

**НОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ БИОСИНТЕЗА ДНК И РНК
IN VITRO И IN VIVO**

**Р. Ш. Бибилашвили, З. Г. Чиджавадзе, А. А. Краевский,
М. К. Куханова, А. М. Атражев, А. В. Ажаев, Т. В. Кутателадзе**

Механизм функционирования ферментов и мультиферментных комплексов, осуществляющих процессы транскрипции, репликации, обратной транскрипции, генетической рекомбинации, репарации ДНК и др., изучен совершенно недостаточно, особенно у эукариот. Среди основных подходов, применяемых в настоящее время для решения этих проблем, следует упомянуть следующие.

1. Изучение свойств и состава мультибелковых комплексов, выделенных из клетки. Среди лучше изученных в настоящее время можно назвать репликативные комплексы вирусов, фагов, прокариот, а также транскрипционные комплексы различного происхождения. Гораздо меньше известно о репарации, рекомбинации и др. процессах.

2. Ступенчатая сборка синтезирующих ДНК мультибелковых комплексов из очищенных компонентов и изучение их функционирования на каждой ступени сборки.

3. Ингибиторный анализ процессов биосинтеза ДНК и РНК. Этот подход дает наибольшие возможности для сравнения комплексов, синтезирующих ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo*, что обеспечивает надежность выводов, полученных *in vitro*. Кроме того, ингибиторный анализ является постоянным и незаменимым компонентом двух первых подходов и имеет, таким образом, самостоятельное значение при работе *in vitro*.

Здесь будут сообщены данные о новых субстратоподобных ингибиторах биосинтеза ДНК и РНК, полученных и изученных в лабораториях генетической инженерии ВКНЦ АМН СССР и химии белкового синтеза ИМБ АН СССР, частично — в сотрудничестве с другими лабораториями.

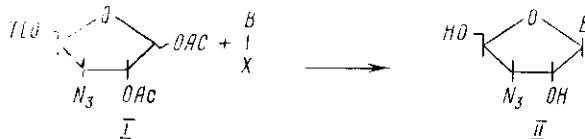
Субстратоподобные ингибиторы широко используют в ингибиторном анализе биосинтеза ДНК и РНК. Это вызвано в первую очередь тем, что планирование свойств при их создании в определенной степени базируется на известных теоретических предпосылках. Почти все они по своей природе являются аналогами природных субстратов, в которых модифицируются основание, углеводная часть или трифосфатная группа. Поэтому, планируя синтез какого-либо нового типа аналогов, можно в определенных пределах предугадать их свойства в полимерных системах *in vitro* и *in vivo*. Например, вызывая определенные изменения в основаниях, можно предсказать, как это повлияет на узнавание таких аналогов субстратов комплексом [праймер-матрица+белки] как с точки зрения непосредственно узнавания, так и образования продуктивного ферментативного комплекса [праймер-матрица+белки+аналог субстрата]. Здесь мы не будем касаться аналогов субстратов с модифицированными основаниями, так как такие соединения наиболее широко применяют для изучения механизмов мутагенеза. Наше внимание было сосредоточено на аналогах субстратов, модифицированных по углеводному остатку.

Наиболее мощными субстратоподобными ингибиторами, как правило, являются так называемые терминаторы синтеза ДНК и РНК. Для синтеза РНК, катализируемого РНК-полимеразой из *E. coli*, были ранее известны два типа таких соединений, а именно $\gamma\text{NTP}(3'\text{H})$ [1] и $\gamma\text{NTP}(3'\text{OCH}_3)$ [2, 3]. Эти соединения проявляли высокую специфичность к синтезирующему РНК комплексу [ДНК+РНК-праймер+РНК-полимераза]. Далее, эффективно включившись в 3'-конец РНК-праймера, они прерывали дальнейшую полимеризацию, так как в их 3'-положении отсутствовала группа, способная к ковалентному взаимодей-

вию с α -фосфатом следующего субстрата. Поэтому такие соединения, в частности γ NTP ($3' \text{OCH}_3$), оказались удобными для терминирования цепей РНК при определении первичной структуры ДНК по нуклеотидной последовательности транскрипта [3]. Основным недостатком γ NTP ($3' \text{H}$) и γ NTP ($3' \text{OCH}_3$) состоял в том, что в их $3'$ -положении содержалась группировка, химически инертная, модификация которой совершенно исключалась. По этой причине в $3'$ -конец транскрипта не представлялось возможным включить какой-либо остаток, обладающий репертерными, лигандными или другими свойствами.

Чтобы преодолеть эти недостатки, мы разработали общую схему синтеза и провели изучение в РНК-синтезирующей системе *in vitro* ряда аналогов γ NTP, содержащих в $3'$ -положении аминогруппу и ее производные. Аминогруппа в $3'$ -положении представлялась нам перспективным заместителем по следующим причинам: эта группа по объему и электроноакцепторным свойствам не слишком отличается от гидроксильной; замена гидроксильной в $3'$ -положении на аминогруппу не сильно изменяла общую конформацию молекулы, что было известно из исследования ПМР-спектров соответствующих нуклеозидов [4, 5]. В то же время в литературе отсутствовали данные, которые характеризовали бы свойства аминогруппы в $3'$ -положении субстрата в полимеризующих нуклеотидных системах; другими словами, не было известно, катализируют ли ферменты полимеризации образование фосфоамидных связей. Поэтому для введения аминопроизводных нуклеотидов в практику молекулярно-биологических исследований было необходимо выяснить некоторые вопросы.

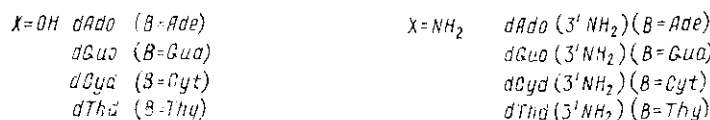
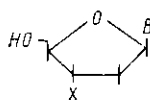
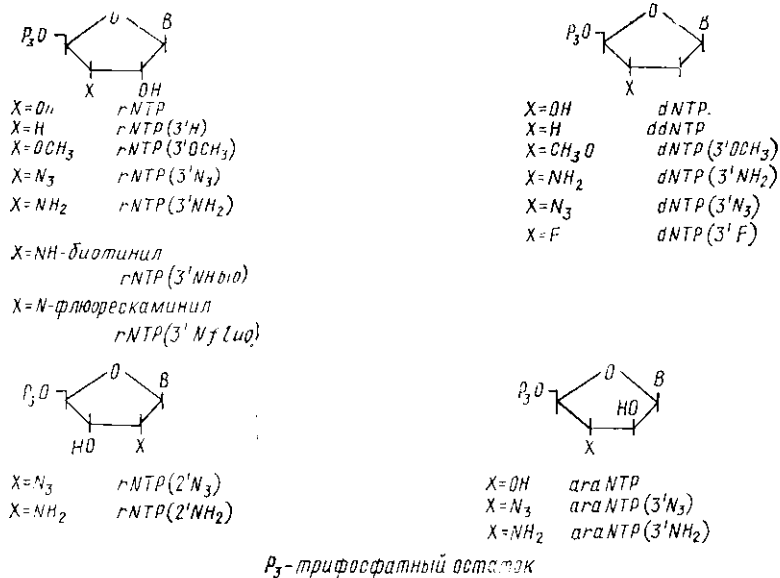
На первом этапе в результате экспериментального рассмотрения ряда вариантов нами разработана общая схема синтеза γ NTP ($3' \text{N}_3$), γ NTP ($3' \text{NH}_2$) и их $3'$ -производных [6—8], позволяющая синтезировать все названные соединения с каждым из природных нуклеиновых оснований — аденином, гуанином, цитозином и урацилом. Для этого найдена простая, короткая и эффективная схема синтеза исходного замещенного сахара (I), который конденсацией с защищенными основаниями (B—X) дает соответствующие нуклеозиды (II) с азидогруппой в $3'$ -положении — схема (1). Эта азидогруппа на любой последующей стадии может быть превращена в аминогруппу.



