

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Algirdas  
MIKALKĖNAS

# Modifikuoti nukleotidai nukleorūgščių biosintezėje: taikomieji aspektai

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biochemija (N 004)

---

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2014 – 2018 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute, Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje.

**Mokslinis vadovas:**

**prof. dr. Saulius Serva** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004)

# TURINYS

<b>SANTRUMPOS</b> .....	<b>5</b>
<b>ĮVADAS</b> .....	<b>6</b>
<b>1 LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Retrovirusai</b> .....	<b>9</b>
1.1.1 Atvirkštinės transkriptazės atradimas .....	9
1.1.2 Pelių leukemijos virusas ir žmogaus imunodeficito virusas.....	10
<b>1.2 DNR polimerazės. Retrovirusų atvirkštinės transkriptazės</b> .....	<b>10</b>
1.2.1 DNR polimerazių šeimos .....	10
1.2.2 Bendri DNR polimerazių veikimo principai .....	12
1.2.3 Klenow fragmentas.....	22
1.2.4 Atvirkštinės transkriptazės .....	27
1.2.5 Atvirkštinė transkripcija .....	33
1.2.6 Moloney MuLV AT struktūra .....	37
1.2.7 ŽIV-1 AT struktūra.....	40
<b>1.3 Modifikuoti nukleotidai ir nukleozidai</b> .....	<b>44</b>
1.3.1 Modifikuoti oligonukleotidai.....	44
1.3.2 Atvirkštinių transkriptazių slopikliai .....	47
1.3.3 Nukleozidais paremti atvirkštinių transkriptazių slopikliai.....	48
1.3.4 Kitaip veikiantys nukleozidiniai AT slopikliai.....	51
1.3.5 Pirofosfato analogai – fosfonoforminė ir fosfonoacto rūgštys .....	54
<b>2 MEŽIAGOS IR METODAI</b> .....	<b>57</b>
<b>2.1 Prietaisai, reagentai ir medžiagos</b> .....	<b>57</b>
<b>2.1.1 Naudoti prietaisai</b> .....	<b>57</b>
2.1.2 Reagentai .....	58
2.1.3 Buferiai, tirpalai ir terpės.....	58
2.1.4 Bakterijų kamienai.....	61
2.1.5 Plazmidės.....	61
2.1.6 DNR pradmenys ir matricos.....	61

<b>2.2 Tyrimo metodai .....</b>	<b>62</b>
2.2.1 Bakterijų cheminė transformacija.....	62
2.2.2 Plazmidinės DNR išskyrimas iš <i>E. coli</i> .....	63
2.2.3 Mažų plazmidinės DNR kiekių išskyrimas .....	63
2.2.4 Plazmidinės DNR ir DNR fragmentų elektroforetinis frakcionavimas agaroziniame gelyje.....	64
2.2.5 ŽIV-1 ir M.MuLV AT gryninimas iš <i>E. coli</i> .....	64
2.2.6 Baltymų elektroforetinis frakcionavimas .....	65
2.2.7 Baltymų akrilamidinio gelio dažymas .....	65
2.2.8 Baltymų kiekio nustatymas .....	65
2.2.9 Fosfato grupės su <sup>33</sup> P įvedimas į 5' DNR pradmenis .....	66
2.2.10 DNR substratų paruošimas .....	66
2.2.11 DNR pradmens prailginimo reakcijos .....	67
2.2.12 DNR fragmentų elektroforetinis frakcionavimas akrilamidiniame gelyje, denatūruojančiomis sąlygomis, vizualizacija ir analizė .....	67
2.2.13 Sustabdyto elektroforetinio judrumo poslinkio analizė .....	68
<b>3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1 DNR biosintezės slopinimo piridoniniais nukleozidais tyrimas .....</b>	<b>71</b>
<b>3.2 Piridoninių nukleotidų panaudojimo DNR biosintezei tyrimas .....</b>	<b>73</b>
<b>3.3 DNR biosintezės slopinimo nukleotidų konjugatais su fosfonoacto rūgštimi tyrimas.....</b>	<b>80</b>
<b>3.4 Aptarimas.....</b>	<b>91</b>
<b>IŠVADOS .....</b>	<b>94</b>
<b>PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS .....</b>	<b>95</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>96</b>
<b>PADEKA .....</b>	<b>129</b>
<b>UŽRAŠAMS.....</b>	<b>131</b>

## SANTRUMPOS

APS	amonio persulfatas
ASLV	paukščių sarkomos leukozės virusas (angliškai <i>avian sarcoma leucosis virus</i> )
AT	atvirkštinė transkriptazė
BLV	galvijų leukemijos virusas (angliškai <i>bovine leukemia virus</i> )
cPPT	centrinė polipurininė seka (angliškai <i>central polypurine tract</i> )
IN	integrazė
LTR	ilgas galinis pasikartojimas (angliškai <i>long terminal repeat</i> )
M.MuLV	Moloney pelių leukemijos virusas (angliškai <i>Moloney murine leukemia virus</i> )
MMTV	pelių krūties auglio virusas (angliškai <i>mouse mammary tumor virus</i> )
MuLV	pelių leukemijos virusas (angliškai <i>murine leukemia virus</i> )
NBS	nukleotidų prijungimo vieta (angliškai <i>nucleotide binding site</i> )
NC	nukleokapsidės baltymas (angliškai <i>nucleocapsid protein</i> )
NNRTI	nenukleozidinis AT slopiklis (angl. <i>non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i> )
NRTI	nukleozidinis AT slopiklis (angliškai <i>nucleoside reverse transcriptase inhibitor</i> )
PAA	fosfonoacto rūgštis (angliškai <i>phosphonoacetic acid</i> )
PBS	pradmenų jungimosi seka (angliškai <i>primer binding site</i> )
PFA	fosfonoforminė rūgštis (angliškai <i>phosphonoformic acid</i> )
PIC	preintegracijos kompleksas (angliškai <i>preintegration complex</i> )
PPT	polipurininė seka (angliškai <i>polypurine tract</i> )
PR	proteazė
RNazė H	ribonukleazė H
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletildiaminas
Vpr	viruso baltymas R (angliškai <i>viral protein R</i> )
XNR	Xseno nukleorūgštys (angliškai <i>Xeno nucleic acids</i> )
ŽIV-1	žmogaus imunodeficito virusas 1 tipo

## ĮVADAS

Natūralių genetinių sistemų paprastumas ir elegancija įkvepia mokslininkus nuo DNR dvigubos spiralės struktūros aptikimo (Watson ir Crick, 1953). DNR ir RNR yra universalus genetinis kodas, pagrįstas komplementarumo taisykle. Ši paprasta taisyklė yra pakankama saugoti ir perduoti visų Žemėje esančių rūšių genetinę informaciją. Be keturių kanoninių genetinės abėcėlės raidžių, genominiuose DNR buvo atrasti įvairūs nekanoniniai nukleotidai, kurie veikia kaip reguliavimo elementai ar natūralus gynybos mechanizmas (Warren, 1980; Carell et al., 2018). Daugelis pagrindinių biotechnologinių procesų priklauso nuo DNR polimerazių gebėjimo panaudoti chemiškai modifikuotus nukleotidus. Tai apima DNR ir RNR sekoskaitas (Goodwin et al., 2016; Fuller et al., 2016), sistemingą ligandų evoliuciją eksponentiniu praturtinimu (Sefah et al., 2013) ir DNR žymėjimą (Welter et al., 2016). Iš pirmo žvilgsnio stebina tai, kad DNR polimerazės, kurios natūraliai išsivystė, kad tinkamai atpažintų kanonines nukleobazes, sugeba panaudoti nukleotidus, turinčius netgi didelius pakeitimus (Welter et al., 2016; Hottin ir Marx, 2016).

Pirmieji modifikuoti nukleotidai sukurti prieš daugiau kaip 50 metų ir naudoti kaip antivėžiniai ar antivirusiniai preparatai, skirti įvairių polimerazių slopinimui (Jordheim et al., 2013). Tačiau nukleotidų modifikacijų tyrimai neapsiriboja vien polimerazių slopinimu, bet plečiasi į sintetinės biologijos, genetinio kodo praplėtimo tyrimų sritį (Eremeeva ir Herdewijn, 2018), epitranskriptomos tyrimus (Palumbo ir Beal, 2018) ir modifikuotų oligonukleotidų gamybą (Morihiro et al., 2017). Tiriant modifikuotų nukleotidų panaudojimą DNR biosintezei, galima geriau suprasti fundamentalias DNR struktūros savybes ir polimerazėms būdingus dėsningumus (Kropp et al., 2018).

Retrovirusai pasižymi unikalia virusinės reprodukcijos strategija, atvirkštinę transkriptazę naudojant DNR biosintezei iš virusinės RNR. 1981 m. atradus įgytą imunodeficito sindromą (Gottlieb et al., 1981) ir 1983 m. aptikus žmogaus imunodeficito virusą (Barré-Sinoussi et al., 1983), šis virusas vis dar išlieka rimta problema: 36,7 mln. žmonių užsikrėtę ŽIV, iš kurių kasmet 1,8 milijono miršta (UNAIDS, 2017). ŽIV-1 atvirkštinė transkriptazė yra svarbiausias antivirusinio gydymo taikinyss. Moloney pelių leukemijos viruso atvirkštinė transkriptazė atstovauja grupę monomerinių retrovirusų atvirkštinių transkriptazių. Šiai grupei priklauso pelių krūties auglio virusas, galvijų leukemijos virusas, kiaulių endogeninis retrovirusas ir retrotranspozonas Tf1 (Hizi ir Herschhorn, 2008). Šių retrovirusų

atvirkštinės transkriptazės pasižymi kitomis biocheminėmis savybėmis nei šeimininko replikacinės polimerazės. Sugebėjimas išnaudoti šių polimerazių savybes leistų kurti slopiklius, nukreiptus prieš virusines polimerazes, bet neturinčius didelės įtakos šeimininko polimerazėms. Tuo pačiu, šių polimerazių gebėjimas panaudoti kitokios struktūros nukleotidus leistų sintetinti įvairiomis savybėmis pasižyminčius nukleorūgščių polimerus.

Modifikuotų nukleotidų panaudojimas DNR biosintezei tapo sintetinės biologijos tyrimų objektu, siekiant praplėsti genetinį kodą ir sukurti dirbtinę, tačiau funkcionalią biologinę sistemą su platesnėmis pritaikymo galimybėmis. Šiame darbe nagrinėjama modifikuotų piridoninių nukleozidų ir nukleotidų panaudojimas DNR biosintezėje, taip pat fosfonoacto rūgšties nukleotidų konjugatai, sukurti taip, kad pasireikštų selektyvus slopinimas pasirinktoms DNR polimerazėms.

### **Darbų tikslas:**

1. Ištirti piridoninių nukleozidų ir su fosfonoacto rūgštimi konjuguotų nukleotidų panaudojimo DNR biosintezėje taikomuosius aspektus.

### **Uždaviniai:**

1. DNR polimerazių vykdomos DNR biosintezės slopinimo piridoniniais nukleozidais įvertinimas.
2. DNR polimerazių vykdomo piridoninių nukleotidų įjungimo į DNR efektyvumo ir specifškumo nustatymas.
3. Fosfonoacto rūgšties ir nukleotido konjugatų įjungimo į DNR tyrimas ir šių konjugatų slopinimo sąlygotos DNR biosintezės įvertinimas ir mechanizmo tyrimas.

### **Mokslinis naujumas**

Šioje disertacijoje nagrinėjamų modifikuotų nukleozidų ir nukleotidų įtaka DNR biosintezei anksčiau literatūroje neaprašyta. Darbe aprašomas naujų aciklinių ir ciklinių nukleozidų darinių, turinčių 2-piridono žiedą, sugebėjimas slopinti Klenow *exo*- DNR polimerazę ir M.MuLV atvirkštinę transkriptazę. Nustatytas potencialus M.MuLV atvirkštinės transkriptazės slopiklis, kurio slopinimas priklauso nuo katalizinių metalo jonų ir buferio prigimties. Buvo tirtas 2-piridoninių nukleotidų panaudojimas DNR biosintezei. Šie 2-piridoniniai nukleotidai pasižymėjo silpnesniu tikslumu matricos atžvilgiu ir prailginimo efektyvumu. Taip pat įvertintas su fosfonoacto rūgštimi konjuguotų nukleotidų sąlygotos Klenow *exo*- DNR

polimerazēs, ŽIV-1 ir M.MuLV atvirkštinių transkriptazių DNR polimerazinio aktyvumo slopinimas.

### **Praktinė reikšmė**

Darbo metu nustatėme potencialų M.MuLV atvirkštinės transkriptazės slopiklį, kurio veikimas pasireiškia esant tris-acetatinui buferiui su mangano jonais, bet nėra stebimas esant glutamatiniui buferiui su magnio jonais. Tai rodo galimą fermento struktūros pasikeitimą, kas leidžia slopikliui prisijungti prie fermento ir yra svarbu kuriant potencialius naujus slopiklius, kurių prisijungimo vieta fermente susidaro tik prisijungus slopikliui (Ding et al., 1995; Ren et al., 1995; Tantillo et al., 1994). Tirtų piridoninių nukleotidų savybių tyrimas padeda atskleisti nukleobazės pakaitų įtaką DNR biosintezės efektyvumui. Tai svarbu, DNR polimerazių pagalba gaminant aptamerus ir įvairiai modifikuotus oligonukleotidus. Tyrimui pasirinktos DNR polimerazės – Klenow *exo-* ir M.MuLV atvirkštinė transkriptazė – yra skirtingomis savybėmis ir pritaikymu pasižymintys fermentai. Klenow *exo-* sugebėjo halogenintus piridoninius nukleotidus įjungti efektyviau nei M.MuLV atvirkštinės transkriptazė. Šiame darbe įvertintas fosfonoacto rūgšties nukleotidų konjugatų panaudojimas DNR biosintezės slopinimui. Vienas iš tirtų konjugatų geba slopinti Klenow *exo-* DNR polimerazę ir ŽIV-1 atvirkštinę transkriptazę, pakeisdamas tretinio komplekso konformaciją. Konformaciniai pokyčiai lėtina DNR polimerazės, taigi tikslinga šių mažamolekulinių junginių konjugacija su nukleotidais gali tapti pagrindu tolesniam naujų antivirusinių vaistų kūrimui.

### **Ginamieji teiginiai:**

1. Piridoniniai nukleozidai gali slopinti M.MuLV AT ir Klenow *exo-* DNR polimerazės vykdomą DNR biosintezę.
2. DNR polimerazės gali įterpti į DNR piridoninius nukleotidus matricai specifiniu būdu. Piridoninių nukleotidų įjungimas turi nedidelį poveikį tolesniam pradmens prailginimui, naudojant natūralius nukleotidus.
3. M.MuLV AT, ŽIV-1 AT, Klenow *exo-* ir Taq DNR polimerazės skirtingu efektyvumu įjungia į DNR tirtus nukleotidų konjugatus. Šie junginiai gali slopinti polimerazių vykdomą DNR biosintezę.

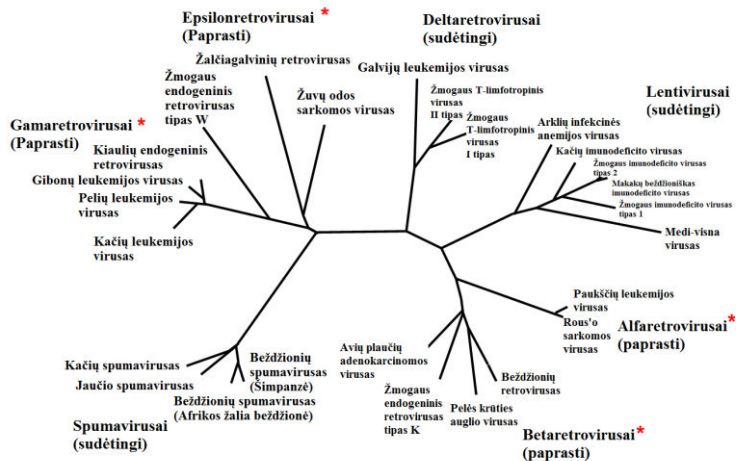


# 1 LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Retrovirusai.

### 1.1.1 Atvirkštinės transkriptazės atradimas

Atvirkštinės transkriptazės (AT) atradimas 1970 metais (Baltimore, 1970; Temin ir Mizutani, 1970) turėjo svarbų poveikį gyvosios gamtos mokslams. Nuo RNR priklausoma DNR polimerazė, aptinkama RNR navikų virusuose, tapo iššūkiu vyraujančiai molekulinės biologijos centrinei dogmai. Pagal šią dogmą, genetinė informacija iš DNR pereina į RNR ir vėliau į baltymus, tuo tarpu RNR virusų atveju – nuo RNR į DNR ir galiausiai į baltymus. Kadangi naujasis fermentas katalizuoja DNR polimerizaciją nuo RNR, kas tuo metu buvo laikoma atvirkščiu dogmos aprašomam procesui, šis fermentas pavadintas atvirkštine transkriptaze. Vėliau tyrimai parodė, kad AT iš tikrųjų turi tris aktyvumus: nuo RNR priklausomą DNR polimerazės aktyvumą, nuo DNR priklausomą DNR polimerazės aktyvumą ir ribonukleazės H (RNazė H) aktyvumą, kuris hidrolizuoja RNR RNR-DNR hibride. Nors AT būdingi keli skirtingi aktyvumai, buvo paliktas originalus fermento pavadinimas. Taigi, AT turintys virusai, kurie iš pradžių buvo vadinami RNR navikų virusais, pervadinti į retrovirusus (Coffin et al., 1997).



**1.1 pav. Retrovirusų taksonominis skirstymas.** Retrovirusų gentys, kurioms priklauso endogeniniai virusai, pažymėti raudona žvaigždute. Šiame filogenetiniame medyje išskirti labiausiai tiriama retrovirusai. Pagal Weiss, 2006.

Retrovirusus galima suskirstyti į keletą genčių pagal jų evoliucinį giminingumą (1.1 pav.). Visų retrovirusų grupės atstovų genomuose yra *gag*, *pol* ir *env* genai, o sudėtingesni retrovirusai, kaip lentivirusai ir deltaretrovirusai, turi papildomus genus, kurie iš dalies persidengia su kitais genais, o po alternatyvaus splaisingo nuo mRNR transliuojami maži reguliaciniai baltymai. Skirtingų grupių retrovirusų AT atlieka panašią funkciją, bet gali skirtis struktūra ir subvienetų kiekiu, molekuline mase, katalizinėmis savybėmis, biocheminėmis ir biofizinėmis charakteristikomis ir jautrumu įvairiems slopikliams (Coffin et al., 1997; Hizi ir Herschhorn, 2008).

### **1.1.2 Pelių leukemijos virusas ir žmogaus imunodeficito virusas**

Pelių leukemijos virusas (angliškai *Murine leukemia virus*, MuLV) yra tiriamas nuo 1951 metų, kai buvo parodyta, kad leukemija gali būti perduodama pelių naujagimiams patogenu, esančiu filtrate (Gross, 1951; Gross, 1957; Moloney, 1960). Šie virusai suteikė daug žinių apie leukemiją. Be to, MuLV genomus buvo naudojamas kaip pradinė medžiaga, skirta genų terapijos vektorių kūrimui. Galiausiai, MuLV buvo dažnai naudojamas kaip retrovirusų modelis.

