMERASE I:
PRIMER-TEMPLATE-DEPENDENT ENZYME INACTIVATION
BY IMIDAZOLIDES OF DEOXYNUCLEOSIDE-5'-TRIPHOSPHATES

G. A. Nevinsky, S. V. Doronin, O. I. Lavrik

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

Summary

Interaction of *E. coli* DNA-polymerase I with imidazolides of dATP, dCTP, dGTP and dTTP is investigated in the presence and the absence of different primer-template complexes. It is found that the enzyme can be inactivated only in the presence of a primer and a template being complementary to dNTP analogue. From the data obtained it may be supposed that the orientation of analogue polyphosphate chain changes due to the analogue-template complex formation. Such a transformation results in the close proximity of the terminal phosphate of the analogue to nucleophilic groups of the active enzyme site and in their subsequent phosphorylation.

1. *Аффинная модификация биополимеров* / Под ред. Д. Г. Кнорре.— Новосибирск : Наука, 1983.—243 с.
2. *Abracham K. J., Modak M. J.* Affinity labelling of *E. coli* DNA polymerase I with thymidine-5'-triphosphate and 8-azidoadenosine-5'-triphosphate: Conditions for optimum labelling, specificity and identification of labelling site.— *Biochemistry*, 1984, 23, N 6, p. 1176—1182.
3. *Bisman S. B., Kornberg A.* Nucleotide triphosphate binding to DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*. A direct photoaffinity labelling study.— *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, N 23, p. 7990—7993.
4. *Аффинная модификация ДНК-полимеразы I из E. coli 4-(N-2-хлорэтил-N-металамино)-бензил-γ-амидами dTTP и dATP* / В. Н. Бунева, Т. В. Демидова, Д. Г. Кнорре и др.— *Молекуляр. биология*, 1980, 14, № 5, с. 1080—1087.
5. *Дискриминация ДНК-полимераз E. coli алкилирующим γ-амидом dTTP* / В. Н. Бунева, Н. В. Кудряшова, Л. Т. Небрат и др.— *Докл. АН СССР*, 1982, 226, № 1, с. 243—246.
6. *Аффинное алкилирование РНК-зависимой ДНК-полимеразы E. coli производными γ-амида dTTP* / В. Н. Бунева, Н. В. Кудряшова, В. А. Курбатов, А. Г. Ромашенко.— *Биохимия*, 1978, 43, № 2, с. 2261—2263.
7. *Apparent suicidal inactivation of DNA polymerase by adenosine 2', 3'-riboepoxide-5'-triphosphate* / M. M. Abboud, W. S. Sim, L. A. Loeb, A. S. Mildvan.— *J. Biol. Chem.*, 1978, 253, N 16, p. 3415—3421.
8. *The affinity labelling of amino acids in or about the active center of DNA-dependent DNA polymerase I* / R. A. Salvo, G. F. Serio, J. E. Evans, A. P. Kimball.— *Biochemistry*, 1976, 15, N 3, p. 493—497.
9. *Левина А. С., Невинский Г. А., Лаврик О. И.* ДНК-полимераза *E. coli*. Исследование механизма связывания иницирующего субстрата с помощью аналогов олиготимидилатов с этилированными межнуклеотидными фосфатными группами.— *Биоорганическая химия*, 1985, 11, № 3, с. 358—369.
10. *Grachev M. A., Mustaev A. A.* Cyclic adenosine-5'-trimethaphosphate phosphorylates a histidine residue nearby the initiating substrate binding site of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase.— *FEBS Lett.*, 1981, 130, N 1, p. 23—26.
11. *Noy G. P., Weissbach A.* HeLa cell DNA polymerase: the effect of cycloheximide *in vivo* and detection of a new form of DNA polymerases.— *Biochim. et biophys. acta*, 1977, 477, N 2, p. 70—83.