Азидонуклеозиды превращали далее в соответствующие $5'$ -трифосфаты γ NTP ($3' \text{N}_3$) и восстанавливали в γ NTP ($3' \text{NH}_2$) [8]. Аминогруппа в γ NTP ($3' \text{NH}_2$) проявляла ярко выраженные нуклеофильные свойства и легко реагировала с *N*-биотинилимидазолом, прокрашивалась флуорескаминном; в результате этих реакций получены γ NTP ($3' \text{NHbio}$) и γ NTP ($3' \text{Nfluo}$). Одна из групп этих соединений — γ NTP ($3' \text{Nfluo}$) — несет флуоресцентную метку, другая — γ NTP ($3' \text{NHbio}$) — лигандную группу. Строение всех исследуемых соединений представлено на схеме (2).

Все полученные соединения испытаны в бесклеточной системе синтеза РНК на ДНК фага *DIII T7*, инициируемого с промотора A1; синтез катализировался РНК-полимеразой из *E. coli*. Эффективными терминаторами синтеза РНК оказались γ NTP ($3' \text{NH}_2$): включаясь в $3'$ -конец растущей цепи РНК, они прекращали ее дальнейшую элонгацию, что видно из фотографий электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Эффективность γ NTP ($3' \text{NH}_2$) как терминаторов была сравнима с эффективностью γ NTP ($3' \text{OCH}_3$). Из этих данных следовало, что γ NTP ($3' \text{NH}_2$), включившись в цепь РНК, прерывает последующее удлинение цепи РНК. Отсутствие образования фосфоамидных связей при катализе синтеза РНК РНК-полимеразой из *E. coli* показано так-

же в экспериментах, в которых реплику РНК подвергали кислотной обработке [8]. При таком воздействии фосфамидные связи гидролизуются и, таким образом, можно было бы наблюдать уменьшение длины реплики после соответствующей обработки по сравнению с контролем. Однако никакого изменения не было. Из этих данных становится очевидно, что во время эксперимента гNTP(3'NH₂) включается исключительно в 3'-конец транскрипта и РНК-полимераза из *E. coli* не способна катализировать синтез фосфамидных связей.



Обычно реакцию синтеза РНК проводили при рН 8,0; в этом случае 3'-аминогруппа находится в протонированном состоянии на 70—80 %, так как ее $pK_a=8,5$ [8]. В то же время известно, что протонированная NH₃⁺-группа обладает лишь слабыми нуклеофильными свойствами. Поэтому были поставлены опыты при рН 7; 8,5; 9 и 9,5. При рН 9 и 9,5 гNTP(3'NH₂) практически полностью депротонирована. Однако и при рН выше pK_a гNTP(3'NH₂) столь же эффективно терминировали синтез РНК.

Терминаторными свойствами обладали гNTP(3'N₃), гNTP(3'NH₂), гNTP(3'NHbio) и гNTP(3'Nfluo), хотя некоторые из них было необходимо использовать в более высокой концентрации. Терминирование синтеза РНК некоторыми соединениями показано на рис. 1 (см. вклейку), а также в табл. 1, где в условной относительной шкале приводятся свойства названных и некоторых других изученных нами соединений.

Основные наши усилия были, однако, посвящены ингибиторам биосинтеза ДНК. Был выбран тот же подход — синтез субстратоподобных ингибиторов, модифицированных по дезоксирибозидному остатку.

Ранее был известен только один тип терминаторов синтеза ДНК [9—11]. Это связано с более строгим отбором ДНК-полимеразами своих субстратов за счет наличия у бактериальных полимераз 3'→5'-

эксонуклеазной активности, а также достаточно высокой пирофосфорилазной активности у ДНК-полимераз по сравнению с РНК-полимеразы. В качестве примера более высокой специфичности ДНК-полимераз по сравнению с РНК-полимеразы можно привести свойства dNTP (3'OCH₃); эти соединения совершенно не обладают терминаторными качествами при синтезе ДНК, тогда как rNTP (3'OCH₃), как упоминалось выше, эффективно терминируют синтез РНК.

Таблица 1

Субстратные свойства ряда соединений в синтезе РНК, катализируемом РНК-полимеразой *E. coli*
Substrate properties of some compounds in RNA synthesis catalyzed by E. coli RNA polymerase

Соединение	Включение в 3'-конец цепи РНК*	Возможность элонгации цепи после включения
rNTP (3'NH ₂)	+++	—
rNTP (3'NHbio)	+++	—
rNTP (3'NHuo)	++	—
rNTP (3'N ₃)	+	—
rNTP (2'N ₃)	++	+
rNTP (2'NH ₂)	+—	++
rNTP (3'OCH ₃)	+++	—
rNTP (2'OCH ₃)	—	—
dNTP (3'NH ₂)	—	—
araNTP (3'NH ₂)	—	—

* Величина терминирующего эффекта пропорциональна количеству знаков «+»; знак «—» показывает отсутствие термизации.

Таблица 2

Этапы выделения ДНК-полимеразы α из тимуса телят (1 кг)
Stages of isolation of DNA polymerase α from calf thymus (1 kg)

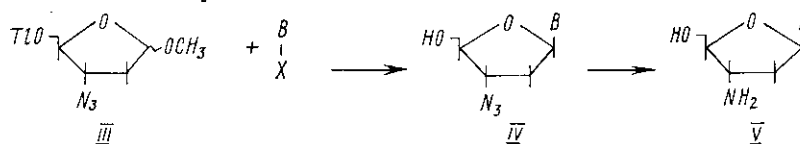
Этапы выделения	Белок, мг	Удельная активность, ед./мг*	Общая активность, ед.	Выход, %
Гомогенат	100000	2,5	250000	100
Фосфоцеллюлоза	800	250	200000	80
Гидроксипатит	125	800	100000	40
Сефароза 6В	53	1500	80000	32
ДЭАЭ-целлюлоза	20	2500	50000	20
Bio Rex 70	4	5000	20000	8

* 1 ед. активности соответствует 1 нмоль субстрата, включенного в цепь ДНК за 1 ч, 37°C.