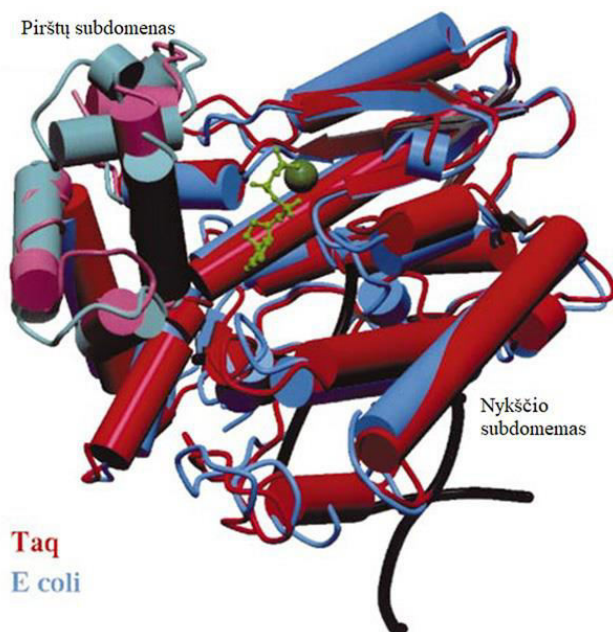
1981 m. atradus įgytą imunodeficito sindromą (Gottlieb et al., 1981) ir 1983 m. aptikus žmogaus imunodeficito virusą (ŽIV) (Barré-Sinoussi et al., 1983), šis virusas vis dar išlieka rimta problema: 36,7 mln. žmonių užsikrėtę ŽIV, iš kurių kasmet 1,8 milijono miršta (UNAIDS, 2017). ŽIV kilo iš daugelio zoonozinių perdavimų, kai beždžionių imunodeficito virusas Vakarų ir Centrinėje Afrikoje perduotas iš nežmoginių primatų žmonėms (Hahn et al., 2000). Gali būti, kad tai įvyko dėl primatų medžioklės ir skerdimo mėsai, o taip pat beždžionių gaudymo ir prekybos. Daugiau kaip 40 skirtingų nežmoginių primatų rūšių yra užsikrėtę beždžionių imunodeficito virusu, kiekviena rūšis turi unikalų virusą (VandeWoude ir Apetrei, 2006). Tikėtina, kad ateityje bus aptikta ir kitų ŽIV linijų, nes įmanomi nauji zoonozės pernešimai.

## **1.2 DNR polimerazės. Retrovirusų atvirkštinės transkriptazės**

### **1.2.1 DNR polimerazių šeimos**

Dauguma DNR polimerazių pagal aminorūgščių sekų homologiją sugrupuotos į atitinkamas A, B, C, D, X, Y ir atvirkštinės transkriptazės šeimas (Braithwaite ir Ito, 1993; Raper et al., 2018; Raia et al., 2019). A

šeimoms polimerazės aptinkamos prokariotuose, į šią šeimą įeina prokariotų DNR polimerazė I, mitochondrinė polimerazė  $\gamma$  ir kelios bakteriofagų polimerazės, tarp jų T3, T5 ir T7 bakteriofagų DNR polimerazės (Braithwaite ir Ito, 1993). B šeimos polimerazės aptinkamos bakteriofaguose, virusuose, archėjose ir eukariotuose. Dauguma B šeimos polimerazių atsakingos už genomo replikaciją, pavyzdžiui T4 ir T6 bakteriofagų, herpes viruso, archėjų Vent ir žinduolių pol  $\alpha$ ,  $\delta$  ir  $\epsilon$  polimerazės (Braithwaite ir Ito, 1993). C šeimai priklauso prokariotų replikatyvinės polimerazės polIII ir DnaE (Braithwaite ir Ito, 1993). D šeimai priklauso PolD, kuri yra heterodimerinė replikatyvinė DNR polimerazė, aptinkama archėjose, išskyrus *Crenarchaea* (Raia et al., 2019). Į X šeimą patenka žinduolių pol  $\beta$ ,  $\lambda$  ir  $\mu$ , kurios dalyvauja DNR pažaidų taisyme, ir terminalinė deoksiribonukleodil transferazė (Moon et al., 2007). Atvirkštinės transkriptazės šeima sudaryta iš retrovirusų atvirkštinių transkriptazių ir eukariotų telomerazių (Lingner et al., 1997). Y šeima apima pol  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ , Rev1 ir *Escherichia coli* DNR polimerazės IV (DinB) ir V (UmuCD) (Maxwell ir Suo, 2014).

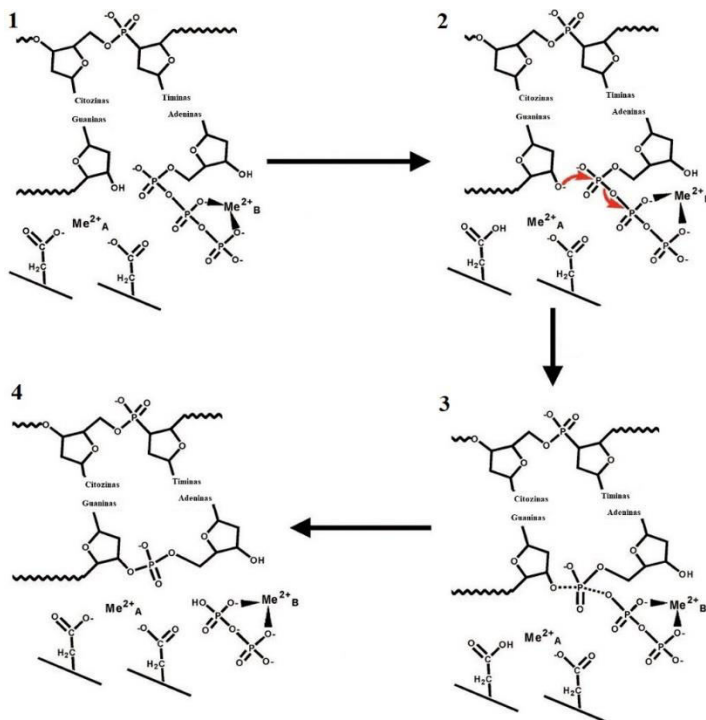


**1.2 pav. Taq Pol I (Li et al., 1998) ir E. coli Pol I (Klenow fragmentas; Beese et al., 1993) struktūrų perdengimas.** Taq Pol I (raudona) ir E. coli Pol I (mėlyna) struktūros persidengia taip, kad atitinkamos  $\alpha$  spiralės būtų juostos išsidėstę panašiai (nukrypimas iki 1 Å). Pirštų subdomeno konformacija (purpurinė ir žydra) šiek tiek skiriasi, kas rodo šio regiono lankstumą. Pagal Patel et al., 2001.

Kai kurių DNR polimerazių struktūra jau nustatyta. Visų šių DNR polimerazių struktūra primena žmogaus dešinę ranką, kurioje išskirti subdomenai: „pirštai“, atsakingi už nukleotidų prijungimą ir sąveiką su matrica, „delnas“, kuriame yra polimerazės aktyvus centras, ir „nykštys“, kuris prijungia dvigrandinę DNR. Mažai giminingos prokariotų polimerazės, kaip Taq Pol I ir E. Coli Pol I, pasižymi nedidele homologija, bet jų tretinė struktūra beveik identiška  $\alpha$  spiralių ir  $\beta$  juostų rajonuose (1.2 pav.) (Patel et al., 2001).

### 1.2.2 Bendri DNR polimerazių veikimo principai

Replikacijos proceso pagrindas yra DNR polimerazė – fermentas, kuris katalizuoja nukleotidų įjungimą į pradmenį, naudojant DNR matricą. DNR grandinės prailginimo cheminė reakcija yra fosforilo perkėlimo reakcija (Knowles, 1980), kurios metu nukleorūgšties pradmens grandinės 3'-OH nukleofiliškai atakuoja dNTP fosfatą. Reakcija vyksta dviem skirtingais etapais (1.3 pav.) ir yra katalizuojama dalyvaujant karboksilato grupėms, kurios aktyviajame DNR polimerazės centre koordinuoja du metalų (paprastai magnio) jonus. Šiame mechanizme aspartato šoninė grupė prie dNTP deoksiribozės yra bendroji bazė, kuri paima protoną iš 3'-OH grupės, kad būtų sukurtas reaktyvesnis nukleofilas (Steitz, 1993). Elektronų turtingas 3'-deguonis nukleofiliškai atakuoja  $\alpha$  fosfatą, sukuriant trigonalę-bipiramidinę pentakoordinuotą pereinamąją būseną, kuri stabilizuojama koordinuojant metalo jonus su  $\alpha$ ,  $\beta$  ir  $\gamma$  fosfatų grupių deguonimi (Steitz, 1993). Šis žingsnis sąlygoja fosfato stereocheminę konversiją ir pirofosfato grupės išleidimą, koordinuotą su kitu divalenčiu metalo jonu. Panašus dviejų žingsnių mechanizmas paremtas žmogaus DNR polimerazės  $\lambda$  prieš ir po katalizinių kompleksų struktūromis (Garcia-Diaz et al., 2007). Be to, *ab initio* skaičiavimai rodo, kad reikšmingas krūvio pernešimas vyksta reakcijos metu tarp abiejų metalų ir įvairių fermento aminorūgščių aktyviajame centre, siekiant efektyvaus fosforilo grupės pernešimo, reikia suderinto metalų jonų ir aktyvių aminorūgščių veikimo (Cisneros et al., 2008).

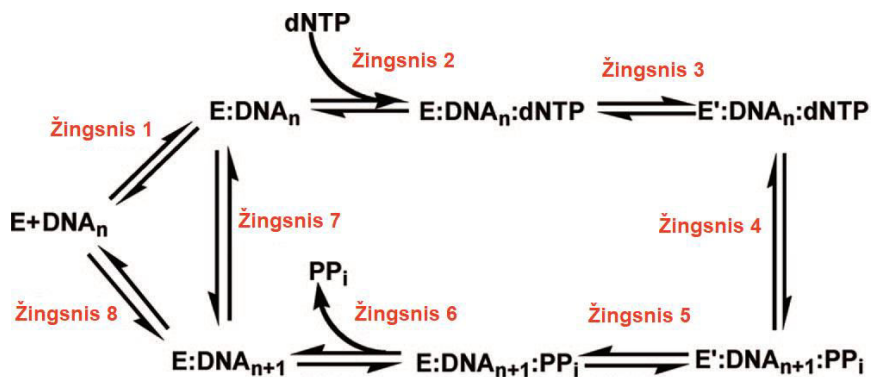


**1.3 pav. DNR polimerazės reakcijos mechanizmo schema.** 1) DNR polimerazės aktyviajame centre yra karboksilato grupės, kurios koordinuoja du divalenčius metalo (pažymėta A ir B) jonus, ir aktyvuoja pradmens ribozės 3' hidroksi grupę. 2) Pradmens ribozės 3'-deguonis nukleofiliskai atakuoja  $\alpha$  fosfatą (pažymėta raudonai). 3) Tai sukuria trigonale-bipiramidinę pentakoordinuotą pereinamąją būseną, kuri stabilizuojama koordinuojant metalo jonus su  $\alpha$ ,  $\beta$  ir  $\gamma$  fosfatų grupių deguonimis. 4) Tai sąlygoja fosfato stereocheminę konversiją ir pirofosfato grupės išleidimą. Pagal Berdis, 2009.

Tiriant dNTP analogų įjungimą, kuriuose  $\beta$  ir  $\gamma$  fosfatus jungiantis deguonis buvo pakeistas  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CHF}$ ,  $\text{CF}_2$  arba  $\text{CCl}_2$  grupėmis, galima įvertinti pereinamosios būsenos pobūdį fosforilo perdavimo reakcijos metu (Sucato et al., 2007). Kinetinė analizė parodo, kad visi analogai matricos atžvilgiu yra įjungiami tiek teisingai, tiek neteisingai (Sucato et al., 2007). Dar labiau svarbu tai, kad įjungimo greičio konstantos skiriasi priklausomai nuo modifikuotos grupės. Bronsted koreliacijos, nustatytos pagal įjungimo greičio konstantas, palygintos su nueinančios grupės  $\text{pK}_a$ , teisingai ir neteisingai sudarytoms bazių poroms, atskleidžia panašius jautrumus ir nukrypimus. Iš šių analizių matyti, kad fosforilo pernešimo greitis yra ribojantis teisingam ir neteisingam nukleotidų įjungimui polimerazės  $\beta$  atveju (Sucato et al., 2007). Nors mažai tikėtina, kad išvada yra universali visoms DNR polimerazėms, šie duomenys yra svarbūs, nes rodo, kaip

tinkamos pereinamosios būklės pasiekimas gali daryti įtaką polimerizacijos tikslumui.

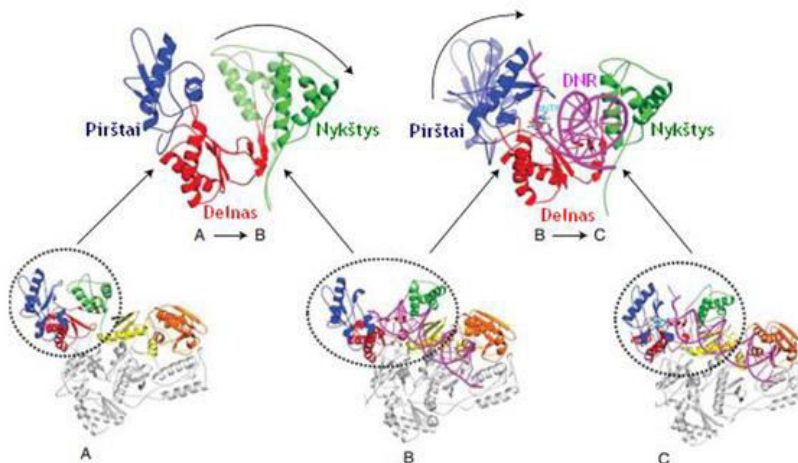
Teoriškai DNR ir dNTP substratų sujungimas su polimeraze gali būti atsitiktinis, nuoseklus arba griežta tvarkingas. Tačiau efektyvi polimerizacija būtų optimali griežtai prisijungus DNR substratą prieš dNTP, nes priešingas substrato pridėjimas (pradinis dNTP įjungimas prieš DNR) būtų teisingas tik vieną kartą iš keturių galimybių (Berdis, 2009). Didelio tikslumo polimerazės, dalyvaujančios chromosominės DNR sintezėje, turėtų pasižymėti tvarkingu DNR substrato surišimu prieš nukleotido surišimą. Tačiau skirtingas scenarijus gali būti naudojamas DNR polimerazėms, kurioms būdingos klaidos, ypačingai susijusios su pakartotine pažeista DNR. Šiuo atveju substrato surišimo tvarka tampa svarbi, nes į klaidas linkusios DNR polimerazės paprastai įjungia vieną nukleotidą be matricinės informacijos (Berdis, 2009).



**1.4 pav. DNR polimerazių kinetinis mechanizmas.** 1 žingsnis yra polimerazės (E) prisijungimas prie DNR substrato ( $DNA_n$ ). 2 žingsnis apima dNTP prisijungimą prie polimerazės/DNR komplekso. 3 žingsnis parodo konformacinį polimerazės ir DNR komplekso pokytį, po kurio seka fosforilo pernešimas – 4 žingsnis susidarant produktui  $DNA_{n+1}$ . Po nukleotido įjungimo į pradmenį, vyksta konformacinis pokytis  $E':DNA_{n+1}:PP_i$  į  $E:DNA_{n+1}:PP_i$  kompleksą – 5 žingsnis. Po šio žingsnio  $PP_i$  pašalinamas kaip pirmasis produktas – 6 žingsnis. Polimerazė gali likti su produkto DNR ( $DNA_{n+1}$ ) ir tęsti sintezę tame pačiame nukleorūgšties substrate (7 žingsnis) arba atsikirti nuo  $DNA_{n+1}$  ir atnaujinti polimerizaciją su kitu DNR substratu (8 žingsnis). Pagal Berdis, 2009.

DNR polimerazėms būdingas tvarkingas kinetinis mechanizmas, kuriame DNR polimerazė susiriša su DNR substratu prieš dNTP prijungimą (1.4 pav. žingsnis 1). Pirmasis žingsnis katalizinio efektyvumo generavimui ir tikslumo palaikymui įvyksta dNTP prijungiant prie polimerazės/DNR

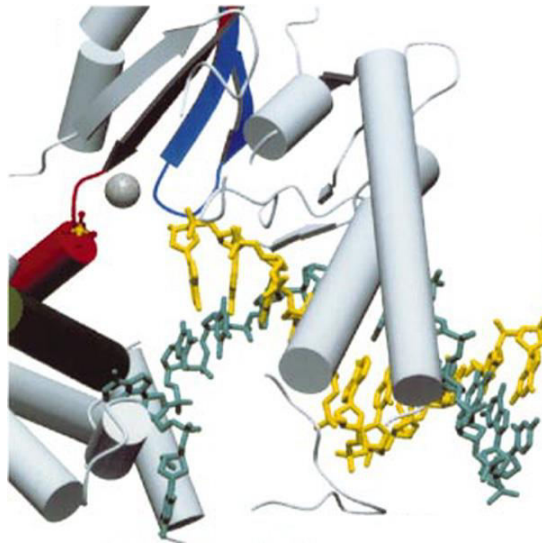
komplekso (1.4 pav. žingsnis 2) (Berdis, 2009). Po dNTP surišimo, siūlomas polimerazės ir nukleorūgšties konformacinis pokytis, siekiant suderinti gaunamą dNTP su tikslia geometrine konformacija, leidžiančia fosforilo perdavimą (1.4 pav. žingsnis 3). Konformacinis pokytis atitinka siūlomą indukuoto tilpimo mechanizmą, kuris įveda diskriminaciją dėl dNTP neteisingo įjungimo. Nesuderintos tarpinės medžiagos sutrikdo polimerazės aktyviosios vietos geometriją, trukdančią tolimesnei cheminei stadijai (Wong et al., 1991). Po to, kai nukleotidas kovalentiškai prijungimas prie augančio pradmens, polimerazė pereina iš  $E':DNA_{n+1}:PP_i$  į  $E:DNA_{n+1}:PP_i$  žingsnį (1.4 pav. žingsnis 5). Po šio žingsnio pirmasis produktas  $PP_i$  išskiriamas iš polimerazės, po kurio fermentas tariamai perkeliamas į kitą matricos padėtį (1.4 pav. žingsnis 6). Tuo metu polimerazė gali likti susijusi su produkto DNR sintezės pratęsimui arba atsiskirti nuo DNR, polimerizacija ant kito substrato atnaujinimui (Berdis, 2009) (1.4 pav. žingsnis 7 arba 8).



**1.5 pav. ŽIV-1 AT konformaciniai pokyčiai DNR polimerizacijos metu.**  
 A – AT neprisijungusi substratų, nyktys (žalia spalva) uždaroje konformacijoje. A→B – nyktys atsilenkia ir atveria nukleorūgšties prisijungimo dalį. B – AT prisijungusi dvigrandininę nukleorūgštį. B→C – dNTP patenka į polimerazės aktyvųjį centrą ir pirštai (mėlyna) keisdami konformaciją padeda tinkamai orientuoti dNTP, kad jis būtų įjungtas į grandinę. C – prisijungus abiem substratams susidaro trinaris AT, nukleorūgšties ir dNTP kompleksas. Pagal Hu ir Hughes, 2012.

Procesyvumas apibrėžiamas kaip nukleotidų, polimerazės įterptų per vieną jungimosi įvykį į DNR substratą, skaičių. Procesyvumo vertės yra nuo 1 visiškai distributyviems fermentams iki šimtų ar tūkstančių nukleotidų įjungimo labiau procesyvioms polimerazėms. Bakteriofagų T4 DNR

polimerazė (Mace ir Alberts, 1984) turi aukšto procesyvumo koeficientą (> 100), o T7 DNR polimerazės procesyvumas žymiai padidėja, sąveikaujant su tioredoksinu (Kelman et al., 1998). Eukariotinėms polimerazėms, tokioms kaip polimerazei  $\delta$ , kuri kopijuoja chromosomas, reikia įvairių papildomų baltymų (Sexton et al., 1998; Moldovan et al., 2007). Priešingai, polimerazės, susijusios su specializuotomis funkcijomis, tokiomis kaip DNR taisymas (bakterijų DNR pol I) (Eckert ir Kunkel, 1993) arba pažeidimo apėjimo funkcijomis (pol  $\eta$ , pol  $\iota$ , pol  $\zeta$ ) turi mažus procesyvumo koeficientus (Washington et al., 1999; Prakash ir Prakash, 2002; Haracska et al., 2005) – ne daugiau nei 10, taigi yra labiau distributyvios polimerazės.



**1.6 pav. A šeimos polimerazės *Bacillus stearothermophilus* polimerazės I su DNR substratu aktyvaus centro struktūra.** DNR substrato pradmuo geltonos spalvos, matrica žydros spalvos. Matricos bazė egzistuoja išsuktoje konformacijoje ir sąveikauja su motyvu (pavaizduota tamsiai žalios spalvos). Patel et al., 2001.