12. *Shwarz* bioreserch radiochemical catalog.— New York, 1971.—120 p.
13. *Enzymatic* synthesis of deoxyribonucleic acid. Binding of triphosphates to deoxyribonucleic acid polymerase / P. T. England, J. L. Huberman, T. M. Jovin, A. Kornberg.— *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, N 11, p. 3038—3044.
14. *Bryant F. R., Johnson K. A., Benkovic S. J.* Elementary steps in the DNA polymerase I reaction pathway.— *Biochemistry*, 1983, **22**, N 15, p. 3537—3546.
15. *Kitz R., Wilson I. B.* Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase.— *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, N 10, p. 3245—3249.
16. *Abbots J., Loeb L. A.* On the fidelity of DNA replication.— *Ibid.*, 1984, **259**, N 11, p. 6712—6714.

Ин-т биоорганической химии СО АН СССР,
Новосибирск

Получено 22.01.85

УДК 591.150:575.24+577.155.2

КОРРЕКЦИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗНЫХ ОШИБОК И 3'→5'-ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

**Н. В. Белякова, Н. Е. Клейнер, Т. П. Кравецкая,
О. К. Легина, Н. А. Тимченко, В. М. Крутяков**

Введение. Очищенные ДНК-полимеразы эукариот ошибаются (т. е. присоединяют некомплементарные нуклеотиды) с вероятностью приблизительно 10^{-4} [1]. Высокая ошибочность (10^{-3}) ДНК-полимеразы β в составе хроматина [2] не позволяет рассчитывать на резкое повышение надежности синтеза ДНК *in situ*, хотя известны случаи существенного снижения ошибочности ДНК-полимераз в комплексах со вспомогательными белками [1]. Вероятность спонтанного мутагенеза в пересчете на реплицированный нуклеотид составляет 10^{-9} — 10^{-11} [3]. Учет вырожденности генетического кода, устойчивости ферментативной функции к аминокислотным заменам и большей вероятности температурочувствительных мутаций позволяет уменьшить это огромное расхождение лишь в 40 раз [4]. Следовательно, клетки исправляют подавляющую часть ДНК-полимеразных ошибок. Одним из механизмов коррекции является наличие в молекуле ДНК-полимеразы «редакторской» 3'→5'-экзонуклеазной активности, преимущественно удаляющей неспаренные нуклеотиды из ДНК-затравки. Эта активность, присущая ДНК-полимеразам прокариот, отсутствует у ДНК-полимераз α , β , γ млекопитающих [1]. Кроме обычной ДНК-полимеразы α , из костного мозга кролика и тимуса теленка была выделена ДНК-полимераза δ , проявляющая 3'→5'-экзонуклеазную активность [5, 6], и аналогичный фермент был обнаружен в миеломе мыши [7]. Лишь в одном из перечисленных случаев [5] проделаны эксперименты, позволяющие оценить роль экзонуклеазной активности в коррекции превращения дНТФ в дНМФ в присутствии синтетической матрицы, к которой ДНК-полимераза присоединяет комплементарный или некомплементарный нуклеотиды. Оказалось, что ДНК-полимераза δ выщепляет из ДНК-затравки правильный нуклеотид с той же скоростью или даже в несколько раз быстрее, чем неправильный [5]. Наоборот, классические корректазы — ДНК-полимераза I и полимеразы фага T4 — в аналогичном тесте выщепляют некомплементарные нуклеотиды в 10—100 раз быстрее, чем комплементарные [8, 9]. Таким образом, ДНК-полимераза δ не проявляет коррекционной специфичности, т. е. не способна осуществлять эффективную коррекцию ошибок репликации. Это становится особенно ясным, если учесть, что ДНК-полимеразы эукариот довольно эффективно используют затравку с некомплементарным нуклеотидом на 3'-конце: ДНК-полимераза α при этом работает лишь в 20 раз медленнее [10], а ревертаза даже не снижает скорости катализа [11].

Высказывалось предположение, что экзонуклеазная коррекция у млекопитающих может осуществляться нуклеазой, не связанной кова-