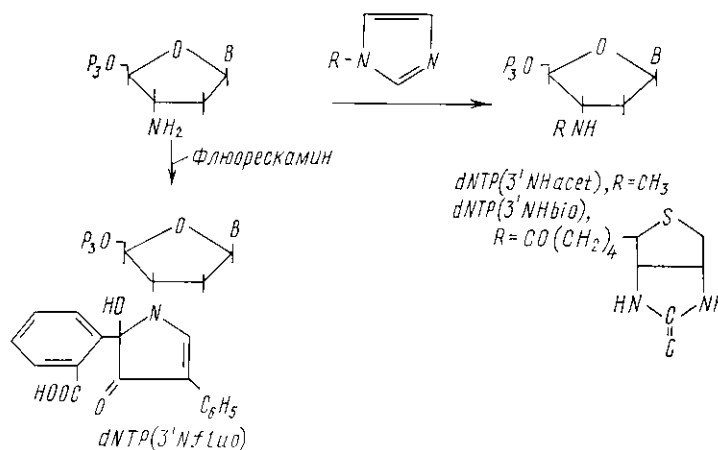
Из литературы известно, что среди испытанных ранее соединений терминаторными свойствами в синтезах, катализируемых ДНК-полимеразы, обладали только ddNTP [9, 10]. Эти соединения сыграли и сейчас играют огромную роль при определении структуры ДНК полимеризационным методом [10, 11]. Однако ddNTP обладают сравнительно высоким субстратным сродством только к некоторым ДНК-полимеразам (ДНК-полимеразе I из *E. coli*, ДНК-полимеразе фага T7, ДНК-полимеразам типа β из млекопитающих, ревертазе, концевой дезокси-нуклеотидилтрансферазе), но основные реплицирующие ДНК-полимеразы млекопитающих (типа α) практически не используют ddNTP в качестве субстрата.

Нами разработана общая схема синтеза 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидов — III, схема (3) [12, 13], которые далее превращаются в dNTP (3'NH₂) [14] (в этой части работы принимали участие также Н. Б. Дяткина и В. Е. Зайцева). Схема пригодна для синтеза нуклеозидов с не природными основаниями, полезными для изучения физико-

химических основ мутагенеза.



Далее нуклеозиды IV, схема (3), либо восстанавливают в 3'-амино-2',3'-дидезоксинуклеозиды V, либо фосфорилируют и затем восстанавливают в dNTP (3'NH₂). Последние в соответствии со схемой (4) переводятся в производные по 3'-аминогруппе.



Для обеспечения ферментативной части исследования нами осуществлено выделение ДНК-полимераз α (из тимуса теленка) и β (из печени крыс), причем методики выделения существенно модифицированы по сравнению с литературными. Схемы выделения ферментов суммированы в табл. 2 и 3, чистота проиллюстрирована электрофорезом в ПААГ (рис. 2, см. вклейку). При седиментации ДНК-полимеразы α в градиенте сахарозы найдено, что фермент содержит две фракции: одна — 80 % общей активности, коэффициент седиментации 5,7 S, вторая — 20 % и 9,0 S соответственно. Из литературы известно, что фракция 5,7 S является продуктом протеолиза нативного фермента, 9,0 S, но обладает ферментативной активностью [15]. Фермент свободен от экзо- и эндонуклеазной активностей и от фосфатазной активности. Ингибирование фермента N-этилмалеимидом, быстрая температурная инактивация, а также ингибирование araNTP позволяют отнести его к ДНК-полимеразам типа α .

Для ДНК-полимеразы β предложена эффективная и воспроизводимая методика выделения и очистки, основанная на учете свойств этого

Таблица 3

Этапы выделения ДНК-полимеразы β из печени крыс
Stages of isolation of DNA polymerase β from rat liver

Этапы выделения	Белок, мг	Удельная активность, ед./мг*	Общая активность, ед.	Выход, %
Очистка и экстракция хроматина	3300+нуклеиновая кислота	27	89000	100
ДЭАЭ-целлюлоза+фосфоцеллюлоза	25,8	1000	25800	29
Affigel Blue A	2,0	9500	19000	21,2
ДНК-сефароза	0,24	31000	7400	8,4

* 1 ед. активности соответствует 1 нмоль субстрата, включенного в цепь ДНК за 1 ч, 37 °С.

типа ферментов. Путь очистки изложен в табл. 3. Полученный фермент имел удельную активность, соответствующую литературным данным для ДНК-полимераз из других источников [16—18]. Фермент имел молекулярную массу 38000—40000 (по подвижности в ПААГ в денатурирующих условиях), рI 8,6—8,9, стабилен при действии N-этил-малеимида; синтез, катализируемый полученной полимеразой, ингибируется ddNTP, но довольно резистентен к agaNTP. Все это позволяет отнести фермент к группе ДНК-полимераз β . Фермент не содержит экзо- и эндонуклеазных активностей и при электрофорезе в ПААГ дает одну полосу при прокраске серебром (рис. 2).

Терминаторные свойства аналогов нуклеозид-5'-трифосфатов изучали в системе полимеризации, содержащей фрагмент плазмиды

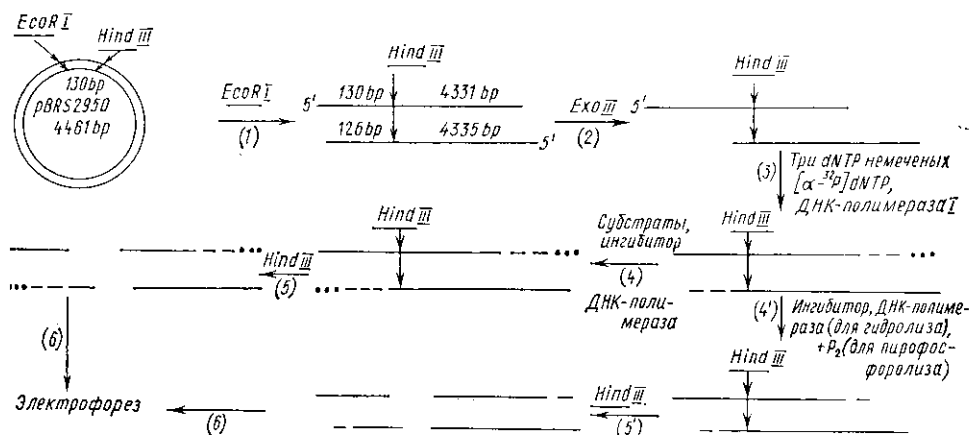


Рис. 3. Схема эксперимента по элонгации (этапы 1→6), а также гидролизу или пирофосфоролузу (1→3→4а→6) с участием ДНК плазмиды *pBRS2950*: *bp* — пары оснований; — — — радиоактивно меченные фрагменты ДНК; ... — фрагменты ДНК, синтезированные в присутствии ингибиторов. Стрелками показаны места расщепления ДНК рестриктазами.

Fig. 3. A scheme of elongation (stages 1→6), hydrolysis of pyrophosphorolysis (1→3→4a→6) with *pBRS2950* plasmid DNA: *bp* — base pairs; — — — radioactive labeled DNA fragments; ... — DNA fragments synthesized in the presence of inhibitors. Arrows show the restriction sites on the DNA molecule after the action of endonucleases *Hind III* and *EcoRI*.

pBRS2950, содержащей видоизмененный (удлиненный по сравнению с диким штаммом *pBR322*) фрагмент между участками рестрикции *EcoRI* и *HindIII*, на котором удобно проводить эксперименты по полимеризации [19].

Схема проведения опытов показана на рис. 3. ДНК плазмиды *pBRS2950*, несущей по одному участку расщепления для рестриктаз *EcoRI* и *HindIII*, с длиной малого фрагмента между этими участками 130 пар оснований (структура фрагмента представлена на схеме (5)), расщепляемая *EcoRI* (этап 1), и линейная ДНК обрабатываются экзонуклеазой III из *E. coli* 8—15 мин (этап 2), в течение которых участки ДНК длиной 70—120 нуклеотидных остатков подвергаются гидролизу. После этой стадии ДНК метят, проводя частичное достраивание гидролизованных цепей в присутствии трех немеченных dNTP и одного [α - ^{32}P]dNTP в присутствии ДНК-полимеразы I (этап 3). На очищенной от избытка субстратов ДНК проводят дальнейший ресинтез в присутствии субстратов и ингибитора, катализируемый той ДНК-полимеразой, которая изучается в этом эксперименте (этап 4). По завершении синтеза ДНК расщепляется рестриктазой *HindIII* (этап 5) и ее фрагменты подвергаются электрофорезу в геле (этап 6). Условия электрофореза выбирают так, чтобы малые фрагменты ДНК находились на рабочем участке геля, а большие — оставались вне его. По картинкам электрофореза удастся проанализировать эффект ингибиторов на каждом конкретном шаге полимеризации (пирофосфоролуза, гидроли-

за). Радиоактивно меченную (после этапа 3) ДНК можно также подвергать пирофосфоролиту или гидролизу, катализируемым ДНК-полимеразой (этап 4'), последующей рестрикции (этап 5') и электрофорезу.