DNR polimerazės turi bendrą dešinės rankos struktūrą, kurioje skiriami piršto, delno ir nykščio subdomenai (Beard ir Wilson, 2003). Delno domenas – labiausiai konservatyvus struktūrinis bruožas, jis yra atsakingas už fosforilo perdavimo reakcijos katalizę. Delno domenas turi mažiausiai dvi karboksi aminorūgštis (aspartatą arba glutamatą), kurios koordinuoja du kataliziškai svarbius metalo jonus, dalyvaujančius fosforilo perkėlime. Pirštų domenas sąveikauja su ateinančiu dNTP, taip pat su matricos baze ir todėl atlieka svarbų vaidmenį išlaikant polimerazės tikslumą. Nykščio domenas atlieka dvigubą vaidmenį, paduodamas dgDNR į ateinančią dNTP, taip pat



užtikrina polimerazės procesiškumą ir translokaciją (Patel et al., 2001). Modeliai, koreliuojantys struktūrinius judesius su kinetiniais stebėjimais, rodo, kad dNTP prisijungia prie polimerazės/DNR komplekso nepriklausomai nuo matricos, pirmiausia sąveikaujant su pirštų sritimi. Po pirminio prisijungimo įvykio seka pirštų srities rotacija (1.5 pav.), sukelianti tvirtesnę susiejimą su matricos baze ir atspindinti konformacinio pakeitimo pakopą (Li et al., 1998). Ši sukimosi kryptis suteikia varomąją jėgą, reikalingą norint suderinti gaunamą dNTP su partneriu, taip pat nukreipti pradmenis 3'-hidroksilą, kad būtų nukleofiliskai atakuotas dNTP.

Panašios atviros ir uždaros konformacijos buvo pastebėtos DNR polimerazėse: pol  $\beta$  (Pelletier et al., 1994; Sawaya et al., 1997), B šeimos polimerazėse (Kamtekar et al., 2004; Yang et al., 2002; Rodriguez et al., 2000) ir ŽIV atvirkštinės transkriptazėje (Ding et al., 1998; Sarafianos et al., 2001; Hsiou et al., 1996; Rodgers et al., 1995). A šeimos polimerazių struktūrų ypatybė yra tai, kad atviroje konformacijoje matricos bazė egzistuoja išsuktoje konformacijoje, kas neleidžia tiesioginės fizinės sąveikos su surištu dNTP (1.6 pav.). *Bacillus stearotherophilus* polimerazės atveju - konservatyvus tirozino benzeno žiedas per  $\pi$ - $\pi$  stekingo sąveika pakeičia nukleobazę DNR matricoje. Ši sąveika blokuoja tiesioginį gaunamo nukleotido prieigą bet kuriai matricos bazei (Li et al., 1998; Kiefer et al., 1998). Nors matricos bazė iš pradžių yra išsuktoje formoje, DNR polimerizacija vis dar vyksta *B. stearotherophilus* polimerazės kristale (Kiefer et al., 1998), o tai rodo, kad ši neįprasta konformacija yra kataliziškai aktyvi. Perėjimas nuo atviros į uždarytą būseną apsiriboja piršto subdomeno judesiais su papildomais konformaciniais pokyčiais trejose pirštų padėtyse (Kiefer et al., 1998). Šie duomenys rodo, kad kristaluose gali atsirasti konformaciniai pokyčiai ir tai padeda matricos bazę į tinkamą padėtį, leidžiančią fosforilo perdavimą. Matricos bazės išsukimas nėra universalus. Eukariotinių pol  $\beta$  (Pelletier et al., 1994; Sawaya et al., 1997) ir ŽIV atvirkštinės transkriptazės (Ding et al., 1998; Sarafianos et al., 2001; Hsiou et al., 1996; Rodgers et al., 1995) kristalinės struktūros, kurių polimerazės yra mažiau tikslios nei A ir B šeimos polimerazės, nepasižymi dideliais DNR matricos iškraipymu. Be to, į klaidas linkusios DNR polimerazės Dpo4 struktūra rodo, kad DNR matrica nepatiria konformacinių pokyčių, kai ji patenka į aktyvų centrą (Wong et al., 2008). Šie pastebėjimai verčia spekuliuoti, kad matricos nukleobazės neišsukimas iš tikrųjų turi neigiamą įtaką tikslumui. Iš tikrųjų galima teigti, kad polimerazės, kurioms būdingas tiesioginis vandenilio ryšių sąveika tarp gaunamo dNTP ir matricos bazės, labiau linkusios pasižymėti mažesniu patikimumu, palyginus su

polimerazėmis, kurios išvengiama tiesioginių kontaktų per matricos DNR iškraipymą (Berdis, 2009).

Vienas iš pirmųjų tyrimų, naudojamų greitį ribojančiai stadijai įvertinimui, buvo sieros atomais pakeistų nukleotidų įjungimas (Mizrahi et al., 1985). Dėl mažo sieros atomo elektroneigamumo spėjama, kad sieros atomas bus mažiau efektyvus už deguonį stabilizuojant elektronų tankį fosforilo perdavimo pereinamosioms būsenos metu (1.3 pav. 3 dalis). Reakcija vyks, bet mažesniu greičiu. Tokiu būdu galima išmatuoti sieros efekto dydį, kuris yra santykis tarp natūralių ir modifikuotų nukleotidų įjungimo greičių, kas leistų vertinti, ar reakcija yra greitį ribojanti stadija. Jei reakcija yra greitį ribojanti stadija, bus pastebėtas didelis sieros efektas, didesnis nei 10. Priešingai, jei sieros efektas mažesnis nei 2, kitas kinetinis žingsnis, konformacinis pokytis prieš fosforilo perdavimą, yra greitį ribojanti stadija ir neįtakos šiam pakeitimo tipui. *E. coli* Klenow fragmento atveju sieros efektas neturi įtakos greičiui (Mizrahi et al., 1985). Maža šios modifikacijos įtaka leidžia manyti, kad cheminių ryšių formavimasis fosforilo perkėlimo stadijoje neriboja pirmojo nukleotido įjungimo. Tolesnis šio mechanizmo palaikymas yra gautas iš serijos spektroskopinių tyrimų, stebinčių dTTP įjungimą prieš 2-aminopuriną, esantį matricos grandinėje (Frey et al., 1995). 2-aminopurinas yra stipriai fluorescuojantis adenino struktūrinis analogas. 2-aminopurino fluorescencija stipriai sumažinama, susidarant vandeniliniams ryšiams ir stekingo sąveikai su baze (Rachofsky et al., 2001). Dėl to dNTP įjungimas priešais 2-aminopuriną gali būti lengvai stebimas, kintant fluorescencijos stiprumui, ir palyginus su greičiais, gaunant naudojant įprastinius radioaktyviai pažymėtą DNR. dTTP jungimosi kinetika prieš 2-aminopuriną iš pradžių buvo įvertinta naudojant modelines *E. coli* Klenow fragmento ir bakteriofagų T4 DNR polimerazes (Frey et al., 1995). Tyrimai su Klenow fragmentu parodė panašias greičio konstantas dTTP jungimui prieš 2-aminopuriną, naudojant arba greito gesinimo metodus, arba sustabdyto srauto fluorescencijos metodus (Frey et al., 1995). Greičio konstantų panašumas rodo, kad 2-aminopurino įjungimas yra susijęs su konformacijos pasikeitimo etapu, kuris yra prieš fosforilo perdavimą. Panašūs rezultatai gauti naudojant bakteriofagų T4 DNR polimerazę (Frey et al., 1995). Duomenys rodo, kad nukleotidų jungimo greičio konstanta atspindi greitį ribojančią stadiją – E:DNA:dNTP komplekso pasikeitimą į E':DNA:dNTP, kuris konformaciškai labiau palankus reakcijos katalizei. Pažymėtina, kad nėra aišku, ar konformacinių pokyčių žingsnis prieš fosforilo perkėlimą yra ribojantis etapas visoms DNR polimerazėms. Vis dėlto sieros efekto dydis nėra patikimas, siekiant vienareikšmiškai įvertinti nukleotidų įjungimo greitį ribojantį žingsnį (Herschlag et al., 1991;

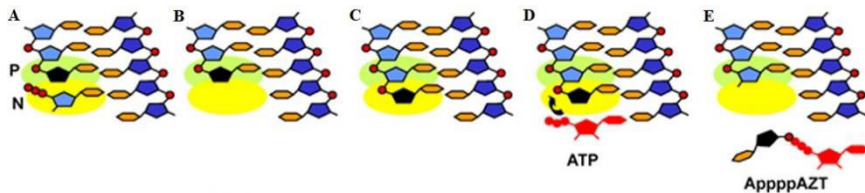
Showalter ir Tsai, 2002). Sieros efektas yra nepatikimas, nes fermento katalizuojama fosforilo pernešimo reakcija gali būti neidentiška nekatalizuojamai reakcijai (Showalter ir Tsai, 2002). Be to, teigiama, kad nekatalizuota fosforilo pernešimo reakcija vyksta achiralinėje aplinkoje, kurioje visos deguonys fosfato grupėje indukciškai prisideda pereinamosios būsenos stabilizavimo (Showalter ir Tsai, 2002). Tokia pati išvada yra mažai tikėtina dėl fermento katalizuojamos reakcijos, nes vyksta metalo jonų koordinavimas išskirtinai su vienu deguonimi ir tai sukeltų mažesnę sieros efektą fermento katalizuojamai reakcijai (Herschlag et al., 1991; Showalter ir Tsai, 2002). Papildomi argumentai pagrįsti spektroskopiniais tyrimais, kuriuose stebimas pol  $\beta$  nukleotidų įjungimas. Teisingų nukleotidų įjungimo fluorescencijos tyrimai parodė du fluorescencijos perėjimus, įvykusius prieš cheminę pakopą ir po jos (Arndt et al., 2001). Bronsted koreliacijos rodo, kad fosforilo perkėlimas yra greitį ribojantis žingsnis (Sucato et al., 2007). Kartu galima teigti, kad pol  $\beta$  atveju nukleotidų įjungimo greitį ribojantis žingsnis yra fosforilo perdavimas, o ne konformacinio pokyčio žingsnis (Berdis, 2009). Tačiau ši informacija rodo, kad tą pačią cheminę reakciją katalizuojančios polimerazės naudoja skirtingas strategijas, kad būtų pasiektas greičio padidėjimas ir tikslumas nukleotidų įjungimo metu.

Po fosforilo perkėlimo seka konformacinių pokyčių žingsnis, kuris yra prieš pirmojo produkto, pirofosfato ( $PP_i$ ), paleidimą. Po šio etapo polimerazė pereina į kitą matricos padėtį, kur ji gali išlikti prisijungusi ir toliau polimerizuoti DNR arba disocijuoti nuo DNR, kad būtų atnaujinta sintezė kitame DNR substrate. Išvalgos apie translokacijos proceso dinamiką kilo iš *B. stearothermophilus* DNR polimerazės struktūrinių tyrimų (Kiefer et al., 1998; Johnson et al., 2003). Šie tyrimai parodė, kad po nukleotidų įjungimo polimerazė iš karto pajuda dgDNR. Be to, tai atskleidžia, kaip visos keturios Watson'o – Crick'o bazių poros egzistuoja aktyviajame polimerazės centre. Polimerazės judėjimui reikalinga konservatyvi mažojo griovio vandenilio ryšio akceptorių geometrija. Pasiūlyti du modeliai: polimerazės judėjimas yra susijęs su energija, gauta iš  $PP_i$  išleidimo (Yin ir Steitz, 2004) arba polimerazė būna keliose skirtingose pusiausvyros būsenose ir dNTP prisijungimas skatina DNR polimerazės pereiti DNR grandine (Guajardo ir Sousa, 1997; Götte, 2006).

Pirofosforolizė yra priešinga nukleotidų įjungimo reakcijai. Šis fermentinis aktyvumas buvo plačiai ištirtas, nes pirofosforolizė vaidina svarbų vaidmenį atsparumo susidarymui tam tikriems antivirusiniams vaistams, kurie naudojami gydant įgytą imuninio nepakankamumo sindromą, kurį sukelia ŽIV (Boyer et al., 2001). Įvykus pirofosforolizei, viruso atvirkštinė transkriptazė pašalina grandinę terminuojančius nukleotidų

analogus, kurie yra skirti slopinti virusinę DNR sintezę (1.7 pav.). Tai leidžia atnaujinti viruso DNR sintezę. ŽIV AT atveju reikia kelių mutacijų polimerazės aktyviajame centre, kad būtų pasiektas reikšmingas aktyvumas, reikalingas atsparumui vaistui (Naeger et al., 2001). Šiame mechanizme pradmens 3' galas gali būti arba pradmens, arba nukleotidų surišimo vietoje (1.7 pav. B ir C). DNR sintezės metu AT suriša 3' galą pradmens vietoje tuo tarpu, kai nukleotidų surišimo vietoje būna dNTP. Perkėlus fosforilą, prailgintas pradmuo perkeliamas iš nukleotidų surišimo vietos į pradmens vietą, kad būtų galima tęsti katalizinį ciklą. Tačiau ciklas sustabdomas, kai įjungiamas modifikuotas nukleotidas (Naeger et al., 2001) (1.7 pav. A). Nesant 3'-OH, pradmens augimas negali vykti. Kito teisingo dNTP prisijungimas prie nukleotidų surišimo vietos sudaro neveiksnių trijų komponentų kompleksą. Virusinė polimerazė gali perkelti tokį pradmenį iš pradmens vietos atgal į nukleotidų surišimo vietą. Tai skatina PPi arba ATP surišimą ir leidžia vykti pirofosforolizei (1.7 D ir E). Po to grandinės terminatorius pašalinamas, susidarant dNTP ir laisvam 3'-OH, taip leidžiama tolimesnė DNR biosintezė. *E. coli* Klenow fragmento ir bakteriofagų T4 DNR polimerazės pirofosforolitinio aktyvumo tyrimai pateikė išsamesnę informaciją apie konformacinius pokyčius, kurie seka po fosforilo perkėlimo žingsnio. Kiekvienos polimerazės pirofosforolizės kinetiniai parametrai buvo kiekybiškai įvertinti, matuojant dNTP susidarymo priklausomybę nuo PPi koncentracijos. Klenow fragmento PPi  $K_d$  yra 230  $\mu\text{M}$  (Dahlberg ir Benkovic, 1991), o T4 polimerazės yra nuo 10 mM iki 20 mM (Wu et al., 1998). Nepaisant didelio giminingumo PPi skirtumo, pirofosforolizės greičio konstanta yra panašios: Klenow fragmento  $0,3 \text{ s}^{-1}$  ir T4 DNR polimerazės  $0,5 \text{ s}^{-1}$  (Dahlberg ir Benkovic, 1991; Wu et al., 1998). Abejais atvejais pirofosforolizės greičio konstantos yra daug lėtesnės nei  $k_{\text{pol}}$  vertės, išmatuotos polimerizacijos reakcijai. Tai rodo, kad cheminės reakcijos pusiausvyra nukreipta link polimerizacijos.  $E':\text{DNA}_{n+1}:\text{PP}_i$  komplekso skilimas susidarant  $\text{DNA}_{n+1}$  ir  $\text{PP}_i$  gali vykti per du tarpusavyje nesusijusius kelius. Pirmasis susijęs su  $\text{PP}_i$  atpalaidavimu iš  $E':\text{DNA}_{n+1}:\text{PP}_i$ , po kurio vyksta konformaciniai pokyčiai, kurie pakeičia  $E':\text{DNA}_{n+1}$  kompleksą į  $E:\text{DNA}_{n+1}$  kompleksą. Antrasis kelias apima PPi išleidimą po  $E':\text{DNA}_{n+1}:\text{PP}_i$  komplekso perėjimo į  $E:\text{DNA}_{n+1}:\text{PP}_i$ . Šių dviejų mechanizmų diferencijavimas buvo pasiektas, lyginant pirofosforolizės greitį su pirofosfato mainais (Dahlberg ir Benkovic, 1991). Pirofosfato mainai matuoti žymėto  $^{32}\text{P}$ -dNTP atsiradimo, į nežymėto dNTP kiekį pridedant  $[^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ . Su *E. coli* Klenow fragmentu buvo išmatuoti panašūs greičiai pirofosforolizėje ir pirofosfato mainuose, teigiant, kad antras konformacinis pokytis iš  $E':\text{DNA}_{n+1}:\text{PP}_i$  į  $E:\text{DNA}_{n+1}:\text{PP}_i$  yra prieš PPi išleidimą. Jei

pirofosfato mainai būtų greitesni už pirofosforolizę, tada  $PP_i$  mainai su  $E':DNA_{n+1}$  kompleksu būtų apėję lėtą konformacinės žingsnį  $E:DNA_{n+1}:PP_i$  iki  $E'DNA_{n+1}:PP_i$  (Berdis, 2009).



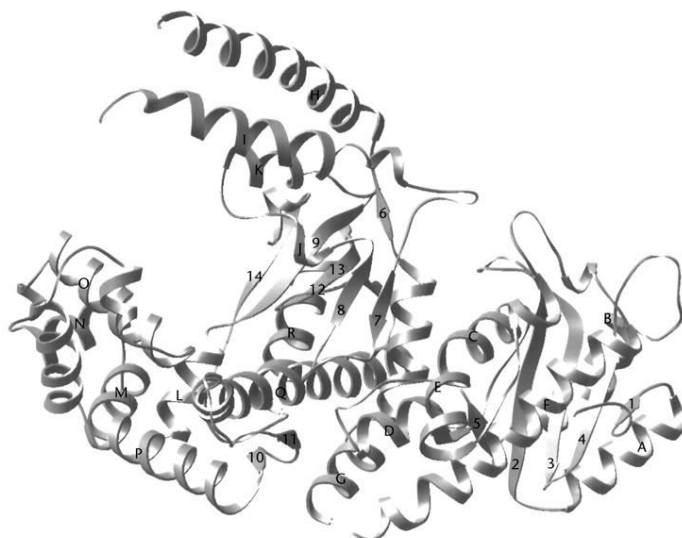
**1.7 pav. ŽIV atvirkštinės transkriptazės grandinę terminuojančius nukleotidų analogų pašalinimas iš DNR substrato schema.** Pradmens (P) ir nukleotidų (N) surišimo vietos pažymėtos žalia ir geltona spalva, pradmens ribozės žydrai, matricos mėlynai, įjungtas AZT nukleotidas juoda spalva. Įjungus AZT, tolimesnio nukleotido įjungimas neįmanomas. A) Įjungus AZT kito nukleotido įjungimas nevyksta. B) pradmens 3' galas yra pradmens surišimo vietoje ir C) pradmens 3' galas yra nukleotidų surišimo vietoje. D) ATP prisijungimas ir pirofosforolizė. E) AZT pašalinimas kaip AppppAZT junginys. Pagal Menendez-Arias, 2008.

Pirofosforolizė yra priešinga nukleotidų įjungimo reakcijai. Šis fermentinis aktyvumas buvo plačiai ištirtas, nes pirofosforolizė vaidina svarbų vaidmenį atsparumo susidarymui tam tikriems antivirusiniams vaistams, kurie naudojami gydant įgytą imuninio nepakankamumo sindromą, kurį sukelia ŽIV (Boyer et al., 2001). Įvykus pirofosforolizei, viruso atvirkštinė transkriptazė pašalina grandinę terminuojančius nukleotidų analogus, kurie yra skirti slopinti virusinę DNR sintezę (1.7 pav.). Tai leidžia atnaujinti viruso DNR sintezę. ŽIV AT atveju reikia kelių mutacijų polimerazės aktyviajame centre, kad būtų pasiektas reikšmingas aktyvumas, reikalingas atsparumui vaistui (Naeger et al., 2001). Šiame mechanizme pradmens 3' galas gali būti arba pradmens, arba nukleotidų surišimo vietoje (1.7 pav. B ir C). DNR sintezės metu AT suriša 3' galą pradmens vietoje tuo tarpu, kai nukleotidų surišimo vietoje būna dNTP. Perkėlus fosforilą, prailgintas pradmuo perkeliamas iš nukleotidų surišimo vietos į pradmens vietą, kad būtų galima tęsti katalizinį ciklą. Tačiau ciklas sustabdomas, kai įjungiamas modifikuotas nukleotidas (Naeger et al., 2001) (1.7 pav. A). Nesant 3'-OH, pradmens augimas negali vykti. Kito teisingo dNTP prisijungimas prie nukleotidų surišimo vietos sudaro neveiksnių trijų komponentų kompleksą. Virusinė polimerazė gali perkelti tokį pradmenį iš pradmens vietos atgal į nukleotidų surišimo vietą. Tai skatina  $PP_i$  arba ATP surišimą ir leidžia vykti pirofosforolizei (1.7 D ir E). Po to grandinės terminatorius pašalinamas, susidarant dNTP ir laisvam 3'-OH, taip leidžiama tolimesnė DNR biosintezė. *E. coli* Klenow fragmento ir bakteriofagų T4

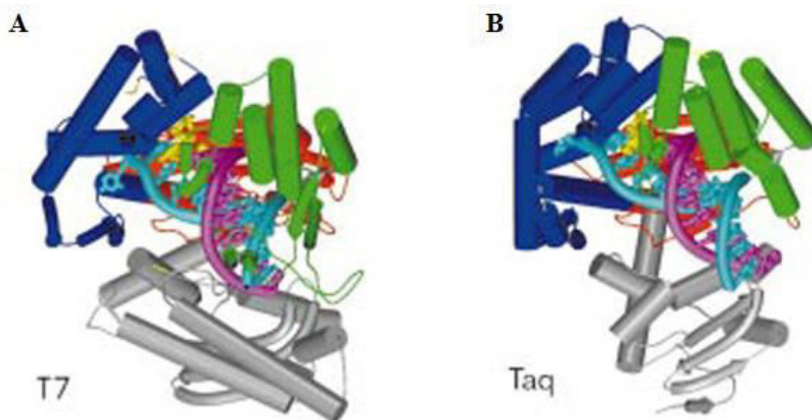
DNR polimerazės pirofosforolitinio aktyvumo tyrimai pateikė išsamesnę informaciją apie konformacinius pokyčius, kurie seka po fosforilo perkėlimo žingsnio. Kiekvienos polimerazės pirofosforolizės kinetiniai parametrai buvo kiekybiškai įvertinti, matuojant dNTP susidarymo priklausomybę nuo  $PP_i$  koncentracijos. Klenow fragmento  $PP_i$   $K_d$  yra 230  $\mu\text{M}$  (Dahlberg ir Benkovic, 1991), o T4 polimerazės yra nuo 10 mM iki 20 mM (Wu et al., 1998). Nepaisant didelio giminingumo  $PP_i$  skirtumo, pirofosforolizės greičio konstanta yra panašios: Klenow fragmento  $0,3 \text{ s}^{-1}$  ir T4 DNR polimerazės  $0,5 \text{ s}^{-1}$  (Dahlberg ir Benkovic, 1991; Wu et al., 1998). Abejais atvejais pirofosforolizės greičio konstantos yra daug lėtesnės nei  $k_{\text{pol}}$  vertės, išmatuotos polimerizacijos reakcijai. Tai rodo, kad cheminės reakcijos pusiausvyra nukreipta link polimerizacijos.  $E':\text{DNA}_{n+1}:PP_i$  komplekso skilimas susidarant  $\text{DNA}_{n+1}$  ir  $PP_i$  gali vykti per du tarpusavyje nesusijusius kelius. Pirmasis susijęs su  $PP_i$  atpalaidavimu iš  $E':\text{DNA}_{n+1}:PP_i$ , po kurio vyksta konformaciniai pokyčiai, kurie pakeičia  $E':\text{DNA}_{n+1}$  kompleksą į  $E:\text{DNA}_{n+1}$  kompleksą. Antrasis kelias apima  $PP_i$  išleidimą po  $E':\text{DNA}_{n+1}:PP_i$  komplekso perėjimo į  $E:\text{DNA}_{n+1}:PP_i$ . Šių dviejų mechanizmų diferencijavimas buvo pasiektas, lyginant pirofosforolizės greitį su pirofosfato mainais (Dahlberg ir Benkovic, 1991). Pirofosfato mainai matuoti žymėto  $^{32}\text{P}$ -dNTP atsiradimo, į nežymėto dNTP kiekį pridedant [ $^{32}\text{P}$ ]PPi. Su *E. coli* Klenow fragmentu buvo išmatuoti panašūs greičiai pirofosforolizėje ir pirofosfato mainuose, teigiant, kad antras konformacinis pokytis iš  $E':\text{DNA}_{n+1}:PP_i$  į  $E:\text{DNA}_{n+1}:PP_i$  yra prieš  $PP_i$  išleidimą. Jei pirofosfato mainai būtų greitesni už pirofosforolizę, tada  $PP_i$  mainai su  $E':\text{DNA}_{n+1}$  kompleksu būtų apėję lėtą konformacinės žingsnį  $E:\text{DNA}_{n+1}:PP_i$  iki  $E:\text{DNA}_{n+1}:PP_i$  (Berdis, 2009).

### 1.2.3 Klenow fragmentas

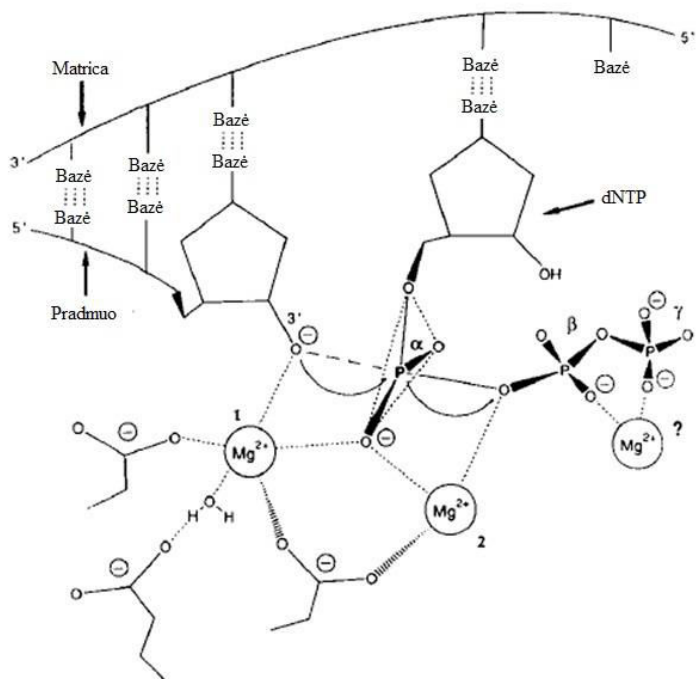
*E. coli* pol I buvo pirmoji atrasta DNR polimerazė (Lehman et al., 1958). *E. coli* pol I yra monomerinis baltymas, turintis 928 aminorūgštis ir yra 103 kDa molekulinės masės. *E. coli* pol I turi atskiras funkcijas: DNR polimerazės aktyvumą, kuris yra atsakingas už šio fermento 5'–3' DNR biosintezę; 3'–5' egzonukleazės aktyvumą, kuris pašalina neteisingai įjungtą nukleotidą nuo pradmens galo ir padidina tikslumą; 5'–3' egzonukleazės aktyvumas, kuris degradouoja DNR 5' galą iki mono ar oligo nukleotidų; 5'–3' nuo RNR priklausomas DNR polimerazinis aktyvumas, kuris yra žymiai mažesnio efektyvumo nei su DNR ir ši veikla tikriausiai turi tik ribotą biologinę reikšmę (Ricchetti ir Buc, 1993).



**1.8 pav. *E. coli* DNR polimerazės I Klenow fragmento struktūra.**  $\alpha$  spiralės pažymėtos raidėmis nuo A iki R, o  $\beta$  juostos pažymėtos skaičiais nuo 1 iki 14. Polimerazės domenai atskirti kilpa, kuri yra tarp  $\alpha$  spiralių F ir G. Pagal Li ir Waksman, 2001.



**1.9 pav. DNR polimerazių trinarių kompleksų struktūros.** A) T7 DNR polimerazė, B) Taq DNR polimerazė. DNR substratai parodyti rausva ir melsva spalva, dNTP – geltonai. Pirštų subdomenas rodomas tamsiai mėlynos spalvos, nykščio – žalios spalvos, delno – raudonos spalvos. Pagal Doublie et al., 1999.



**1.10 pav. DNR polimerazės reakcijos mechanizmo pereinamosios būsenos schema.** DNR polimerazės aktyviajame centre yra karboksilato grupės (D705, D882 ir E883), kurios koordinuoja du magnio jonus, ir aktyvuoja pradmens ribozės 3' hidroksi grupę. Pradmens ribozės 3'-deguonis nukleofiliskai atakuoja  $\alpha$  fosfatą, sukuriant trigonalę-bipiramidinę pentakoordinuotą pereinamąją būseną, kuri stabilizuojama koordinuojant metalo jonus su  $\alpha$ ,  $\beta$  ir  $\gamma$  fosfatų grupių deguonimi. Pagal Steitz, 1993.

Trumpai veikiant pol I su proteaze, išskiriami du aktyvus komponentai (Klenow ir Henningsen, 1970): didelis C galo fragmentas, kurio dydis 600 aminorūgščių, žinomas kaip Klenow fragmentas, apima polimerazės aktyvumą ir 3'–5' egzonukleazės aktyvumą, ir mažas N galo fragmentas, kuris yra 300 aminorūgščių dydžio, pasižymi tik 5'–3' egzonukleazės aktyvumu. *E. coli* pol I Klenow fragmento kompleksas su deoksitimidino monofosfatu buvo pirmoji DNR polimerazės išspręsta struktūra su 3,3 Å skiriamąja geba (Ollis et al., 1985). Ši struktūra (1.8 pav.) rodo, kad fermentas turi du atskirus domenų. Mažesnis domenų, kurį sudaro apie 200 N galo aminorūgščių, susideda iš centre esančio lygiagrečių  $\beta$  klosčių, kurios apsuptos  $\alpha$  spiralėmis. Didesnis domenų, kuris yra apie 400 C galo aminorūgščių dydžio, sudarytas daugiausia iš  $\alpha$  spiralių. Ši sritis turi formą, kuri primena dešinę ranką, su dideliu tarpu tarp nykščio, delno ir pirštų. Atliekant mutagenezės tyrimus, nustatytos atskirų didelių ir mažų

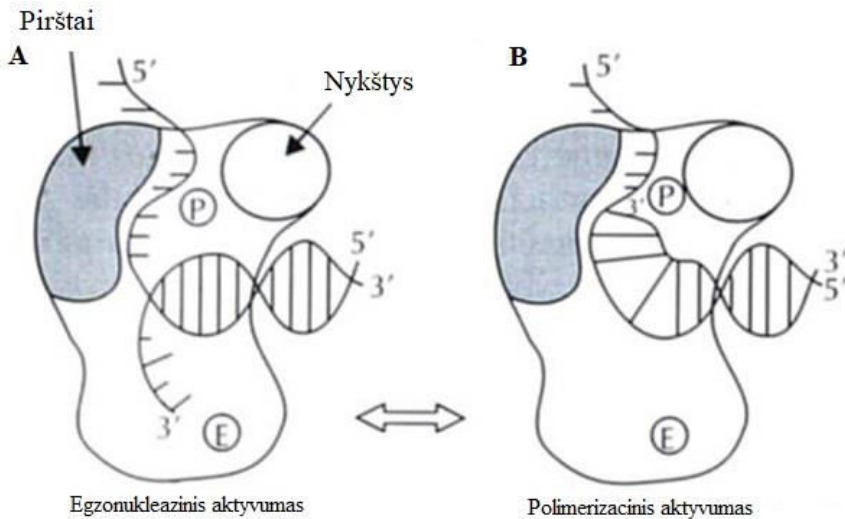


domenų funkcijos: 3′–5′ egzonukleazės aktyvusis centras yra mažame domene, o polimerazės aktyvusis centras yra dideliame domene. Remiantis struktūrinės analizės (Ollis et al., 1985) ir mutagenezės (Freemont et al., 1986; Polesky et al., 1990; Polesky et al., 1992) duomenimis, atstumas tarp polimerazės ir 3′–5′ egzonukleazės aktyviųjų centrų yra apie 30 – 35 Å. Biocheminiai ir struktūriniai tyrimai rodo, kad 3′–5′ egzonukleazės domenai turi labai panašią struktūrą ir veikia panašiai kaip eukariotinė endonukleazė FEN-1 ir nukleotidų pašalinimo fermentai, tokie kaip XP-G ir RAD2 (Lieber, 1997). Pol I fermentai taip pat katalizuoja pirofosforolizę, kuri yra atvirkštinė polimerizacijos reakcijai. Pirofosforolizė *in vivo* gali vykti, nes Klenow'o fragmento  $PP_i$   $K_d$  yra 230  $\mu$ M (Dahlberg ir Benkovic, 1991), o pirofosfato koncentracija gali būti apie 0,5 mM (Kukko ir Heinonen, 1982). Eksperimentai parodė, kad pirofosforolizė efektyviausiai vyksta su komplementariai įjungtais nukleotidais (Mizrahi et al., 1986).

Struktūriniai tyrimai parodė, kad *E. coli* ir *Bacillus stearothermophilus* pol I, T7 DNR polimerazės (1.9 pav. A), taip pat visa *Thermus aquaticus* polimerazė (1.9 pav. B) ir jos Klenow fragmento variantas yra struktūriškai panašūs (Patel et al., 2001; Doublet et al., 1999). Šios polimerazės prijungia dgDNR panašiai: prie polimerazės delno srities su 3′ galu, netoli polimerazės aktyvaus centro. Nykščio domenai užfiksuoja ir apgaubia dgDNR, ir tai gali prisidėti prie pol I fermento procesyvumo. DNR ir baltymo sąveika yra nepriklausoma nuo sekos ir sąveika daugiausia vyksta su fosfato karkasu. DNR yra daugiausia B formos su išlinkimu viengrandinės 5′ gale. Maždaug dvi bazių poros netoli aktyvaus centro yra dalinai išsuktos iš spiralės, pati DNR spiralė primena A formos DNR. 3′ gale esanti pirma bazių pora per mažojo griovio purino N3 ir pirimidino O2 sudaro vandenilinius ryšius su dvejomis labai konservatyviomis aminorūgštimis R668 ir Q849 (Li ir Waksman, 2001). Kadangi GC ir AT bazių porose tik N3 ir O2 grupės pateikia tokius pačius dvigubus simetriškus vandenilinio ryšio donoro akceptorius modelius, mažojo griovio atpažinimas užtikrina nuo sekos nepriklausomą teisingų bazių porų atpažinimą (Thompson et al., 2002).

Klenow fragmento polimerazės aktyviajame centre yra trys konservatyvios aminorūgštys: D705, D882 ir E883 (1.10 pav.). Mutagenezės tyrimai parodė, kad E710 irgi svarbi katalizei arba aktyvaus centro struktūros palaikymui (Gangurde et al., 2000). Remiantis keturgubu T7 polimerazės kompleksu su dgDNR, kartu su dideoksiribonukleozido 5' trifosfatu ir jos procesinio veiksnio, tioredoksino, ir trigubu Taq polimerazės Klenow tipo fragmento su dgDNR ir dideoksiribonukleozido 5' trifosfatu kompleksu (Doublet et al., 1999), nustatytas didelis konformacinis pirštų srities pokytis.

Konformacinis pokytis apima  $46^\circ$  pirštų srities galo pasukimą į vidų, dėl to dalinai uždaromas plyšys tarp pirštų ir nykščio subdomenų. Ši uždara konformacija orientuoja įmobilizuotos DNR  $3'$  OH ir įeinantį dNTP taip, kad prasidėtų polimerizacijos reakcija. Uždaroje fermento formoje aplink gaunamą nukleotidų bazių porą susidaro siaura kišenė, kurioje telpa tik tinkama bazių pora. Uždarose kompleksinėse struktūrose polimerazės aktyviajame centre yra du divalentiniai metalų jonai (Doublet et al., 1999). Metalų padėtis ir sąveika su aktyvaus centro aminorūgščių šoninėmis grupėmis ir substratais atitinka siūlomą dviejų metalų jonų mechanizmą polimerazės katalizei (1.3 pav.) (Steitz, 1993).



**1.11 pav. Klenow fragmento (A) egzonukleazinio ir (B) polimerizacijos aktyvumo schema.** Klenow fragmentas su dgDNR, turinčia  $3'$  lipnų galą. Klenow struktūroje  $3'$ – $5'$  egzonukleazės aktyvus centras (E) yra apie  $30 \text{ \AA}$  nuo polimerazės aktyvaus centro (P). Mažiausiai 8 ar 9 bazių poros turi būti išlydytos tam, kad netinkamas pradmens  $3'$  galas patektų iš polimerazės centro į egzonukleazės centrą. Pagal Steitz, 1993.

*E. coli* Klenow fragmento kristalinė struktūra su dgDNR, turinčia  $3'$  lipnų galą (Beese et al., 1993; Freemont et al., 1988) rodo, kad dvigrandininė DNR dalis jungiasi panašiai kaip ir kitų polimerazių kompleksuose. Tačiau išsikišęs  $3'$  galas jungiasi prie  $3'$ – $5'$  egzonukleazės centro, priešingai nei kitokių polimerazių kompleksuose, kuriuose  $3'$  pradmens galas yra dgDNR dalis ir jungiasi prie polimerazės centro (1.11 pav. A). Pasiūlytas mechanizmas, kaip funkcionuoja egzonukleazės domenas (Beese et al., 1993; Freemont et al., 1988). Klenow struktūroje  $3'$ – $5'$  egzonukleazės aktyvus centras yra apie  $30 \text{ \AA}$  nuo polimerazės aktyvaus centro. Tai rodo,

kad mažiausiai 8 ar 9 bazių poros turi būti išlydytos tam, kad netinkamas pradmens 3' galas patektų iš polimerazės centro į egzonukleazės centrą. Egzonukleazės funkcijos mechanizmas nustatytas remiantis T7 DNR polimerizacijos tyrimais (Johnson, 1993). Pasiskirstymas tarp polimerazės ir egzonukleazės centro lemia, ar vyks polimerizacija, ar hidrolizė. Normaliomis sąlygomis polimerazė pirmenybę teikia polimerizacijos reakcijai (1.11 pav. B). Tačiau, kai įtraukiamas neteisingas nukleotidas, kito teisingo nukleotido įjungimo greitis labai sumažėja, o egzonukleazės aktyvumo greitis padidėja.

### 1.2.4 Atvirkštinės transkriptazės

Atvirkštinės transkriptazės (AT) struktūrinės ir katalizinės savybės panašios į daugelio ląstelių ir virusinių polimerazių. Kitaip nei nuo DNR priklausomos DNR polimerazės (EC 2.7.7.7), AT pasižymi ne tik nuo DNR priklausomu DNR polimerazės aktyvumu, bet ir nuo RNR priklausomu DNR polimerazės aktyvumu (EC 2.7.7.49). Daugybė biocheminių, genetinių ir struktūrinių tyrimų, kurių metu labiausiai tirtos ŽIV-1 ir MuLV AT, leido suprasti, kaip šie fermentai atlieka savo darbą. AT, kaip ir paprastoms DNR polimerazėms, reikia pradmens ir matricos, kad galėtų pradėti DNR sintezę. Susintetinta DNR yra komplementari matricai pagal Watson'o ir Crick'o bazių poravimą. Polimerizacija vyksta prailginant pradmenį, kai prie jo 3' galo hidroksi grupės prijungiamas nukleotidas, suformuojant 3'–5' fosfodiesterinį ryšį ir pašalinant pirofosfatą. Atitinkamai, laisvos 3' hidroksi grupės neturintis pradmuo ar įjungti dNTP analogai, kurie neturi laisvos 3' hidroksi grupės, sustabdo DNR grandinės ilginimą (Coffin et al., 1997; Menéndez-Arias ir Berkhout, 2008).

Polimerizacija vyksta keliais žingsniais. Ji prasideda, kai AT prijungia pradmens ir matricos hibridą ir prijungia ateinantį dNTP į nukleotidų prijungimo vietą (NBS). Prijungimo greičiai tarp tinkamų ir netinkamų dNTP yra panašūs ir apriboti difuzijos. Tinkamas dNTP dėl susidariusių vandenilinių ryšių su komplementariu matricos nukleotidu prisijungia geriau, nei netinkamas. Kitos sąveikos yra svarbios, pasirenkant tinkamą nukleotidą: bazių  $\pi$ - $\pi$  elektronų sąveika ir NBS esančios aminorūgštys. Be to, bazių porų geometrija yra daug svarbesnė nei tinkamas vandenilinių ryšių susidarymas tarp dNTP ir matricos nukleotido (Rezende ir Prasad, 2004). Vis dėlto netinkamo nukleotido įvedimas yra gana dažnas, ypač pas lentivirusų AT. Visos AT neturi 3'–5' egzonukleazinio aktyvumo, kuris aptinkamas ląstelinėse DNR polimerazėse. Nesugebėjimas pašalinti netinkamai įvesto nukleotido labai padidina klaidų dažnį. Greitį ribojantis žingsnis vieno nukleotido įvedimo metu yra konformaciniai

pokyčiai, kurie apima pirštų subdomeno su pagautu dNTP priartėjimą prie polimerazės aktyvaus centro, kur dNTP  $\alpha$  fosfatas yra tinkamai orientuojamas pradmens 3' galo hidroksi grupės atžvilgiu. Įterptas naujas nukleotidas iš NBS patenka į produkto vietą. Visa AT katalizuojama DNR polimerizacija pasižymi mažu disociacijos greičiu nuo nukleorūgščių substrato (Kati et al., 1992; Rittinger et al., 1999).