1 GAATTCGGGG CGCACACTGC CTCTAGGTGA CTTAAGCGCA CCACGCACAT
CTTAAGCCCC GCGTGTGACG GAGATCCACT GAATTCGCGT GGTGCGTGTGTA

51 AAGGTGAAAC AAAACGGTTG ACAACATGAA GTAAACACGG TACCATCTAC
TTCCACTTTG TTTTGCCAAC TGTGTACTT GATTTGTGCC ATGCTACATG

101 CACATGAAAC GACAGTGAGT CAAATTCGAT AAGCT
GTGTACTTTG CTGTCACTCA GTTTAAGCTA TTGGA

В некоторых случаях использовали стандартную систему репликации *M13* рДНК с химически синтезированным олигонуклеотидным праймером [20].

Реакции полимеризации на индивидуальных матрицах имеют ряд важных преимуществ перед опытами с суммарной ДНК. При проведении полимеризации на индивидуальной матрице видны взаимоотношения полимеризующий комплекс — субстрат — ингибитор в каждом шаге полимеризации. На фотографиях электрофоретических гелей видны эти взаимоотношения на каждом нуклеотидном звене, что дает возможность связать каждый этап реакции полимеризации со структурой матрицы и праймера на этом участке, структурой субстрата или ингибитора. Из данных электрофореза удается увидеть, процессивно ли работает фермент, взаимоотношения скоростей элонгации и обратных реакций — пирофосфоролита и гидролиза.

На первом этапе исследований нами показано, что dNTP(3'NH₂) оказались эффективными терминаторами всех тестированных ДНК-полимераз. Тестированы были следующие ферменты: ДНК-полимераза I из *E. coli*, ДНК-полимераза α из тимуса теленка, ДНК-полимераза β из печени крыс [19], обратная транскриптаза, кодируемая вирусом птичьего миелобластома, а также концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза из тимуса теленка. Контролем служили ddNTP. Способность аналогов NTP терминировать синтез ДНК (включение в 3'-конец цепи ДНК), катализируемый обратной транскриптазой, представлена следующими данными:

ddNTP	+
dNTP(3'NH ₂)	+
dNTP(3'NHacet)	+
dNTP(3'NHbio)	+
dNTP(3'Nfluo)	+
dNTP(3'F)	+
araNTP(3'NH ₂)	+
araNTP(3'N ₃)	+
araNTP	+
rNTP	—

Примерно одинаковую эффективность dNTP(3'NH₂) и ddNTP показали для ДНК-полимеразы β и обратной транскриптазы (часть опытов с обратной транскрипцией выполнена А. М. Мазо). Синтез, катализируемый обратной транскриптазой, терминировался также araNTP(3'NH₂), araNTP(3'N₃) и dNTP(3'F). В случае ДНК-полимеразы I, применяемой обычно для определения первичной структуры методом Сенгера, dNTP(3'NH₂) были в 2—5 раз эффективнее, чем ddNTP (эти опыты выполнены А. С. Краевым, Б. К. Черновым и К. Г. Скрябиным); для ДНК-полимеразы α ddNTP практически вообще не обладали терминаторными свойствами, тогда как dNTP(3'NH₂) были высокоэффективны. И только для концевой дезоксинуклеотидил-

трансферазы ddNTP были более эффективны, чем dNTP(3'NH₂), хотя последние также оказались хорошими терминаторами. В качестве примеров приведены рис. 4 (см. вклейку) и рис. 5.

Терминаторные свойства dNTP(3'NH₂) означают следующее. 1 — dNTP(3'NH₂) узнаются комплексом [праймер-матрица+ДНК-полимераза] как субстраты, после чего 5'-моонуклеотидный остаток dNTP(3'NH₂) включается в 3'-конец праймера. Это включение непосредственно видно на картине гель-электрофореза, так как полосы

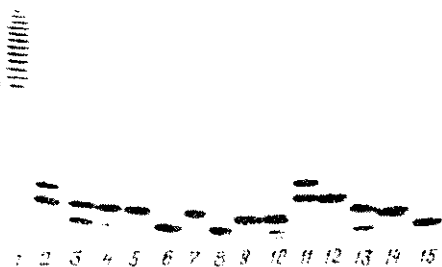


Рис. 5. Включение NTP в 3'-конец [³²P]-d(pGTAATCCCATGTT), pH 6,5, 37°C, 20 мин: dTTP (1); rUTP (2); 500 мкМ rUTP(2'N₃) (3); dTTP(3'NH₂) (4); dTTP(3'NHbio) (5); dTTP(3'Niluo) (6); dTTP(3'NHacet) (7); исходный олигонуклеотид без инкубации (8); ddCTP (9); dCTP(3'NH₂) (10); araCTP (11); rCTP (12); araATP(3'NH₂) (13); dATP(3'F) (14); олигонуклеотид, инкубированный без rNTP (15).

Fig. 5. Incorporation of NTP into 3'-termini of [³²P]-d(pGTAATCCCATGTT), pH 6.5, 37°C, 20 min: dTTP (1); rUTP (2); 500 μM rUTP(2'N₃) (3); dTTP(3'NH₂) (4); dTTP(3'NHbio) (5); dTTP(3'Niluo) (6); dTTP(3'NHacet) (7); control oligonucleotide without incubation (8); ddCTP (9); dCTP(3'NH₂) (10); araCTP (11); rCTP (12); araATP(3'NH₂) (13); dATP(3'F) (14); oligonucleotide incubated without rNTP (15).

олигонуклеотидов оканчиваются теми нуклеотидными остатками, которые по природе основания соответствуют терминатору [19] и ни на каких других. 2 — После включения нуклеотидного остатка в 3'-конец праймера дальнейшее продолжение цепи ДНК становится невозможным. В случае ddNTP это совершенно очевидно, так как в 3'-положении ddNTP не содержится способной к реакции химической группы. Однако у dNTP(3'NH₂) в 3'-положении имеется NH₂-группа, которая в принципе может участвовать в последующей реакции, образуя фосфамидную связь — NH—P(O)(OH)—O—. Вопрос в нашем случае состоял лишь в том, способны ли ДНК-полимеразы катализировать образование такой фосфамидной связи.

Для выяснения этого были сделаны следующие контроли. После завершения опытов с терминацией к реакционной смеси добавляли избыток субстратов и инкубировали ее дополнительно. Никакого изменения распределения полос на гелях по сравнению с контролем не зафиксировано. В другой серии опытов после терминации полимеризации смесь инкубировали при pH 2—3 (добавляя уксусную кислоту) различное время, после чего проводили электрофорез. И также никакого изменения полос на электрофореграммах замечено не было. Эти данные иллюстрируют отсутствие образования фосфамидных связей, ибо в первом случае полосы должны были бы сдвинуться в более полимерную область, а во втором — напротив, в менее полимерную [19].