AT DNR sintezei reikalingas divalentis katijonas. Magnio jonai bene labiausiai tinkami *in vitro* ir tikriausiai *in vivo*. Tačiau MuLV ir kitų gamaretrovirusų AT *in vitro* sugeba panaudoti  $Mn^{+2}$  jonus (Herschhorn ir Hizi, 2010). Du divalentiniai katijonai reikalingi dNTP trifosfatų deguonies atomų ir katalizinių asparto rūgščių šoninių grupių koordinavimui. Ši sąveika palengvina pradmens 3' galo hidroksi grupės deprotonizaciją ir leidžia nukleofiliškai atakuoti dNTP  $\alpha$  fosfatą. Tarpinės būsenos metu susidarę nauji krūviai yra papildomai stabilizuojami šių dviejų divalentinių katijonų (Steitz, 1993; Garcia-Diaz et al., 2007; Herschhorn ir Hizi, 2010).

Palyginus su ląstelinėmis DNR polimerazėmis, AT polimerizacijos greitis yra labai mažas. *In vitro* išmatuoti reakcijos greičiai priklauso nuo naudojamo substrato ir tyrimo sąlygų ir varijuoja nuo 1 iki 15 nt per sekundę (Herschhorn ir Hizi, 2010). Žinoma, kad reikia 4 valandų nuo infekcijos pradžios iki atvirkštinės transkripcijos metu susintetintos ŽIV-1 pilnos dvigrandinės DNR atsiradimo, kurios ilgis apie 9 kb (Herschhorn ir Hizi, 2010). Nors viruso RNR-RNR hibridas yra natūralus AT substratas, sintetiniai homopolimeriniai RNR–DNR heterodupleksai *in vitro* panaudojami kur kas geriau. Atitinkamai poli(rA)-oligo(dT) ir poli(rC)-oligo(dG) laikomi labai jautriomis matricos–pradmens sistemomis tikrinant AT nuo RNR priklausomos DNR sintezės aktyvumą, o poli(2'-Ometil-C)-oligo(dG) laikomas bene geriausiu šiam aktyvumui tirti (Herschhorn ir Hizi, 2010). Skirtingai nei kitos DNR polimerazės, visos žinomos AT nepasižymi matricos specifiskumu ir sugeba kopijuoti tiek DNR, tiek RNR. Tačiau AT sintetina tik DNR, o ne RNR. Bet šis sugebėjimas gali būti pakeistas, mutuoiant kai kurias aromatinės aminorūgštis, esančias nukleotidų prijungimo kišenėje. To pakanka, kad padarytas AT variantas turėtų stebimą RNR polimerazės aktyvumą. Buvo pasiūlyta, kad aromatinės aminorūgštys MuLV AT F155, ŽIV-1 AT Y115 ir pelių krūtis auglio viruso (MMTV) AT F119 atsakingos už dNTP įvedimą ir neleidžia panaudoti rNTP įvedimui dėl didesnės 2' hidroksi grupės (Gao et al., 1997; Cases-Gonzalez et al., 2000; Entin-Meer et al., 2002). Pakeitus dideles aromatinės aminorūgštis mažesnėmis, didesni rNTP panaudojami polimerizacijos reakcijoms. Mutantinės AT RNR sintezės efektyvumas toks pat, kaip ir DNR sintezės.

Tyrimai parodė, kad AT *in vitro* gali įvesti nematricinius nukleotidus į sintetinamą DNR, panašiai kaip DNR polimerazės, kurios neturi 3'–5' egzonukleazinio aktyvumo (Patel ir Preston, 1994; Golinelli ir Hughes, 2002; Kirshenboim et al., 2007). Kad AT galėtų atlikti tokią polimerizaciją, reikia ypatingai didelio santykio tarp AT ir matricos-pradmens hibrido, ir tai pasiekama esant didelei dNTP koncentracijai, kurios nebūna fiziologinėmis sąlygomis. Be to, ŽIV-1 AT esant viduląsteliniai dNTP koncentracijai (5–10 μM) prastai įveda nematricinius nukleotidus. Pasiekiamas greitis yra apie 10000 kartų mažesnis, nei nuo matricos priklausoma sintezė.

### **DNR sintezės procesyvumas**

Įvairių AT procesyvumas, stebimas *in vitro*, yra mažas, palyginus su kitomis DNR polimerazėmis, nes AT nesugeba ilgai išbūti prisijungusi prie ilgėjančios DNR grandinės (Avidan et al., 2002). Nepaisant to, kad AT procesyvumas siekia apie kelis šimtus nukleotidų, šie fermentai sugeba sustoti ir disocijuoti *in vitro* ties tam tikromis sekomis ar struktūromis, pavadintomis „stipriais stabdžiais“ (Coffin et al., 1997). Nors ne visos tokios sekos nustatytos, aptikta kelios RNR struktūros. Dėl to bandoma šias RNR struktūras panaudoti kaip AT slopiklius (Coffin et al., 1997). Kai kurios ŽIV-1 AT mutacijos paveikia procesyvumą. Keliuose ŽIV-1 AT mutantuose nustatyta koreliacija tarp jų padidėjusio atsparumo nukleozidų ar nukleotidų AT slopikliams ir sumažėjusiu procesyvumu ir padidėjusiu DNR sintezės tikslumu *in vitro* (Avidan ir Hizi, 1998; Oude-Essink et al., 1997). Nukleotidų analogų sukeliama slopinimo mažinimas pasiekiamas sumažinant procesyvumą, netinkamų nukleotidų įterpimą ir padidinant sugebėjimą tęsti DNR sintezę įvedus analogus (Rezende ir Prasad, 2004; Bakhanashvili et al., 1996).

### **DNR sintezės tikslumas**

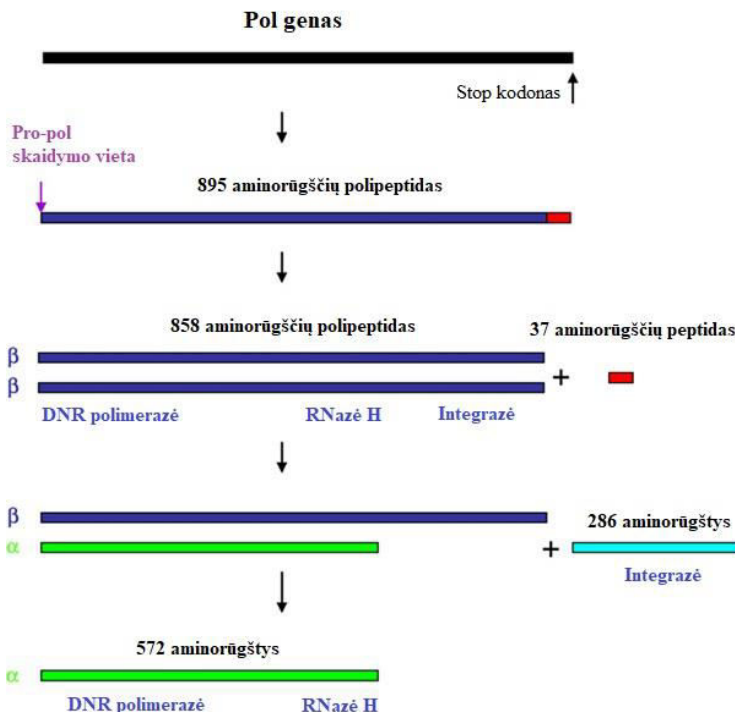
Visos žinomos AT neturi 3'–5' egzonukleazinio aktyvumo ir tai sumažina šių fermentų tikslumą sintetinant DNR. Kitos AT savybės gali dar padidinti klaidų dažnį. Naudojant sintetinius ir natūralius DNR ar RNR substratus, buvo nustatomas DNR sintezės tikslumas *in vitro* (Rezende ir Prasad, 2004; Menéndez-Arias, 2009). Bazių pakeitimai ir netinkamo įvedimo pratęsimai buvo aptikti didesniu dažniu, kas parodė, kad AT labiau linkusios į klaidas nei ląstelinės polimerazės. Pavyzdžiui, lentivirusų AT buvo linkusios į klaidas labiau nei kitos tirtos AT (Menéndez-Arias, 2009; Yu ir Goodman, 1992; Bakhanashvili ir Hizi, 1992; Bakhanashvili ir Hizi,

1993). Tam tikros dNTP surišančios aminorūgštys, taip pat aminorūgštys, sąveikaujančios su matrica, pradmeniu ar esančios mažojo griovio surišančiame regione yra svarbios fermentų tikslumui (Menéndez-Arias, 2002). Matricos prigimtis – RNR ar DNR – neturi įtakos tikslumui, bet tam tikros tirtos sekos turi pastebimus skirtumus tirtų AT tikslumui. Manoma, kad kiekvienos AT tikslumas priklauso nuo sekos ir fermento giminingumo (Bakhanashvili ir Hizi, 1993). Tačiau netinkamų nukleotidų įterpimas nėra vienintelis būdas įvesti klaidas atvirkštinės transkripcijos metu. Kartais pradmens vietos pasikeitimas ar nuslydimas matricos atžvilgiu yra pakankamas, kad atsirastų nukleotidų delecijos ar insercijos. Pasiūlyti kiti, sudėtingesni klaidų atsiradimo modeliai (Herschhorn ir Hizi, 2010), ir tai gali aprėpti didelius DNR regionus. *In vivo* retrovirusų mutavimo dažnis siekia tarp  $10^{-4}$  ir  $10^{-5}$  mutacijų nukleotidui. Buvo bandoma nustatyti koreliaciją tarp *in vivo* mutacijų dažnio ir *in vitro* AT tikslumo (Rezende ir Prasad, 2004; Menéndez-Arias, 2009). Tirta koreliacija buvo dalinė, nes atvirkštinė transkripcija yra kur kas sudėtingesnis procesas. Retroviruso AT nėra pagrindinis veiksnys, turintis įtaką mutacijų dažniui. Ląstelinė RNR polimerazė II, atsakinga už virusinės DNR transkripciją, pasižymi mažu tikslumu ir tuo prisideda prie didesnio mutacijų dažnio. Be to, kiti virusiniai ir ląsteliniai baltymai gali prisidėti prie mutacijų atsiradimo. Tai yra retrovirusų dUTPazė, ŽIV-1 reguliacinis baltymas Vpr (Mansky et al., 2000) ir ląstelinė APOBEC3 (Aguiar ir Peterlin, 2008).

### **Atvirkštinių transkriptazių subvienetai**

Visos žinomos AT yra arba monomerinės, arba heterodimerinės. Heterodimerinių AT mažasis subvienetas atsiranda, kai didesnis yra skaidomas proteazės. Tai pašalina didesnio subvieneto C galą, kuriame paprastai lokalizuotas RNazės H domenas. Heterodimerinės AT susidarymui reikia kelių žingsnių. Iš pat pradžių reikia Gag-Pol polibaltymo hidrolizavimo, kad atsipalaidavę didesnieji subvienetai galėtų asocijuotis į homodimerinį baltymą, pavyzdžiui ŽIV-1 AT p66/p66 ar ASLV b/b. Tolimesnis žingsnis, kai PR hidrolizuoja vieną iš subvienetų ir susidaro heterodimerinė AT, kaip ŽIV-1 p66/p51 ir ASLV b/a (1.12 pav.) (Hizi ir Herschhorn, 2008; Hizi ir Joklik, 1977; Sluis-Cremer et al., 2004). Pas alfaretrovirusus, kaip pas paukščių sarkomos leukozės virusą (ASLV), didesnis subvienetas (b) yra sujungtas AT-IN polipeptidas, o mažesnis (a) neturi IN sekų ir išlaiko RNazės H domeną (1.12 pav.). ASLV virionai turi laisvas aktyvias IN (Coffin et al., 1997; Hizi ir Herschhorn, 2008). AT gali turėti kelias izoformas, pavyzdžiui ASLV virionai turi subrendusį b/a, b/b ir

monomerinį a, kurie yra aktyvūs, bet pasižymi skirtingu fermentiniu aktyvumu (Hizi et al., 1977). ŽIV-1 AT p66/p51 ir p66/p66 mažai tesiskiria (Restle et al., 1990), kai p51 subvienetas neturi fermentinio aktyvumo (Hizi et al., 1988). Visos monomerinės AT, aptinkamos gamaretrovirusuose ar betaretrovirusuose, turi DNR polimerazės ir RNazės H domenų ir N gale kartais būna PR baltymo likutinės sekos. MMTV apie 27 aminorūgštys, esančios PR C gale, taip pat aptinkamos AT (Taube et al., 1998; Entin-Meer et al., 2003). Tai reiškia, kad Gag-Pr-Pol alternatyvūs skaidymas išlaisvina viso ilgio PR ar AT, ir 27 aminorūgščių seka gali turėti dvigubą funkciją pas kiekvieną iš šių baltymų. Galvijų leukemijos viruso (BLV) AT N galo 26 aminorūgščių seka atsiranda iš *Pro* geno, antrą kartą perstumiant skaitymo rėmelį. Šiuo atveju PR pasibaigia *Pro* geno 3' gale ir nėra jokio persidengimo tarp AT ir PR (Hizi ir Herschhorn, 2008). Likusi BLV AT seka atsiranda iš *pol* geno, perstumiant skaitymo rėmelį (Hizi ir Herschhorn, 2008; Perach ir Hizi, 1999).

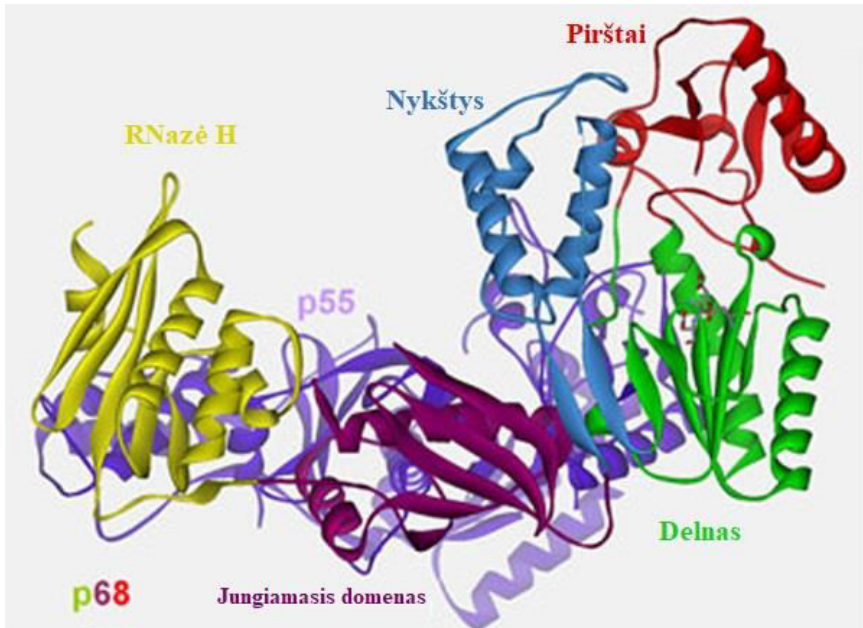


**1.12 pav. ASLV Pol polibaltymo scheminė struktūra ir brendimo etapai.** Pilno ilgio Gag-Pol būna virionuose. Virionuose šie polibaltymai vėliau skaidomi virusinės proteazės iki atskirų baltymų. Po Gag-Pol polibaltymo hidrolizavimo, didesnieji subvienetai ( $\beta$ ) gali asocijuotis į homodimerinę AT. PR hidrolizuoja vieną iš subvienetų ir susidaro heterodimerinę AT. Pas

paukščių sarkomos leukozės virusą didesnis subvienetas ( $\beta$ ) yra sujungtas AT-IN polipeptidas, o mažesnis ( $\alpha$ ) neturi IN sekų ir išlaiko RNazės H domeną. Pagal Hizi ir Herschhorn, 2008.

### Atvirkštinių transkriptazių RNazės H domenai

Į AT sudėtį įeinantis RNazės H domenai atsakingas už endonukleazinį aktyvumą, kuris hidrolizuoja RNR-RNR-DNR heteroduplekse (Schultz ir Champoux, 2008; Champoux ir Schultz, 2009). RNazės H domenai atskirti nuo DNR polimerazės domeno jungiamuoju domenu. Šie domenai sudaro svarbius kontaktus (1.13 pav.).



**1.13 pav. ŽIV-2 AT struktūra.** ŽIV-2 AT yra heterodimerinė, sudaryta iš p68 ir p55 baltymų. Subvieneto p68 domenai nuspalvinti atitinkamomis spalvomis. Pagal Herschhorn ir Hizi, 2010.

Skirtingai nuo įprastų ribonukleazių, RNazė H hidrolizuoja fosfodiesterinius ryšius iki 3'-OH ir 5'-fosfato. Tai labai svarbu atvirkštinės transkripcijos metu, nes RNazės H suformuoti oligoribonukleotidai turi tiktai pradmenimis (+)DNA grandinės sintezei. RNazės H aktyvumui reikia magnio jonų (Schultz ir Champoux, 2008; Champoux ir Schultz, 2009). RNazės H aktyviajame centre reakcija vyksta, vandens molekulei nukleofiliskai atakuojant fosfato grupę ir nutraukiant ryšius tarp dviejų artimų ribonukleotidų. Kad tai įvyktų, nukleofilinė vandens molekulė turi

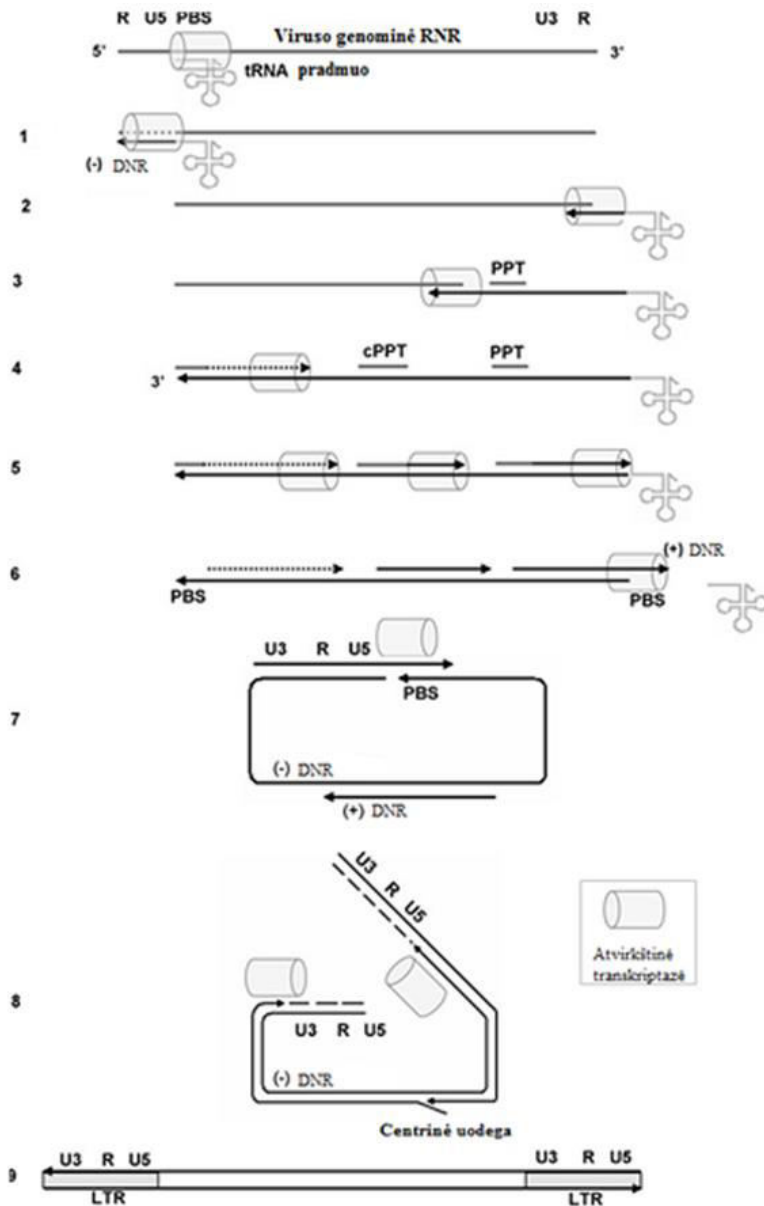


būti aktyvuota vienu iš aktyviajame centre esančių divalenčio metalo jono. Be to, metalų jonai stabilizuoja tarpinę būseną.