Однако при нейтральных pH NH₂-группа в dNTP(3'NH₂) находится в протонированном состоянии NH₃⁺, как для rNTP(3'NH₂).

В dNTP pK_a NH₂-группы составляет 9,1—9,2 [21]. Поэтому следующие опыты по терминации были проведены при pH 8 и 8,5. При pH 8,5 по крайней мере 20 % терминатора и также затерминированного праймера находятся в депротонированной форме. Однако и при этой величине pH картина полос не изменялась. Таким образом, очевидно, что РНК- и ДНК-полимеразы не способны катализировать образование фосфамидных связей [8, 19].

Затем в качестве ингибиторов элонгации ДНК были испытаны замещенные по 3'-аминогруппе соединения, а именно dNTP(3'NHacet), dNTP(3'NHbio) и dNTP(3'Niluo). Эти исследования проведены для трех ферментов — ДНК-полимеразы I из *E. coli*, α из тимуса телянка и концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы из тимуса телянка [22].

Все три соединения показали эффективные терминаторные свойства при катализе ДНК-полимеразой I; dNTP(3'NHacet) и в более слабой степени dNTP(3'NHbio) — для ДНК-полимеразы α и, наконец, dNTP(3'NHacet) и dNTP(3'NHbio) для дезоксинуклеотидилтрансферазы. Эти данные отражены на рис. 5 и 6 (см. вклейку) и в табл. 4.

Таблица 4

Субстратные свойства аналогов NTP для концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы
Substrate properties of NTP analogs for terminal deoxynucleotidyltransferase

Нуклеотид	Максимальное количество нуклеотидных остатков, включенных в олигонуклеотид	Отношение скоростей включения аналога (V_a) и (V_{dTTP})
dTTP	∞	1,0
dCTP	∞	2,0
dGTP и dATP	∞	1,2
ddCTP	1	0,5
ddATP	1	0,3
dTTP(3'NH ₂)	1	0,1
dCTP(3'NH ₂)	1	0,2
dTTP(3'NHacet)	1	0,2
dTTP(3'NHbio)	1	0,15
dTTP(3'NHfluo)	0	0
dATP(3'F)	1	0,4
dTTP(3'F)	1	0,3
dNTP(3'OCH ₃)	0	0
rNTP(3'NH ₂)	0	0
rNTP(3'OCH ₃)	0	0
rNTP(2'N ₃)	1—2	0,05
agaNTP	3	0,2—0,3
agaNTP(3'NH ₂)	1	0,15—0,2
rNTP	2	0,1—0,2

Примечание. Соединения rNTP(2'N₃) и rNTP(2'NH₂) синтезированы Л. А. Александровой; rNTP(3'OCH₃) и dNTP(3'OCH₃) — В. Л. Флорентьевым и А. М. Крициным; agaNTP(3'NH₂) — А. М. Папчихиным; dNTP(3'F) — в лаборатории И. А. Михайлопуло.

Суммируя данные по терминаторным свойствам dNTP(3'NH₂), можно сделать следующие выводы.

1. Замещение 3'-гидроксила в природных субстратах ДНК-полимераз dNTP на аминогруппу не приводит к значительному ухудшению субстратных свойств dNTP(3'NH₂) на стадии включения в 3'-конец цепи ДНК. Из испытанных нами ферментов (табл. 5, 6) все типы обладали высоким сродством к dNTP(3'NH₂); единственным ферментом, для которого dNTP(3'NH₂) уступали по сродству ddNTP, была концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза, но и в этом случае сродство dNTP(3'NH₂) было достаточно велико. В литературе не сообщалось ни об одном аналогичном ингибиторе со столь широким спектром активности. Из сказанного можно сделать заключение, что замена гидроксильной группы на аминогруппу в 3'-положении не сильно искажает конформационные и электронные свойства молекул нуклеозидтрифосфатов.

2. Будучи присоединенными к 3'-концу праймера 3'-аминонуклеотиды полностью прерывают дальнейшую элонгацию цепи.

3. Даже введение достаточно объемных заместителей по 3'-аминогруппе сохраняет терминаторные свойства 3'-замещенных нуклеозидтрифосфатов, по крайней мере для некоторых ДНК-полимераз.

Будучи присоединенными к 3'-концу праймера, 3'-аминонуклеотиды со свободной или замещенной аминогруппой ингибируют также реакцию пирофосфоролиза, а для ДНК-полимеразы I также и 3'→5'-экзонуклеазного гидролиза. Эти данные отчетливо видны на фотографиях электрофорезов в ПААГ. В качестве примера приведен гидролиз ДНК (рис. 7, см. вклейку), катализируемый ДНК-полимеразой I. Свойство терминаторов ингибировать гидролиз, помимо сведений о процессе синтеза ДНК, имеет еще одно существенное значение для изучения первичной структуры ДНК методом Сенгера. Качество тер-

минирующего субстрата для определения первичной структуры, катализируемого бактериальными ДНК-полимеразами, прямо пропорционально скорости включения терминатора в 3'-конец ДНК и обратно пропорционально скорости его 3'→5'-экзонуклеазного гидролиза. Только в случае достаточно большого различия в скоростях включения/гидролиза соединения будут служить терминаторами. Причина большого различия в скоростях прямой и обратной реакции для терминаторов по сравнению с природными субстратами заключается, видимо, в различии скоростей ассоциации фермента с комплексом [матрица+праймер].

Таблица 5

Свойства аналогов NTP в реакциях терминации, элонгации, гидролиза или пирофосфоролиза, катализируемых ДНК-полимеразами I и α

Properties of NTP analogs in the course of elongation, hydrolysis or pyrophosphorolysis reactions catalyzed by DNA polymerases I and α

Ингибитор	ДНК-полимераза	Терминация элонгации	Специфическое ингибирование гидролиза	Специфическое ингибирование пирофосфоролиза
dNTP (3'NH ₂)	I	+	+	+
	α	+		+
dNTP (3'NHacet)	I	+	+	+
	α	+		—
dNTP (3'NHbio)	I	+	+	+—
	α	—		
dNTP (3'Niluo)	I	+	+	+—
	α	+—		
dNTP (3'F)	I	+	+	+—
	α	—		
ddNTP	I	+	+	+—
	α	—		
rNTP	I	—	+	
	α	—		
rNTP (2'NH ₂) и rNTP (2'N ₃)	I	—	+—	
	α	—		
rNTP (3'NH ₂)	I	—	—	
	α	—		

Примечание. «+» — сильное специфическое к основанию ингибирование; «+—» — специфическое, но не сильное ингибирование; «—» — нет ингибирования.

Таблица 6

Ингибирование репаративного синтеза ДНК в хроматине с помощью dNTP (3'NH₂)

Inhibition of repair synthesis in chromatin by dNTP (3'NH₂)

Ингибитор	Концентрация ингибитора, при которой достигается 50 %-ное ингибирование синтеза, мкМ	Молярное соотношение ингибитор:субстрат при 50 %-ном ингибировании ДНК
dTTP (3'NH ₂)	0,65	1 : 1
dATP (3'NH ₂)	0,65	1 : 1
dCTP (3'NH ₂)	0,65	1 : 1
dGTP (3'NH ₂)	1,5	2 : 1
ddTTP	0,65	1 : 1
araTTP	2,4	4 : 1

Чтобы оценить возможность использования новых ингибиторов в клеточных системах, на следующем этапе мы изучили действие dNTP (3'NH₂) на репликацию ДНК в ядрах эмбрионов морского ежа. Эта работа выполнена в сотрудничестве с Н. А. Терентьевой и В. А. Рас-

сказовым [23]. В выделенных ядрах эукариот происходит синтез фрагментов Оказаки, которые, как правило, не лигируются в полимерные цепи ДНК. Синтез фрагментов Оказаки катализируется ДНК-полимеразой типа α [24, 25]. Однако, в отличие от бесклеточной системы с чистыми ферментами, в ядрах в синтезе фрагментов ДНК участвует более сложный комплекс белков. Вследствие этих причин синтез ДНК в ядрах более приближен к репликации *in vivo*.

Концентрации dNTP ($3'NH_2$) (M), при которых синтез ДНК в ядрах эмбрионов ингибируется на 50 % [23], приведены ниже:

dTTP ($3'NH_2$)	$2 \cdot 10^{-4}$
dATP ($3'NH_2$)	$6 \cdot 10^{-5}$
dCTP ($3'NH_2$)	$2 \cdot 10^{-5}$
araTTP	$1 \cdot 10^{-4}$

Из этих данных видно, что все соединения эффективно ингибировали синтез ДНК, причем их действие было близким к эффекту araTTP — наиболее мощного ингибитора, катализируемого ДНК-полимеразой α

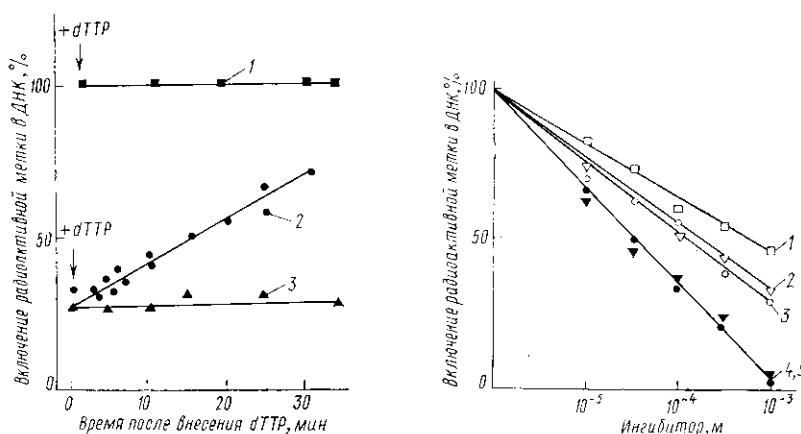


Рис. 8. Обратимость действия dTTP ($3'NH_2$) при добавлении 50-кратного избытка dTTP по отношению к ингибитору (2). Включение [3H]dCTP без ингибитора принято за 100 % (1); включение [3H]dCTP в присутствии $4 \cdot 10^{-4}$ M dTTP ($3'NH_2$) (3).

Fig. 8. The reversibility of action of dTTP ($3'NH_2$) on addition of a 50-fold excess of dTTP with respect to the inhibitor (2). Incorporation of [3H]dCTP to DNA without the inhibitor within a given time is taken as 100 % (1); incorporation of [3H]dCTP in the samples in the presence of $4 \cdot 10^{-4}$ M dTTP ($3'NH_2$) (3).

Рис. 9. Ингибирование включения [3H]dCyd в ДНК: 1 — dGuo ($3'NH_2$); 2 — dThd ($3'NH_2$); 3 — dAdo ($3'NH_2$); 4 — dCyd ($3'NH_2$); 5 — araCyd.

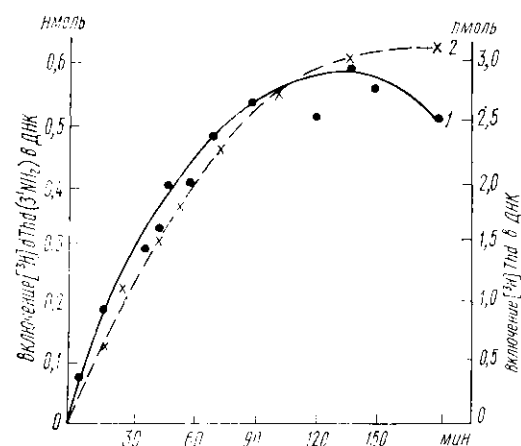
Fig. 9. Inhibition of [3H]dCyd incorporation into DNA of the embryo by: dGuo ($3'NH_2$) (1); dThd ($3'NH_2$) (2); dAdo ($3'NH_2$) (3); dCyd ($3'NH_2$) (4); araCyd (5).

синтеза ДНК. По профилю новосинтезированной ДНК в щелочном градиенте сахарозы можно увидеть, что основная радиоактивность находится во фрагментах ДНК с константой седиментации около 3,5 S [23]. Из этого очевидно, что в присутствии dNTP ($3'NH_2$) образуется меньшее количество фрагментов, но синтезируемые фрагменты имеют такую же величину, как и в отсутствие dNTP ($3'NH_2$). Эти данные показывают, что либо dNTP ($3'NH_2$) ингибируют инициацию элонгации фрагментов Оказаки, либо недостроенные фрагменты Оказаки гидролизуются какими-либо экзонуклеазами.

Ингибирование образования фрагментов Оказаки при участии dNTP ($3'NH_2$) происходит, по-видимому, по механизму терминации. В пользу этого свидетельствуют результаты, представленные на рис. 8. После внесения dTTP ($3'NH_2$) синтез ДНК ингибировался пропорционально концентрации внесенного dTTP ($3'NH_2$) (рис. 8). После добавления в реакционную массу избытка природного субстрата dTTP по

отношению к ингибитору (соотношение субстрат : ингибитор 50:1) синтез ДНК постепенно восстанавливался в течение 30—40 мин. Если бы dTTP(3'NH₂) ингибировал синтез ДНК не по механизму терминирования, а, например, по механизму конкурентного ингибирования, синтез ДНК восстанавливался бы сразу же после введения dTTP. Временная задержка, наблюдаемая в эксперименте, вызывается необходимостью репаративного выщепления звеньев терминаторных групп и восстановления нормального синтеза.

В качестве примера системы с репаративным синтезом ДНК выбран γ -облученный хроматин печени крыс. Эти опыты выполнены совместно с Н. В. Беляковой и В. М. Крутяковым [26].



Известно, что в этом случае в γ -облученном хроматине при добавлении субстратов проходит только репаративный синтез, катализируемый ДНК-по-

Рис. 10. Зависимость включения [3H]dTd(3'NH₂) в ДНК от времени в клетках миеломы p₃8Ag653 (1) и контрольное включение [3H]dTd (2).
Fig. 10. Time dependence of [3H]dTd(3'NH₂) incorporation into DNA of p₃8Ag653 myeloma cells (1); control incorporation of [3H]dTd (2).

лимеразой β . Однако помимо ДНК-полимеразы β в хроматине содержится большой комплекс других белков, вклад которых в репарацию ДНК не известен [27—29].

В табл. 6 показаны концентрации dNTP(3'NH₂), при которых достигается 50 %-ное ингибирование репаративного синтеза ДНК [26]. Как видно из таблицы, ингибирование синтеза ДНК на 50 % достигается при соотношении ингибитор : субстрат 1:1. Эти данные иллюстрируют высокую ингибирующую способность dNTP(3'NH₂), подобную действию ddNTP — наиболее мощных ингибиторов репаративного синтеза ДНК.