### 1.2.5 Atvirkštinė transkripcija

Retrovirusai evoliucijos eigoje sukūrė sudėtingą ir išskirtinį būdą daugintis ląstelių viduje. Vos tik virusas įeina į ląstelę, viruso viengrandininė RNR panaudojama dvigrandininės DNR sintezei. DNR yra pernešama į branduolį, kuriame fermentas integrazė įstato ją į šeimininko genomą. Virusinė DNR, esanti chromosominėje DNR, vadinama provirusu. Jis gali valdyti virusinės mRNR, kuri atsakinga už viruso baltymų sintezę, ir genominės RNR, kuri bus supakuota į virioną, sintezę. RNR polimerazė II atsakinga už virusinių RNR raišką. Tam, kad genominė RNR būtų panaudota infektyvaus viruso susidarymui, reikia įveikti tam tikras kliūtis. Genominės RNR sintezės metu promotoriaus seka, randama 5' gale ilgame galiniame pasikartojime (LTR), neįeina į susidariusią RNR ir sekos, apie 30 nt priklausiančios LTR, einančios prieš poliA uodegą prarandamos mRNA brendimo metu. Dėl to viruso genominė RNR turi dalines LTR sekas abejuose RNR galuose. Šios sekos turi būti prailgintos DNR sintezės metu, kad turėtų visus reguliacinius elementus, reikalingus transkripcijai ir RNR brendimui. Dėl to retrovirusų AT evoliucionavo taip, kad sugebėtų įstatyti reguliacinius elementus atvirkštinės transkripcijos metu, panaudojant genominėje RNR esančias sekas. Taigi AT aktyvumas yra sudėtingesnis nei paprastas RNR kopijavimas (Herschhorn ir Hizi, 2010).

Dvigrandininės DNR susidarymas vyksta keliais žingsniais (1.14 pav.). Atvirkštinė transkripcija prasideda, kai AT asocijuojasi su viruso RNR ir pradmeniu. Pradmuo yra privalomas visoms AT, kad galėtų kopijuoti RNR. DNR sintezė pradedama, panaudojant pradmenį tRNA, kurios ląstelėje yra daug. Pavyzdžiui, lentivirusai ir betaretrovirusai naudoja tRNA<sup>lys3</sup>, gamaretrovirusai naudoja tRNA<sup>pro</sup>, alfaretrovirusai panaudoja tRNA<sup>trp</sup> kaip pradmenį. tRNA turi 18 nukleotidų seką 3' gale, kuri komplementari pradmens prijungimo vietai (PBS). To pakanka, kad tarp tRNR ir PBS įvyktų hibridizacija. (Coffin et al., 1997; Le Grice, 2003; Abbink ir Berkhout, 2008). Kartais, kaip pas LTR retrotranspozoną Tfl, pradmuo nėra iš ląstelių tRNA. Pradmuo atsiranda iš 11 nt, kurie komplementarūs genominės RNR 5' gale. Šiuo atveju Tfl AT RNazės H hidrolizuoja RNR 3' gale ir susidaro veikiantis 11 nt pradmuo, tinkantis DNR sintezei (Levin, 1997; Hizi, 2008).



**1.14 pav. Atvirkštinės transkripcijos schema.** Atvirkštinė transkripcija prasideda, kai AT asocijuojasi su viruso RNR ir pradmeniu. Prasideda (-)DNR, kuri yra komplementari viruso genominei RNR, sintezė (1). Dėl R sekų duplikacijos, (-)DNR gali hibridizuotis su R sekomis, esančiomis 3' gale (2). Kai DNR hibridizuojasi su 3' galo R seka, (-)DNR sintezė vykdoma kopijuojant viruso RNR. Tuo pačiu metu RNazė H degraduoja RNR (3). Didysis PPT, esantis arti 3' galo (3' PPT), panaudojamas kaip pagrindinis pradmuo antrosios (+)DNA grandinės sintezės metu, pašalinus kitas RNR sekas (4). Kiti RNR fragmentai, išlikę po degradacijos, gali būti panaudoti kaip pradmenys (+)DNR sintezei. (+)DNR sintezė vyksta, kol AT pradeda

kopijuoti tRNR pradmenį (5). DNR grandinė 3' gale su tRNR sukuria naują RNR-DNR hibridą, kuris yra RNazės H substratas (6). R ir U5 sekos ir unikalios viruso RNR sekos, esančios 3' gale (U3), suvedamos kartu, kad suformuotų 3' LTR (+)DNR grandinėje. (+)DNR grandinė hibridizuojasi su pilno ilgio (-)DNR grandine. Antros (+)DNR grandinės pernaša katalizuojama AT (7). Tai sukuria žiedinę DNR molekulę. Po to abiejų DNR grandinės gali būti prailgintos dalyvaujant AT (8). Atvirkštinė transkripcija užsibaigia pilno ilgio, integracijai tinkamos dvigrandininės DNR su dviem identiškais LTR kiekviename gale, sinteze (9). Pagal Herschhorn ir Hizi, 2010.

Visų LTR retroelementų ir retrovirusų atvirkštinė transkripcija prasideda (-)DNR, kuri yra komplementari viruso genominei RNR, sinteze. DNR sintezė prasideda kopijuojant 5' gale esančias 5U ir R sekas (1.14 pav. 1 žingsnis). DNR kartu su RNR sudaro RNR-DNR hibridą, kuriame RNR grandinė yra hidrolizuojama, panaudojant AT RNazės H domeną. Nepaisant to, ŽIV-1 ir MuLV AT sugeba įkirpti kartą per įvestus 100–120 nukleotidų. To nepakanka visiškai RNR hidrolizuoti. Dėl to vyksta daugybė vidinių įkirpimų, kurie leidžia tolimesnę RNR grandinės degradaciją (Coffin et al., 1997; Schultz ir Champoux 2008; Champoux ir Schultz, 2009). Atsiradusi viengrandininė (-)DNR turi sekas, komplementarias identiškoms R sekoms, esančios RNR 5' ir 3' galuose. R sekos ilgis priklauso nuo retrovirusų rūšies ir pas MMTV būna 12 nt, BLV 235 nt, ŽIV-1 turi 98 nt ir MuLV 68 nt ilgio sekas (Coffin et al., 1997). Dėl R sekų duplikacijos, (-)DNR gali hibridizuotis su R sekomis, esančiomis 3' gale. Kadangi virione yra dvi RNR molekulės, (-)DNR grandinės pernaša gali būti tiek tarpmolekulinė, kai pereina ant kitos RNR molekulės, arba vidumolekulinė, kai DNR peršoka į kitą RNR galą. Šie du grandinės pernašos būdai vyksta vienodu dažniu (Yu et al., 1998; van Wamel ir Berkhout 1998). Matricos pakeitimas gali įvykti prieš užbaigiant DNR sintezę. Kai DNR hibridizuojasi su 3' galo R seka, (-)DNR sintezė vykdoma kopijuojant viruso RNR (1.14 pav. 2 žingsnis). Tuo pačiu metu RNazė H degradoja RNR. RNazė H nepasižymi sekų specifiškumu, bet purinų turtingos sekos, vadinamos polipurinine seka (PPT), pasižymi dideliu atsparumu RNazės H katalizuojamai hidrolizei (1.14 pav. 3 žingsnis). Didysis PPT, esantis arti 3' gale (3' PPT), panaudojamas kaip pagrindinis pradmuo antrosios (+)DNA grandinės sintezės metu, pašalinus kitas RNR sekas (Rausch ir Grice, 2004). Kiti RNR fragmentai, išlikę po degradacijos, gali būti panaudoti kaip pradmenys (+)DNR sintezei (Sarafianos et al., 2009) (1.14 pav. 4 ir 5 žingsnis). Tokiu būdu, tokie retrovirusai kaip ŽIV-1, arklių infekcinės anemijos virusas (EIAV), kačių imunodeficito virusas (FIV) ir ASLV, retrotranspozonas Ty1 pradeda

(+)DNA sintezę, naudojant papildomus RNR pradmenis. Antras PPT aptinkamas viruso genomo viduje IN geno sekoje ir vadinamas centriniu PPT (cPPT) (Charneau et al., 1992; Hameau et al., 2001). Visos (+)DNA versijos, atsiradusios panaudojant skirtingus pradmenis, gali atlikti tam tikras funkcijas atvirkštinės transkripcijos metu. (+)DNR sintezė vyksta, kol AT pradeda kopijuoti tRNR pradmenį. Pirmi 18 nt 3' gale, komplementarūs PBS, yra AT kopijuojami, bet kitas nukleotidas tRNR yra modifikuotas rA, kuris negali būti matrica DNR sintezei. DNR grandinė 3' gale su tRNR sukuria naują RNR-DNR hibridą, kuris yra RNazės H substratas (1.14 pav. 6 žingsnis). Pas daugumą retrovirusų RNazė H pašalina tRNR fragmentą, kai ŽIV-1 RNazė H iškerpa 1 nukleotidą tarp tRNR ir DNR, taip palikdama papildomą rA DNR 5' gale (Herschhorn ir Hizi, 2010). Šioje stadijoje R ir U5 sekos ir unikalios viruso RNR sekos, esančios 3' gale (U3), suvedamos kartu, kad suformuotų 3' LTR (+)DNR grandinėje. (+)DNR grandinė yra pertraukta ir susihybridizavusi su pilno ilgio (-)DNR grandine. Antros (+)DNR grandinės pernaša katalizuojama AT (1.14 pav. 7 žingsnis). Šis pernešimas yra vidumolekulinis (Yu et al., 1998). Jį sukelia (+)DNR PBS sekos hibridizacija su komplementaria (-)DNR seka 3' gale. Tai sukuria žiedinę DNR molekulę. Po to abiejų DNR grandinės gali būti prailgintos dalyvaujant AT. DNR sintezės metu gali prireikti AT grandinės nustumimo aktyvumo trukdančiai DNR grandinei pašalinti ar panaudoti ląstelės DNR taisymo fermentus (1.14 pav. 8 žingsnis). Atvirkštinė transkripcija užsibaigia pilno ilgio integracijai tinkamos dvigrandinės DNR su dviem identiškais LTR kiekviename gale sinteze (1.14 pav. 9 žingsnis).

Neintegruotų retrovirusų DNR analizė parodė, kad (+)DNR gavimas yra sudėtingesnis procesas. MuLV ir MMTV turi didelius plyšius jų (+)DNR grandinėje. Priešingai ŽIV-1, (+)DNR grandinė turi centrinę DNR uodegą, kuri susidaro iš dviejų persidengusių (+)DNR grandinės sekų. Tai susidaro iš karto po antro grandinės pernešimo, kai (+)DNA sintezė pradama nuo 3' PPT ir tęsiama dalinai persidengia su (+)DNA grandine, kuri pradėta nuo cPPT (Herschhorn ir Hizi, 2010). Tada nuo cPPT prailginta DNR grandinė nustumama, kad vyktų DNR sintezė ir susidarytų uodega. DNR uodegos būdingos ASLV ir gali dalyvauti rekombinacijoje tarp dviejų virusinių DNR. DNR uodegų ilgis ir vieta nulemta DNR sintezės iniciacijos vieta ir seka, vadinama centro terminacijos. Dėl centro terminacijos sekos vietos ŽIV-1 DNR uodega yra 88 ar 98 nt atstumu nuo cPPT, kai Ty1 uodega būna iki 130 nt (Herschhorn ir Hizi, 2010). Manoma, kad viruso nukleokapsidinis NC baltymas padidina DNR sintezės greitį, stabilizuodamas struktūrinius svyravimus centrinėje uodegoje (Hameau et al., 2001). Centrinė uodega yra būtina sukurti lankstumą dvigrandinės DNR centre ir taip palengvinti

preintegracijos komplekso susidarymą (PIC). PIC, kuris yra sudarytas iš pilnos linerizuotos dvigrandinės DNR, virusinių baltymų: AT, IN, NC, virusinio baltymo R (Vpr) ir ląstelinių baltymų, keliauja į nesidalijančių ląstelių branduolį (Zennou et al., 2000; Arhel et al., 2007). Centrinės uodegos svarba nėra aiški, nes ŽIV-1 mutantas, kuris turi suardytą centrinę DNR uodegą, yra patogeniškas *in vivo* (Limon et al., 2002; Marsden ir Zack, 2007). Uodegos pakeitimas turi mažą poveikį PIC patekimui į branduolį (Dvorin et al., 2002).

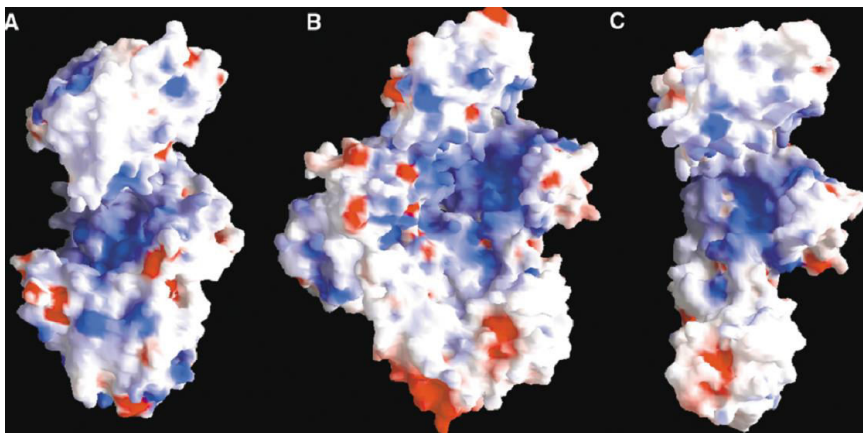
Atvirkštinė transkripcija pasižymi keliais bruožais. Kai viruso DNR, gauta atvirkštinės transkripcijos metu, yra IN panaudojama integracijai, jos galai turi būti tikslūs. RNazės H sukiamas tRNR pradmens pašalinimas apsprendžia U5 galą ir PPT pradmens pašalinimas apsprendžia U3 galą. RNazė H nepasižymi sekų atpažinimu, bet pašalinimą sugeba atlikti tiksliai. Dėl to DNR galai yra apibrėžti tam tikru nukleotidu (Herschhorn ir Hizi, 2010). Dviejų RNR buvimas viriono viduje yra svarbus sėkmingam dauginimuisi. Toks virionas gali išgyventi, net kai viena RNR molekulė yra degradavusi, nes atvirkštinės transkripcijos metu grandinės gali būti perneštos ant kitos RNR (Basu et al., 2008). Teoriškai, kai yra dvi genominės RNR kopijos, visą DNR kopiją galima gauti net su RNR, turinti viengrandžius trūkius, kai viengrandžius trūkių vietos abiejose RNR nėra identiškos. Genetinių rekombinacijų įtaka gali būti vienas iš paaiškinimų, kam reikia dviejų RNR (Herschhorn ir Hizi, 2010). Šeiminingo ląstelėse, kurios turi du skirtingus provirusus, gali susidaryti virionai su giminingu RNR genomu. Ląstelėse, kurios turi tik vieną provirusą, dvi RNR bus panašios ir dėl to matricos pakeitimas neturės svarbios įtakos. ŽIV-1 atveju tik rekombinacija leidžia susidaryti virusams, kurie atsparūs daugeliui vaistų, nors tėviniai turėjo atsparumą tik vienam iš vaistų (Herschhorn ir Hizi, 2010).

### **1.2.6 Moloney MuLV AT struktūra**

Moloney MuLV (M.MULV) AT atstovauja grupę monomerinių retrovirusų AT. Šiai grupei priklauso MMTV, BLV, kiaulių endogeninis retrovirusas ir LTR retrotransposonas Tf1 (Hizi ir Herschhorn, 2008). Pirmieji Moloney MuLV AT struktūros tyrimai prasidėjo nuo 1.8 Å skiriamąja geba nustatytos N galo fragmento struktūros, į kurią įeina pirštų ir delno subdomenai (Georgiadis et al., 1995), ir šio fragmento komplekso su DNR (Coté et al. 2000, Najmudin et al. 2000). N galo fragmentas buvo gautas iš ribotos proteolizės. Iš šio modelio nustatyta F155 funkcija – atskirti deoksiribonukleotidus nuo ribonukleotidų, taip užtikrinant DNR polimerazės

aktyvumą. Vėliau ši funkcija buvo patvirtinta nagrinėjant mutantus (Gao et al. 1997; Georgiadis et al. 1995). N galo fragmento komplekse su DNR nukleorūgštys prisijungia prie pirštų subdomeno neįprastos vietos, kuri tikriausiai svarbi DNR sintezėje (Gu et al. 2001; Najmudin et al. 2000).

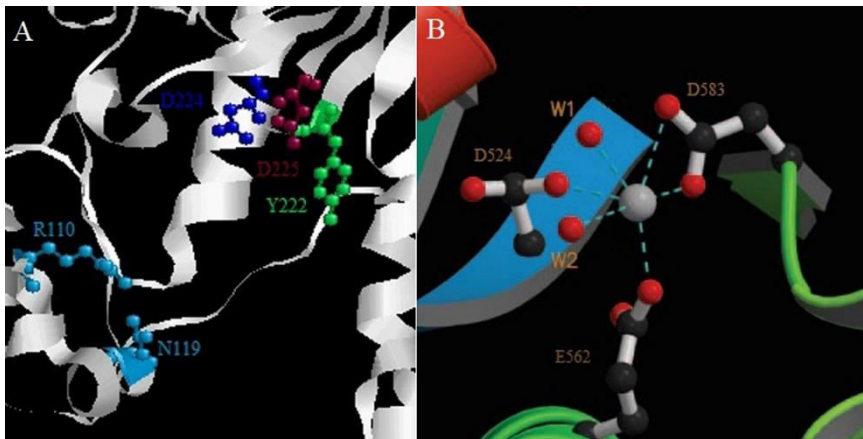
Fermento paviršiuje yra konservatyvus teigiamai įkrautas plotas, kuris reikalingas substrato pritraukimui ar atpažinimui (1.15 pav.). Kitas svarbus M.MuLV AT bruožas yra fermento forma. Į gnybtą panaši M.MuLV forma skiriasi tiek nuo p66/p51 ŽIV-1 AT heterodimero, tiek nuo p66 subvieneto. Tai galėtų paaiškinti, kaip Moloney MuLV AT gali būti monomerinės formos (Das ir Georgiadis, 2004). Priešingai, heterodimerinei ŽIV-1 AT reikia, kad p66 sudarytų kompleksą su p51 ir tai leistų susidaryti nukleorūgščių surišimo plyšį ir padėtų įtraukti matricos – pradmens kompleksą (Harris et al., 1998).



**1.15 pav. M.MuLV AT (A), ŽIV-1 p66/p51 (B) ir ŽIV p66 (C) molekulių paviršiai.** Fermentų paviršiuje yra konservatyvus teigiamai įkrautas rajonas (mėlyna spalva), kuris reikalingas substrato pritraukimui ar atpažinimui. Į gnybtą panaši M.MuLV forma skiriasi tiek nuo p66/p51 ŽIV-1 AT heterodimero (B), tiek nuo p66 subvieneto (C). Pagal Das ir Georgiadis, 2004.

M.MuLV AT pirštų ir delno subdomenai sudaro santykinai nelanksčią molekulės dalį, kurios struktūra anksčiau nustatyta kaip N galo fragmentas (Georgiadis et al., 1995). Šio fermento aktyvųjų centrą sudaro R110, N119, Y222 ir kataliziškai svarbios D224 ir D225 aminorūgštys (1.16 pav. A) (Coté ir Roth, 2008). Dvi šios asparto rūgštys įeina į konservatyvų YXDD motyvą, kuris M.MuLV AT yra YVDD. Šis struktūrinis motyvas, pastebimas visuose AT, yra neįprastas, nes patenka į antro tipo  $\beta$  plaukų segtuką, kuriame antroje pozicijoje paprastai būna glicinas, bet nei M.MuLV

nei ŽIV-1 AT glicino šioje pozicijoje neturi (Coté ir Roth, 2008). Nykščio subdomenas yra svarbus substrato surišime ir procesyvumui. Taip pat šis subdomenas turi mažojo griovio surišimo traktą, kuris svarbus fermento judėjimui ant substrato polimerizacijos metu (Bebenek et al., 1997). Į M.MuLV AT mažojo griovio surišimo traktą įeina aminorūgštys R298, E302 ir T306, kaip seka iš struktūra paremta sekų lyginimų (Shindyalov ir Bourne, 1998). Remiantis skirtinga struktūra ir sekų konservatyvumu, M.MuLV AT sąveika su nukleorūgštimis skiriasi nuo ŽIV-1 AT.