Проведенные две серии опытов с ядрами эмбрионов и хроматином печени крыс показали, что dNTP(3'NH₂) проявляли мощные ингибирующие свойства на полимолекулярном уровне организации. Однако при переходе к системе *in vivo* на клетках возникает ряд дополнительных проблем, связанных с проницаемостью клеточных стенок для ингибиторов, возможностью фосфорилирования, вероятностью дополнительных метаболических превращений, которые уничтожили бы ингибиторные свойства изучаемых молекул.

Была проведена серия опытов на клетках миеломы мышей p₃8Ag653 [30], а также эмбрионах морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* [31]. Так как известно, что фосфаты нуклеозидов не проникают через клеточную стенку или проникают в незначительной степени, мы использовали для этих целей 3'-амино-2',3'-дидезоксинуклеозиды, а именно Cyd(3'NH₂), Ado(3'NH₂), Thd(3'NH₂) и Guo(3'NH₂).

При проведении опытов с эмбрионами морских ежей найдено, что все четыре экзогенных природных [3H]2'-дезоксинуклеозида (Cyd, Guo, Ado, Thd) способны включаться в ДНК эмбрионов или, другими словами, кинироваться в эмбрионах в соответствующие dNTP (все опыты с эмбрионами морских ежей выполнены совместно с Л. Л. Терентьевым, Н. А. Терентьевой и В. А. Рассказовым).

Далее были проверены все четыре 3'-амино-2',3'-дидезоксинуклеозида в качестве ингибиторов репликации в эмбрионах морских ежей. Графики рис. 9 демонстрируют ингибирование включения [3H]dCyd в

ДНК. Для сравнения показано ингибирование включения [^3H]dCyd арабинозилцитидином. Такая же картина была обнаружена и для включения в ДНК [^3H]dThd в эмбрионы морских ежей и клетки миеломы мыши (эксперименты с клетками мыши проведены С. В. Кочетковой).

Анализ этих данных показывает, что, во-первых, все аминоклеозиды ингибируют включение меченых дезоксирибонуклеозидов в ДНК при репликации и, во-вторых, это включение не специфично к основанию, т. е. каждый аминоклеозид ингибирует включение любого природного нуклеозидов, например, dAdo(3'NH₂) препятствует включению в ДНК dCyd или же dThd. Эта неспецифичность включения косвенно подтверждает ингибирование на уровне образования цепей ДНК.

Для выяснения справедливости этих предположений был приготовлен [^3H]dThd(3'NH₂) и в клетках миеломы показаны его превращения. Препарат проникает в клетки, фосфорилируется, трифосфорилируется и превращается в [^3H]dTTP(3'NH₂). После этого радиоактивная метка включается в ДНК и одновременно с этим ингибируется синтез ДНК (рис. 10). Эти данные убеждают в том, что в клетках эукариот ингибиторы на основе 3'-аминоклеозидов можно успешно использовать для изучения биосинтеза ДНК.

Представленный в настоящей публикации цикл исследований показывает, что аналоги природных рибо- и 2'-дезоксирибонуклеотидов, в которых гидроксил при С₃ замещен на аминогруппу, служат мощными ингибиторами биосинтеза РНК и ДНК (транскрипции, репликации, репарации, обратной транскрипции, дополнительного синтеза, катализируемого концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой) в бесклеточных, а также клеточных системах. Молекулярный механизм ингибирования rNTP(3'NH₂) и dNTP(3'NH₂) состоит в терминации цепей РНК и ДНК. Новый тип ингибиторов представляется нам полезным для изучения биосинтеза ДНК в клетках.

В настоящее время для изучения биосинтеза ДНК *in vivo* и *in vitro* в наших лабораториях используют разнообразные аналоги нуклеозидов и их фосфатов, содержащие амино- или азидогруппы.

NEW INHIBITORS OF DNA AND RNA BIOSYNTHESIS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

R. Sh. Beabekashvili, Z. G. Chidgevadze, A. A. Krayevsky, M. K. Kukhanova,
A. M. Atrazhev, A. V. Azhaev, T. V. Kutateladze

Research Institute of Experimental Cardiology,
National Cardiological Scientific Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR,
Moscow;

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Georgian SSR, Tbilisi

Summary

This review summarizes the authors' data on the pathways of the synthesis and properties of a great number of new inhibitors of DNA and RNA biosynthesis *in vitro* and *in vivo*. The molecular mechanism of the action of these inhibitors in the reactions of polymerization, pyrophosphorolysis and hydrolysis is determined using individual templates with involvement of purified DNA and RNA polymerases. Some of these inhibitors are shown to be applicable for studying of replication in the culture of eukaryotic cells, in embryos and cell nuclei, as well as for repairing DNA in chromatin

1. Suchadonik R. J. Naturally occurring nucleoside and nucleotide antibiotics.— *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, 1979, 22, p. 193—292.
2. Айвазашвили В. А., Библиашвили Р. Ш., Флорентьев В. А. Аналоги АТФ в РНК-полимеразной реакции.— *Молекуляр. биология*, 1977, 11, № 4, с. 854—863.
3. Specific termination of RNA polymerase synthesis as a method of RNA and DNA sequencing / V. D. Axelrod, R. M. Vartikyan, V. A. Aivazashvili, R. Sh. Beabekashvili.— *Nucl. Acids Res.*, 1978, 5, N 10, p. 3549—3563.