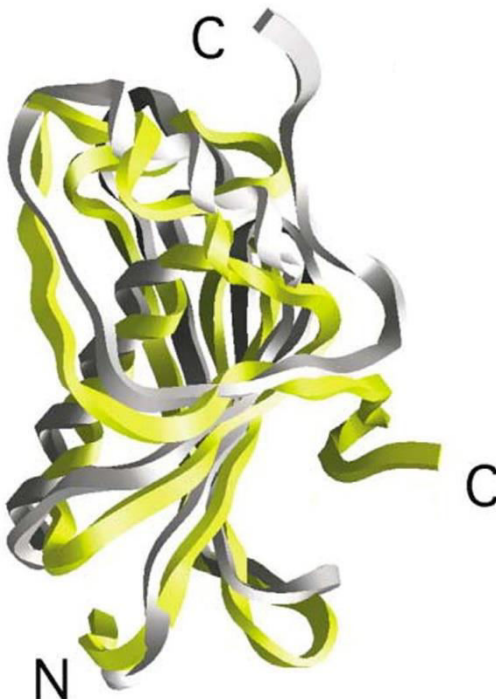


**1.16 pav. M.MuLV AT polimerazės domeno (A) ir RNazės H domeno (B) aktyvaus centro schemas.** A) M.MuLV AT polimerazės aktyvųjų centrą sudaro R110, N119 (žydra spalva), Y222 (žalia spalva) ir kataliziškai svarbios D224 (mėlyna spalva) ir D225 (purpurinė spalva) aminorūgštys (Coté ir Roth, 2008). B) RNazės H domeno aktyviajame centre esantis magnio jonas (pilkas rutuliukas) koordinuotas aminorūgštimis D524, E562, D583 ir dvejomis vandens molekulėmis (pažymėta atitinkamai W1 ir W2, ir raudona spalva). Pagal Lim et al., 2006.

Kelios sujungimo subdomeno aminorūgštys įeina į RNazės H pradmens surišimo vietą: V402, G405, W406. Nors RNazės H domenas nepasižymi sekos išskirtumu kaip pirštų ir delno subdomenai, vis dėl to RNazės H domenas struktūriniu požiūriu tarp M.MuLV ir ŽIV AT yra panašus ir su kitomis RNazėmis H (Davies et al., 1991; Ishikawa et al., 1993; Nowotny et al., 2005). RNazės H domenas turi labai konservatyvų D-E-D motyvą, kurio aminorūgštys yra D524, E562 ir D583 (1.16 pav. B). Kvirtas konservatyvus aspartatas D653 yra svarbus RNazės H aktyvumui (Coté ir Roth, 2008).

Vienas iš pagrindinių skirtumų tarp ŽIV-1 ir M.MuLV yra jungiamasis domenas. ŽIV-1 AT poli-peptidas išeina iš jungiamojo domeno ir

eina tiesiai į RNazės H domeną. M.MuLV AT polipeptidas nukreiptas priešinga kryptimi (1.17 pav.) (Das ir Georgiadis, 2004). Papildomos 32 aminorūgštys, jungiančios RNazės H domeną prie likusio fermento, neaptinkamos ŽIV-1 AT. Pakeitus ŽIV-1 AT C galo RNazės H domeną su M.MuLV AT RNazės H domenu ar tiesiog įvedus 27 aminorūgštis iš M.MuLV AT jungiamojo domeno į ŽIV-1 AT jungiamąjį domeną, susidaro monomeriniai chimeriniai baltymai (Misra et al. 1998; Pandey et al. 2001). Jungiamasis regionas atlieka svarbią funkciją, kuri leidžia RNazės H domenui pasižymėti konformaciniu lankstumu (Das ir Georgiadis, 2004).



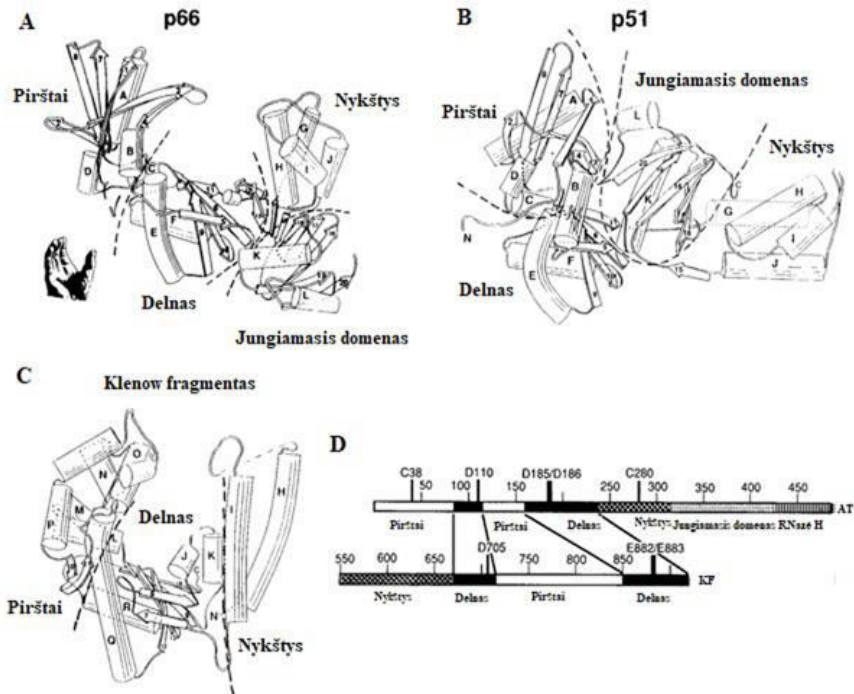
**1.17 pav. M.MuLV AT ir ŽIV-1 AT jungiamųjų domenų palyginimas.** Jungiamasis domenas iš M.MuLV AT yra geltonos spalvos, ŽIV-1 AT subvienetas p66 yra pilkos spalvos. Persidengime stebimi panašūs struktūriniai elementai. Didžiausias skirtumas tarp fermentų – polipeptidas, jungiantis jungiamąjį domeną su RNazės H domenu yra priešingose pusėse. Pagal Das ir Georgiadis, 2004.

### 1.2.7 ŽIV-1 AT struktūra

ŽIV-1 AT yra dviejų subvienetų heterodimeras: didesniojo p66 (1.18 pav. A), turinčio 560 aminorūgščių, ir mažesnio p51 (1.18 pav. B), kuris turi pirmąsias 440 p66 aminorūgščių (Lightfoote et al., 1986). P66 pasižymi konservatyvia struktūra, būdinga daugumai polimerazių (1.18 pav. C), ir



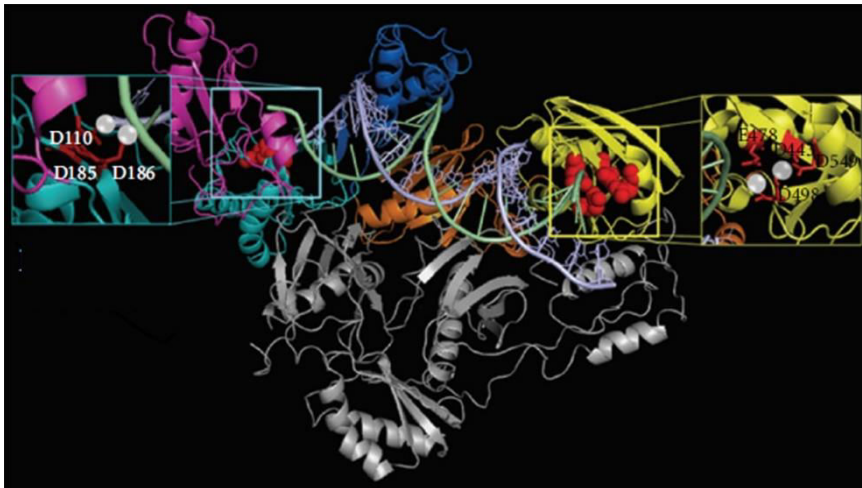
atitinkamais subdomenais: pirštų, 1-85 ir 118-155 aminorūgštys, delno, 86-117 ir 156-237 aminorūgštys, nykščio, 238-318 aminorūgštys. P66 subvienetas dar turi sujungimo subdomeną, kuris apima 319-426 aminorūgštis, ir RNazės H domeną sudaro 427-560 aminorūgštys (1.18 pav. D) (Jacobo-Molina et al., 1993; Kohlstaedt et al., 1992). Parodyta, kad p51 vaidmuo yra daugiausia struktūrinis, o jo subdomenų erdvinės orientacijos skiriasi nuo p66, p51 polimerazės aktyvusis centras yra giliai heterodimere (Kohlstaedt et al., 1992; Rodgers et al., 1995).



**1.18 pav. ŽIV-1 AT ir Klenow fragmento struktūrinės schemas.** Pirštai, delno, nykščio ir jungiamojo domenai pažymėti, o jų ribos pažymėtos punktyrinėmis linijomis. A subvieneto p66 schema. B subvieneto p51 schema. C Klenow fragmento struktūrinė schema. D Apytikslės subdomenų vietos atvirkštinės transkriptazės (AT) ir Klenow fragmento (KF) sekoje. Pagal Steitz, 1993.

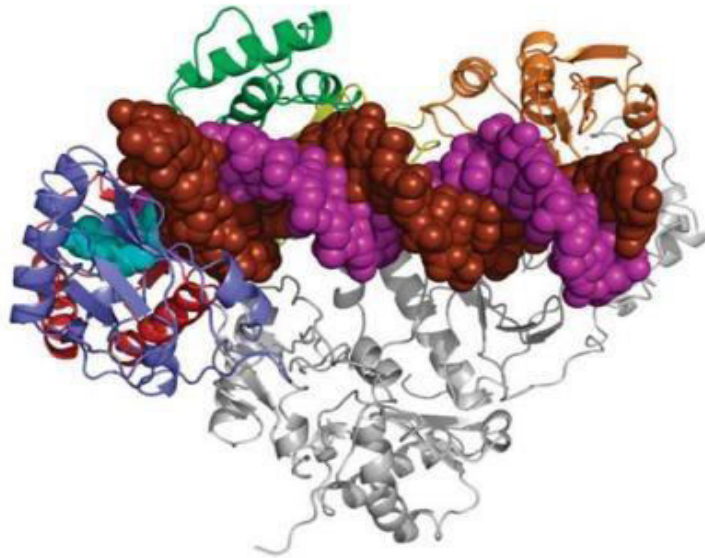
Polimerazės aktyvusis centras yra delno subdomene ir joje yra trys konservatyvūs aspartatai, esantys  $\beta$  lakšte, kuris sudarytas iš trijų antiparalelių  $\beta$  grandinių:  $\beta_6$ ,  $\beta_9$  ir  $\beta_{10}$ . Trys kataliziniai aspartatai iš polimerazės aktyvaus centro yra D110, D185 ir D186 (1.19 pav.). Du aspartatai polimerazės aktyvioje centre yra konservatyvaus YXDD motyvo dalis, o ŽIV-1 RT yra YMDD (Kohlstaedt et al., 1992; Rodgers et al., 1995;

Coté ir Roth, 2008). Nykščių subdomenas turi dvi  $\alpha$  spirales ir jame yra mažojo griovelio surišanti seka (Bebenek et al., 1995), esanti  $\alpha$  spiraleje, nukreipta prieš pirštų subdomeną. RNazės H domenas turi konservatyvų D-E-D motyvą, kurį sudaro yra D443, E478 ir D498 (1.19 pav.). Ketvirtas konservatyvus aspartatas D549 taip pat yra svarbus RNazės H aktyvumui (Davies et al., 1991; Coté ir Roth, 2008). P66 pirštu, delno ir nykščio subdomenai apgaubia ir sąveikauja su nukleorūgščių substratu, o plyšio dugną sudaro abiejų subvienetų jungiamųjų subdomenai ir p51 nykštys.

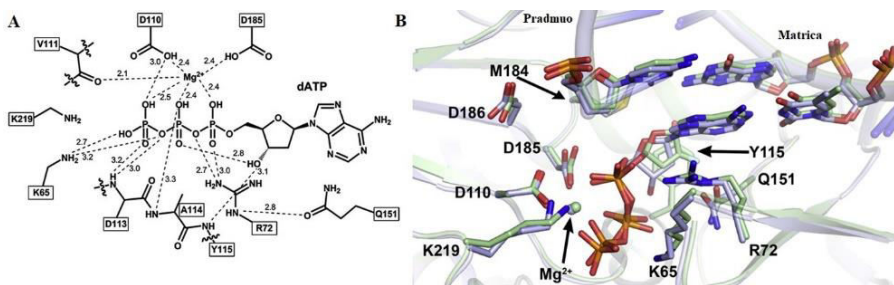


**1.19 pav. ŽIV-1 AT struktūra.** Fermentas turi du domenai: p66 (spalvotas) ir p51 (pilkas). Polimerazės domenai atitinkamai nuspalvinti: pirštai rausvai, delnas melsva spalva, nykštys mėlynai, jungiamasis domenas oranžine spalva ir RNazės H domenas geltonai. Polimerazės aktyviajame centre parodyta katalizinės aminorūgštys D110, D185 ir D186 kartu su magnio jonais (pilki rutuliukai). RNazės H aktyviajame centre parodyti katalizinės aminorūgštys D443, E478, D498 ir D549, kurios koordinuoja du magnio jonus (pilki rutuliukai). Pagal Esposito et al., 2012.

Trinaris ŽIV-1 AT su dgDNR ir dNTP ar nukleozido trifosfato analogu kompleksas (1.20 pav.) panašus į kompleksus be dNTP, tačiau yra esminis skirtumas: prisijungę dNTP, p66 pirštai uždaro nukleozido trifosfatą, suformuojant dNTP prijungimo kišenę (Huang et al., 1998; Tuske et al., 2004; Das et al., 2009; Lansdon et al., 2010). dNTP koordinuojamas K65 ir R72 šoninių grupių p66 pirštų subdomene, peptidinės grandinės D113 ir A114 amidinėmis grupėmis ir dviem magnio jonais (1.21 pav. A). Kitos svarbios aminorūgštys, kurios sudaro dNTP surišimo kišenę, yra Y115, F116 ir Q151 (1.21 pav. B). Y115 aromatinis žiedas leidžia įjungti dNTP, bet ne rNTP dėl 2' hidroksi grupės buvimo ribozėje (Cases-González et al., 2000).



**1.20 pav. Trinario ŽIV-1 AT, dvigrandinės DNR ir dNTP komplekso struktūra.** P51 pažymėtas pilka spalva; RNazės H domenas (esantis p66) – auksine, p66 subdomenai: pirštai – mėlyna, delnas – raudona, nykštys – žalia, sujungimas – geltona; matricinė (-) DNR grandinė – ruda, ilginama (+) DNR grandinė – violetine; dNTP – šviesiai mėlyna. Pagal Hu ir Hughes, 2012.



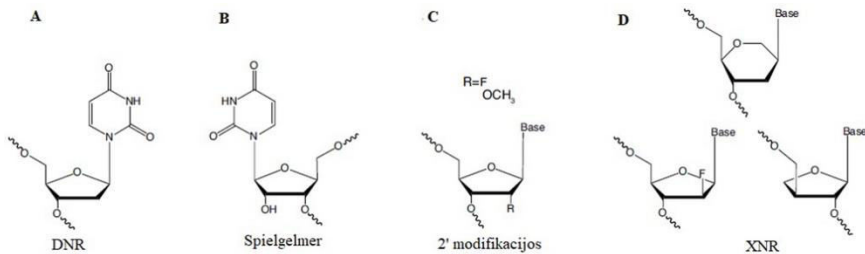
**1.21 pav. A) ŽIV-1 AT sąveikų su dATP fosfatu schema.** Vandeningieji ryšiai parodyti brūkšniuotomis linijomis, o atitinkami atstumai nurodyti angstromais. **B) ŽIV-1 AT kompleksų su dATP ir slopiklio struktūrų perdengimas.** Parodytos svarbios aminorūgštys, tarp jų Y115 ir Q151. Slopiklis ir dATP jungiasi panašiai. Pagal Lansdon et al., 2010.

### 1.3 Modifikuoti nukleotidai ir nukleozidai

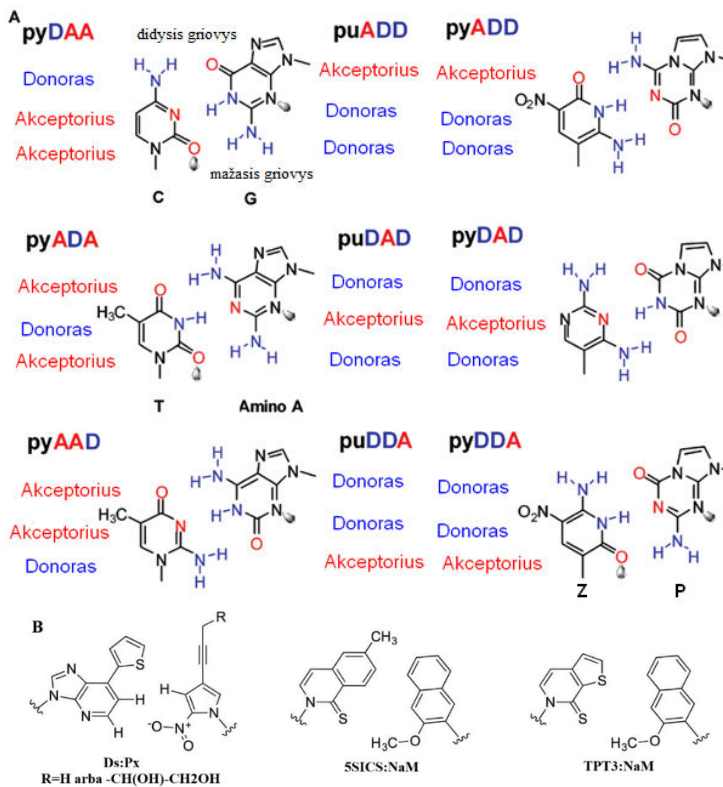
Pirmieji modifikuoti nukleotidai sukurti prieš 50 metų ir naudoti kaip antivėžiniai ar antivirusiniai preparatai įvairių polimerazių slopinimui (Jordheim et al., 2013). Tačiau nukleotidų modifikacijų tyrimai neapsiriboja vien polimerazių slopinimu, bet plečiasi į sintetinės biologijos, genetinio kodo praplėtimo tyrimų sritį (Eremeeva ir Herdewijn, 2018), epitranskriptomos tyrimus (Palumbo ir Beal, 2018) ir modifikuotų oligonukleotidų gamybą (Morihiro et al., 2017). Tiriant modifikuotų nukleotidų panaudojimą DNR biosintezei, galima geriau suprasti fundamentalius DNR struktūros reikalavimus ir polimerazėms būdingus dėsningumus (Kropp et al., 2018).

#### 1.3.1 Modifikuoti oligonukleotidai

DNR ir RNR sugeba prisijungti prie įvairių biomolekulių, tokių kaip nukleorūgščių arba baltymų, atpažindamos tam tikrą seką arba struktūrą. Šis specifinis biomolekulės atpažinimas gali slopinti biomolekulės aktyvumą. Todėl nukleorūgštys gali būti geras įrankis gydyti įvairias ligas (Morihiro et al., 2017). Tačiau nemodifikuota linearizuota DNR ar RNR yra jautri nukleazėms ir patekus į ląsteles iš karto degraduoja. Be to, nemodifikuota nukleorūgštys pasižymi prastu giminingumu taikiniams ir didelės dozės gali sukelti šalutinį poveikį (Morihiro et al., 2017). Todėl cheminės modifikacijos būtinos, norint sukurti naudingus nukleorūgščių įrankius. Kseno nukleorūgštys (1.22 pav. D) (angliškai *Xeno nucleic acids*, XNR) yra chemiškai modifikuotų nukleorūgščių analogų grupė su pakeistomis savybėmis, kas leidžia išplėsti nukleorūgščių naudingumą biotechnologijoje ir nanotechnologijoje (Schmidt, 2010; Pinheiro ir Holliger, 2014). Be to, XNR yra svarbios suprasti fundamentalius DNR struktūros reikalavimus ir chemines savybes (Hunter, 2013). Chemines modifikacijas galima prijungti prie nukleobazių, fosfodiesterio arba ribozės. Nukleobazių modifikavimas daro įtaką bazės porų stiprumui ir specifiškumui, o fosfodiesterio modifikavimas gali sustiprinti atsparumą nukleazių aktyvumui ir farmakokinetines savybes (Morihiro et al., 2017). Ribozės modifikavimas (1.22 pav. C) turi didelę įtaką įvairioms nukleorūgščių savybėms, pavyzdžiui, dvigrandininės struktūros formavimui, atsparumui nukleazėms ir toksiškumui ląstelėse ir gyvūnuose (Morihiro et al., 2017). XNR pritaikymas yra platus: aptamerai (Lapa et al., 2016), antiprasminiai oligonukleotidai ir mažos interferuojančios RNR (Andersson et al., 2018).