4. *Solution conformational analysis of 2'-amino-2'-deoxyadenosine, 3'-amino-3'-deoxyadenosine and puromycin by pulsed NMR method* / H. Plach, E. Westhof, H. D. Lüdemann, R. Mengel.— *Eur. J. Biochem.*, 1977, **80**, N 1, p. 295—304.
5. *Proton magnetic resonance studies of 2', 3'- and 5'-deoxyadenosine conformations in solution* / E. Westhof, H. Plach, I. Cuno, H. D. Lüdemann.— *Nucl. Acids Res.*, 1977, **4**, N 4, p. 939—953.
6. *Aminonucleosides and their derivatives. IV. Synthesis of 3'-amino-3'-deoxynucleoside 5'-phosphates* / A. V. Azhaye, A. M. Ozols, A. S. Bushnev et al.— *Ibid.*, 1979, **6**, N 2, p. 625—643.
7. *Aminonucleosides and their derivatives. VI. A new synthesis of 1,2,5-tri-O-acyl-3-azido-3-deoxy-β-D-ribofuranose* / A. M. Ozols, A. V. Azhaye, N. B. Dyatkina, A. A. Krayevsky.— *Synthesis*, 1980, N 7, p. 557—559.
8. *3'-Deoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates — terminators of RNA synthesis, catalyzed by DNA-dependent RNA polymerase from E. coli* / T. Kutateladze, R. Beabealashvili, A. Azhaye, A. Krayevsky.— *FEBS Lett.*, 1983, **153**, N 2, p. 420—426.
9. *Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXIV. Termination of chain growth by a 2',3'-dideoxyribonucleotide* / M. R. Atkinson, M. P. Deutcher, A. Kornberg et al.— *Biochemistry*, 1969, **8**, N 12, p. 4897—4904.
10. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors.*— *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 1977, **74**, N 12, p. 5463—5467.
11. *Smith A. J. H. DNA sequence analysis by primed synthesis.*— *Meth. Enzymol.*, 1980, **65**, p. 560—580.
12. *Dyatkina N. B., Azhaye A. V. Aminonucleosides and their derivatives. XII. A new synthesis of 1-O-methyl-3-azido-2,3-dideoxy-D-ribofuranose.*— *Synthesis*, 1984, N 11, p. 961—963.
13. *Aminonucleosides and their derivatives. XIII. Synthesis of benzimidazole azidonucleosides.* / N. B. Dyatkina, A. A. Krayevsky et al.— *Ibid.*, 1985, N 4, p. 410—411.
14. *Аминонуклеозиды и их производные. XI. Синтез 3'-амино-3'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов* / В. Е. Зайцева, Н. Б. Дяткина, А. А. Краевский и др.— *Биоорганическая химия*, 1984, **10**, № 5, с. 670—680.
15. *Grosse F., Krauss G. Purification of a 9S DNA polymerase species from calf thymus.*— *Biochemistry*, 1981, **20**, N 19, p. 5470—5475.
16. *Chang L. M. S. Low molecular weight DNA polymerase from calf thymus chromatin.*— *J. Biol. Chem.*, 1975, **248**, N 11, p. 3789—3795.
17. *Wang T. S. F., Sedwick W. B., Korn D. Nuclear DNA polymerase, purification and properties of the homogeneous enzyme from human KB cells.*— *Ibid.*, 1974, **249**, N 3, p. 841—847.
18. *DNA polymerase from brain neurons is a repair enzyme* / J. Wager, U. Hübsher, C. Kuenzle, S. Spodar.— *Eur. J. Biochem.*, 1979, **942**, N 3, p. 361—368.
19. *2',3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases* / Z. G. Chidgevadze, R. Sh. Beabealashvili, A. M. Atrazhev et al.— *Nucl. Acids Res.*, 1984, **12**, N 3, p. 1671—1684.
20. *Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of Hind II fragment of lac regulatory region in M13 replicative form in vitro* / J. Messing, B. Gronenborn, B. Mueller-Hill, P. Y. Hofschneider.— *PNAS USA*, 1977, **74**, N 7, p. 3642—3646.
21. *Аминонуклеозиды и их производные. X. 2'-Дезоксинуклеозиды и 2'-дезоксинуклеотиды с фосфамидными связями* / В. Е. Зайцева, Н. В. Скапцова, А. В. Ажаев, А. А. Краевский.— *Биоорганическая химия*, 1984, **10**, № 3, с. 401—407.
22. *2',3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-phosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases* / A. Krayevsky, M. Kukhanova, A. Atrazhev et al.— *Nucl. Acids Res., Symp. Ser.*, 1984, N 14, p. 283—284.
23. *Inhibition of replicative DNA synthesis in nuclei of sea urchin embryo Strongylocentrotus intermedius by 2',3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates* / M. Kukhanova, A. Krayevsky, N. Terentyeva, V. Rasskazov.— *Biochim. et biophys. acta*, 1984, **783**, N 2, p. 221—226.
24. *Zoncheddu A., Accomando R., Badaraceo G. Comparison of the effects of differential inhibitors of eucaryotic DNA polymerases on DNA synthesis in isolated rat liver nuclei.*— *Int. J. Biochem.*, 1983, **15**, N 3, p. 337—342.
25. *Wagar M. A., Evans M. J., Huberman J. A. Effect of 2',3'-dideoxythymidine 5'-triphosphate on HeLa cell in vitro DNA synthesis: evidence that DNA polymerase α is the only polymerase required for cellular DNA replication.*— *Nucl. Acids Res.*, 1978, **5**, N 6, p. 1933—1946.
26. *2',3'-Dideoxy-3'-aminonucleoside 5'-triphosphates inhibit the repair of DNA in rat liver chromatin* / A. Krayevsky, M. Kukhanova, L. Alexandrova et al.— *Biochim. et biophys. acta*, 1984, **783**, № 2, p. 216—220.
27. *Белякова Н. Б., Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. Механизм активирующего действия АТФ на репаративный синтез ДНК в хроматине.*— *Молекулярная биология*, 1980, **14**, № 3, с. 586—594.
28. *Miller M. R., Lui L. H. Participation of different DNA polymerases in mammalian DNA repair synthesis is not related to «patch size».*— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1982, **108**, N 4, p. 1676—1682.
29. *Крутяков В. М., Кравецкая Т. П. Экзогенный синтез ДНК в выделенном хроматине.*— *Молекулярная биология*, 1978, **12**, № 3, с. 654—662.
30. *Кочеткова С. В., Куханова М. К., Краевский А. А. Фосфорилирование 3'-дезоксипри-3'-аминотимидина и его включение в клетки миеломы мыши р38Ag653.*— *Биополимеры и клетка*, 1985, **1**, № 3, с. 131—134.

31. Ингибирование биосинтеза ДНК в эмбрионах морских ежей с помощью 2',3'-дидезокси-3'-аминонуклеозидов / М. К. Куханова, С. В. Кочеткова, А. А. Краевский и др.— Биохимия, 1983, 48, № 10, с. 1747—1751.

НИИ эксперим. кардиологии ВКНЦ АМН СССР,
Москва
Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва
Ин-т физиологии АН ГССР, Тбилиси

Получено 22.01.85

УДК 577.214.625+577.214.42

ТРАНСКРИПЦИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ДВУТЯЖЕВЫХ ПОЛИДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ С ПОВТОРЯЮЩИМИСЯ ФРАГМЕНТАМИ ПРОМОТОРОВ

О. Н. Королева, В. Л. Друца, З. А. Шабарова

В нашей лаборатории уже в течение нескольких лет ведутся всесторонние исследования свойств синтетических двутяжевых полидезоксирибонуклеотидов, содержащих 8÷12-звенные повторы. В рамках этих исследований нами были получены полинуклеотиды с регулярно повторяющимися элементами промоторов: «идеальной» последовательностью Прибноу (дуплекс I) и областью «-10»-го нуклеотида *trp*-промоторов (дуплекс II):



Ранее нами показано, что оба дуплекса способны образовывать устойчивые к гепарину долгоживущие комплексы с РНК-полимеразой *E. coli* (периоды полураспада 200 и 30 мин соответственно) [1]. В настоящем сообщении речь пойдет о результатах исследования транскрипционной активности *in vitro* и *in vivo* указанных синтетических полимеров.

Исследование транскрипции *in vitro* в присутствии высокой концентрации (0,1 мМ) рибонуклеозидтрифосфатов и избытка РНК-полимеразы *E. coli* показало, что полимер II является в 2,5 раза более эффективной матрицей, чем полимер I. При этом наблюдается воспроизводимая неравномерность распределения интенсивности полос транскриптов: для полимера I характерна периодичность, соответствующая 10 нуклеотидным звеньям, а для полимера II — 4 звеньям. Эти данные весьма трудно интерпретируемы, поскольку в условиях проведения реакции инициация транскрипции может происходить не только с определенных мест внутри ДНК-дуплексов (как это можно было ожидать, учитывая наличие фрагментов промоторов), но также с концов и нерепарированных разрывов [2]. Кроме того, при транскрипции матриц, содержащих элементы поворотной симметрии, может происходить преждевременная терминация транскрипции, чему способствует образование «шпилек» в синтезируемой РНК.

С целью исключить или по крайней мере резко понизить инициацию транскрипции с концов или одноцепочечных разрывов в полимерах I и II была проведена транскрипция в присутствии гепарина. При этом общее количество транскриптов после 15-минутной инкубации с ферментом снижалось для дуплекса I на 12 %, а для дуплекса II — на 30 % и обнаруживалась заметная периодичность (совпадающая с