**1.22 pav. Nukleorūgščių monomerų cheminės struktūros (A) DNR, (B) Spiegelmer, (C) DNR ar RNR su 2' modifikacijomis, (D) XNR.** Pagal Houlihan et al., 2017.



**1.23 pav. Nenatūralių bazių porų struktūros.** A) Dirbtinai išplėtos genetinės abėcėlės pavyzdys (Yang et al., 2007). Nukleobazių poros pasižymi Watson'o ir Crick'o geometrija. Purinai ar purinų analogai (pu) sudaro poras su pirimidiniais ar pirimidinų analogais (py) vandenilinių ryšių dėka. Vandenilinio ryšio akceptorinės (A) ir donorinės grupės (D) išdėstytos nuo didžiojo iki mažojo griovio (pažymėta schemeje). Heterociklai išdėstyti pagal labiausiai tikėtiną vandenilinių ryšių susidarymą. Pagal Yang et al., 2007. B) Nenatūralios bazių poros, susidariusios dėl hidrofobinės sąveikos. Pagal Eremeeva ir Herdewijn, 2018.

Išskyrus keletą retų pavyzdžių (Kreil, 1997), biopolimerai gamtoje yra stereo gryni, susidedantys iš D-nukleotidų arba L-aminorūgščių. Chemiškai susintetinta 174 aminorūgščių dydžio afrikinio kiaulių maro viruso polimerazė iš D-aminorūgščių sugeba katalizuoti L-DNR polimerizaciją, naudodama L-dNTP ir L-DNR pradmens ir matricos substratą (Wang et al., 2016). Naudojant raceminį mišinį, turintį abiejų polimerazių ir substratų sistemas, L- ir D-DNR polimerizacija buvo įmanoma be enantiomerinio užteršimo. D-peptidų sintezės ir cheminio ligavimo būdu buvo paruoštas 352 aminorūgščių *S. solfataricus* DNR polimerazė. Ši polimerazė buvo panaudota geno surinkimui, naudojant PGR ir keturius dalinai komplementarius L-DNR oligonukleotidus (Pech et al., 2016). Autoriai pasiūlė veidrodinio pasaulio gyvybės sukūrimą: ląsteles, galinčias fermentiškai gaminti specifines chiralines mažas molekules ir sukurti veidrodines bakterijas. Šios polimerazės gali būti naudingos gaminti Spiegelmer (1.22 pav. B) (Oberthür et al., 2015). Šie DNR ir RNR aptamerai, susidedantys iš L-nukleorūgščių, nėra atpažįstami imuninės sistemos ir nėra nukleazių substratai, dėl to atsiranda didelis biostabilumas.

Kitas būdas funkcionalizuoti DNR – įvesti trečią bazinę porą šalia natūralių A:T ir G:C porų. Nenatūralios bazių poros turi pasižymėti keliomis savybėmis: turėtų sudaryti stabilią porą su savo partnerio nukleotidu ir išvengti klaidingo poravimosi su natūraliais nukleotidais; pasižymėti termostabilumu, kad atlaikytų PGR procedūrą; gauti modifikuoti biopolimerai turėtų būti tiksliai transkribuojami į RNR su nenatūraliomis bazėmis (Eremeeva ir Herdewijn, 2018). Sukurti keli sėkmingi nenatūralios bazių porų kandidatai, kurie atitinka visus šiuos reikalavimus. Šie kandidatai veikia kaip trečioji bazių pora per alternatyvių vandenilio ryšių susidarymą arba dėl hidrofobinės sąveikos tarp aromatinių heterociklų (1.23 pav.). 5SICS:NaM arba TPT3:NaM (Malyshev et al., 2014; Zhang et al., 2017) ir Ds:Px (Kimoto et al., 2013; Matsunaga et al., 2016) (1.23 pav. B) bazių porų susidarymas pagrįstas hidrofobine ir stekingo sąveikomis. P:Z bazių pora pasižymi pertvarkytu vandenilinių ryšių susidarymu (Yang et al., 2007) (1.23 pav. A). Bazių poros 5SICS:NaM ir TPT3:NaM buvo sėkmingai panaudotos kaip *E. coli* genomo komponentai (Malyshev et al., 2014; Zhang et al., 2017). Sukurtas pusiau sintetinis organizmas gali sėkmingai *in vivo* replikuoti ir transkribuoti TPT3:NaM turinčią DNR į mRNR ir tRNR su atitinkamais nenatūraliais antikodonais, taip pat transliuoti funkcinį GFP su nekanonine aminorūgštimi (Zhang et al., 2017). Kaip bibliotekos komponentas, P:Z nenatūralios bazių poros buvo sėkmingai panaudotas izoliuojant ligandų seriją, atpažįstančią vėžio ląsteles (Sefah et al., 2014;

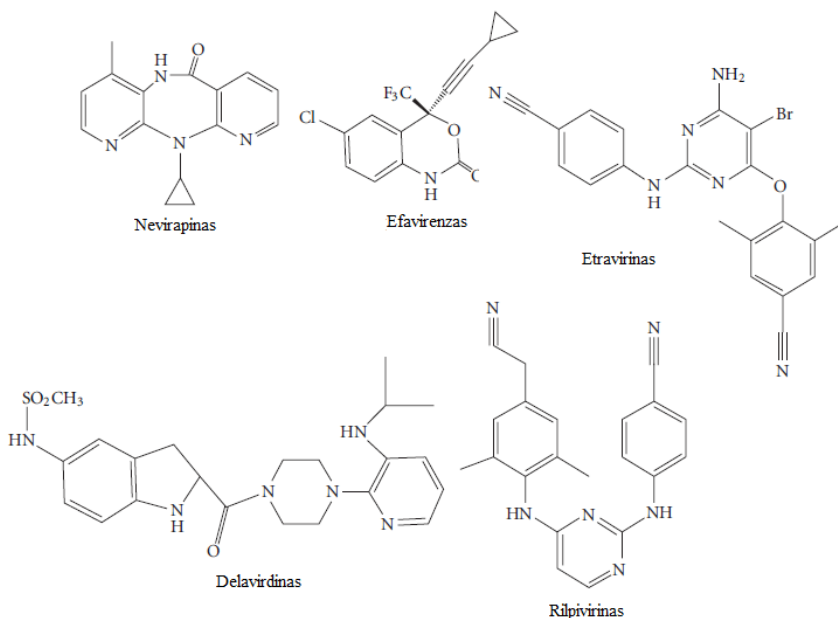
Zhang et al., 2015), arba baltymus (Zhang et al., 2016; Biondi et al., 2016) su nanomoliniu giminingumu, naudojant dirbtinai išplėstą genetinės informacijos sistemą su šešių raidžių abėcėlėmis, A: T: G: C: P: Z. Taip pat izoliuoti didelio giminingumo aptamerai su išplėstine penkių raidžių genetinė abėcėle A: T: G: C: Ds (Kimoto et al., 2013; Matsunaga et al., 2016). Ds turintys aptameriai atpažino žmogaus kraujagyslių endotelio augimo veiksnį, interferoną  $\gamma$  ir von Willebrand veiksnio A domeną, pikomoliniu giminingumu, turėdami iki trijų Ds bazių. Tačiau mažas nenatūralių bazių stabilumas, pavyzdžiui Z su G poros esant dideliame pH, sekos įtaka 5SICS:NaM ir TPT3:NaM ir mažas replikacijos efektyvumas vis dar riboja šių bazių porų panaudojimą *in vivo* (Eremeeva ir Herdewijn, 2018).

### 1.3.2 Atvirkštinių transkriptazių slopikliai

Atvirkštinę transkripciją stabdantys junginiai skirstomi į kelias grupes: NRTI (angl. *nucleoside reverse transcriptase inhibitor*) – nukleozidinius AT slopiklius, NNRTI (angl. *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor*) – nenukleozidinius AT slopiklius ir naujausią AT slopiklių klasę – nukleotidams konkurencinius (angl. *nucleotide-competing*) slopiklius (Menéndez-Arias et al., 2017).

NNRTI yra nekonkurenciniai AT slopikliai, nedidelės molekulinės masės hidrofobiniai junginiai, dažniausiai turintys vieną ar kelis aromatinius žiedus (pav. 1.24). Šie slopikliai jungiasi prie alosterinės vietos, kuri daro įtaką polimerazės aktyvaus centro judrumui ir plastiškumui. NNRTI jungimosi vieta yra 10 Å atstumu nuo polimerazės aktyvaus centro, sudaryta daugiausia iš hidrofobinių aminorūgščių - p66 subvienete: L100, K101, K103, V106, T107, V108, V179, Y181, Y188, V189, G190, F227, W229, L234, Y318, p51 subvienete: E138 (Kohlstaedt et al., 1992; Esnouf et al., 1995). ŽIV-1 AT kompleksų su NNRTI kristalų tyrimas parodė, kad šių slopiklių jungimosi vieta susidaro tik tada, kai prijungiamas NNRTI. Nesant slopiklio, ši struktūra nėra stebima (Ding et al., 1995; Ren et al., 1995; Tantillo et al., 1994). NNRTI veikia skirtingai. Nevirapinas (1.24 pav.) prisijungdamas pakeičia hidrofobinių aminorūgščių Y181 ir Y188 padėtį. Šis prisijungimas pakeičia fermento tretinę struktūrą taip, kad konservatyvus katalizinis YMDD motyvas praranda sąveiką su pradmens galu (Das et al., 2012). NNRTI taip pat gali turėti įtakos sąveikai tarp AT ir nukleorūgščių substrato. Efavirenzas (1.24 pav.) prisirišdamas prisideda prie polimerazės subdomenų atvėrimo ir padidina atstumą tarp ŽIV AT nykščio ir pirštų subdomenų. Tokia konformacija labai sumažina dNTP prisijungimą

(Schauer et al., 2014). NNRTI gali turėti įtakos ir RNazės H aktyvumui. NNRTI slopina (+) DNR grandinės sintezę, bet reikšmingas (-) DNR grandinės sintezės slopinimas nepastebėtas (Grobler et al., 2007).



**1.24 pav. Penkių NNRTI, naudojamų ŽIV-1 infekcijos gydymui, struktūros.** Pagal Esposito et al., 2012.

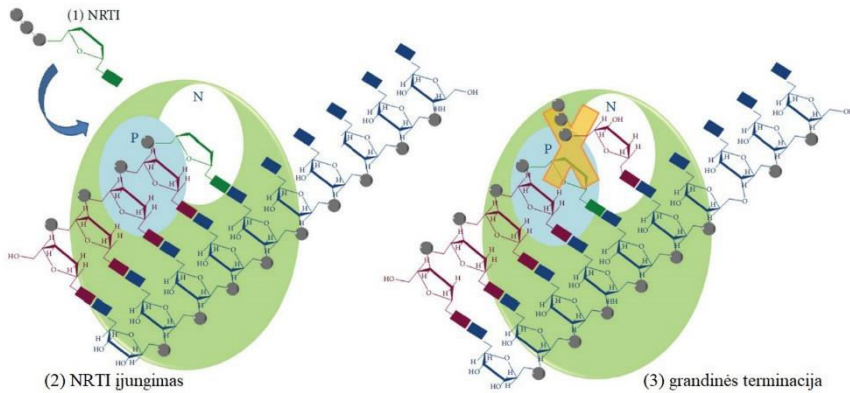
Nukleotidams konkurenciniai slopikliai – nenukleozidiniai junginiai, prisijungiantys DNR polimerazės aktyviajame centre ir konkuruojantys su natūraliais dNTP. Šie junginiai neturi grandinės nutraukimo mechanizmo, todėl fermentinis slopinimas buvo grįžtamasis ir daugumai mutacijų, pakeičiančių NNRTI ir NRTI aktyvumą, neturėjo įtakos (Maga et al., 2010). Šiai klasei tipiški junginiai – indolopiridinonai (Zhang et al., 2006).

### 1.3.3 Nukleozidais paremti atvirkštinių transkriptazių slopikliai

Nukleozidais paremti AT slopikliai imituoja natūralius nukleozidus. Ląstelės viduje nukleozido ar nukleotido analogai turi būti fosforilinti iki trifosfato, kad pasireikštų jų konkurencinis slopinimas. Šie nukleozidais paremti AT slopikliai neturi 3' hidroksi grupės, dėl to juos įvedus į DNR grandinę sintezė blokuojama (1.25 pav.). 2007 metais buvo septyni tokio tipo junginiai, skirti ŽIV-1 teigiamais pacientams gydyti: zidovudinas, stavudinas, didanosinas, lamivudinas, zalcitabinas, abakaviras, emtricitabinas ir tenofoviro disoproksil fumaratas, kuris yra aciklinio



nukleozido fosfonato R-9-(2-fosfonometoksipropil) adenino pirmtakas (1.26 pav.) (Menéndez-Arias, 2008).

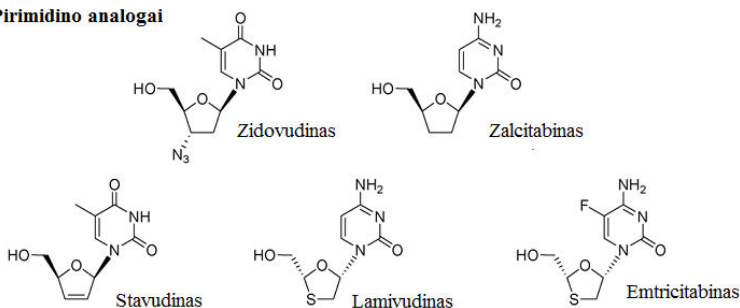


**1.25 pav. AT slopiklių, veikiančių kaip grandinės terminatoriai, veikimo mechanizmo schema.** AT yra pavaizduota kaip šviesiai žalias apskritimas. Pradmens (P) ir nukleotidų (N) surišimo vietos nuspalvintos melsva spalva ir baltai. RNR matrica yra mėlynos spalvos ir DNR pradmuo yra violetinės spalvos. NRTI trifosfatas (žalias) (1) konkuruoja dėl prisijungimo su natūraliais dNTP, jis įjungiamas į augančią DNR (2) ir blokuoja tolesnį DNR pailgėjimą, nes neturi 3' hidroksi grupės (3). Pagal Esposito et al., 2012.

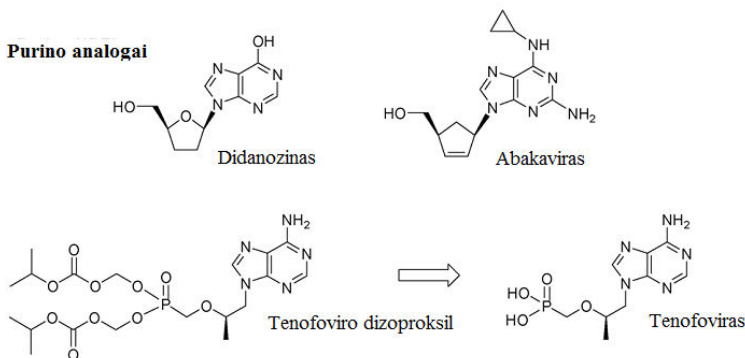
Šių junginių gydomasis veiksmingumas priklauso nuo ląstelių kinazių, kurios juos fosforilina iki trifosfato. Pavyzdžiui, zidovudino ar stavudino fosforilinimo metu susidaro monofosforilinti, difosforilinti ir trifosforilinti tarpiniai junginiai ir visą tai katalizuoja atitinkamai timidino, timidilato ir nukleozido difosfato kinazės (Kakuda, 2000; Schinazi et al., 2006). Zidovudino monofosfatas yra prastas substratas timidilato kinazei ir dėl to sumažėja vaisto poveikis (Furman et al., 1986). Citidino analogų zalcitabino, lamivudino, emtricitabino ir apricitabino vertimą į difosfatų darinius katalizuoja deoksicitidino kinazė ir deoksicitozino monofosfato kinazė, difosfatų darinių vertimą iki trifosfatų atlieka nukleozidų difosfatų kinazės (Kakuda, 2000). Didanosino ir abakaviro atveju purino bazės yra modifikuotos, dėl to galutinis slopiklis būna dideoksiadenosino ir karboviro trifosfatai. Šie metabolitai yra fiziologiškai tinkami substratai ŽIV-1 AT vykdomos DNR polimerizacijos slopinimui (Kakuda, 2000; Schinazi et al., 2006). Karbovir trifosfatai konkuruoja su 2'-deoksiguanozino trifosfatais. Tenofovirus susiformuoja iš tenofoviro dizoproksil fumarato, nes šis junginys yra geriau metabolizuojamas. Tenofovirus jau turi fosfato grupę, tai leidžia praleisti lėtą monofosforilinimo žingsnį ir jis iš karto panaudojamas difosfatų junginių sintezei (De Clercq ir Holý, 2005; Ray et al., 2008).

Tenofoviro fosforilinią katalizuoja deoksiadenino monofosfato kinazė (Merta et al., 1992). Tenofovirus konkuruoja su deoksiadenozino trifosfatu. Kiti veiksniai, turintys įtakos AT slopinimui, yra įsisavinimas, pernešimas, metabolizmas ir įjungimas. Ilgas šių vaistų vartojimas siejamas su šalutiniais poveikiais, tarp kurių yra hiperlaktatemija ir laktinė acidozė, neuropatija, pankreatitas ir pataloginio poodinio riebalinio audinio praradimo sindromas (Nolan ir Mallal, 2004). Dalis šalutinių poveikių susiję su mitochondrinės DNR polimerazės slopinimu (Lewis et al., 2003; Kohler ir Lewis, 2007). Ši polimerazė atsakinga už mitochondrijų DNR replikaciją ir tokiu būdu, slopinant fermentą, pakeičiama mitochondrijų struktūra ir funkcionavimas, kas priveda prie mitochondrijos funkcijų slopinimo.

**Pirimidino analogai**



**Purino analogai**



**1.26 pav. Nukleozidais paremti atvirkštinių transkriptazių slopikliai ir jų cheminės struktūros.** Pagal Cihlar ir Ray, 2010.

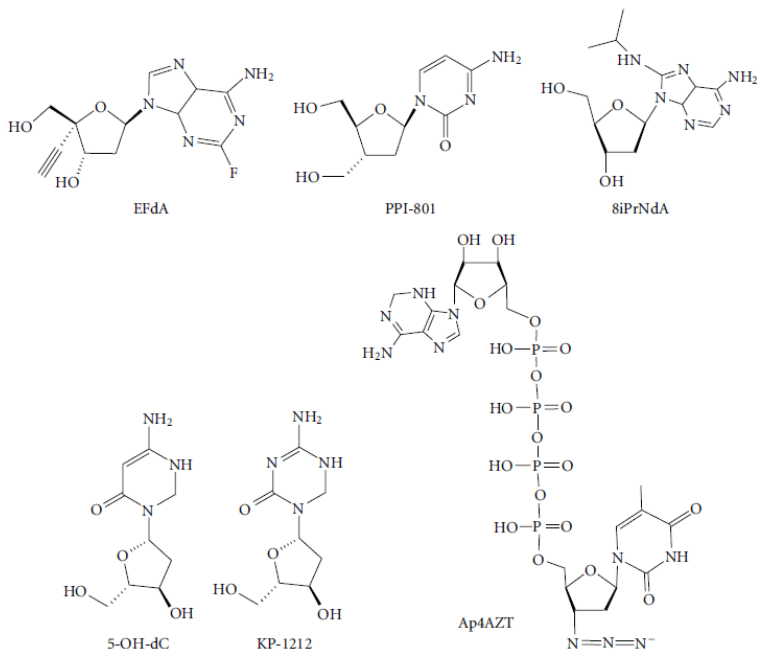
Junginių veiksmingumas iš pat pradžių priklauso nuo patekimo į ląstelę pasyvios difuzijos ar palengvintos pernašos būdu. Pernaša priklauso nuo hidrofiliškumo ir nuo ribotos membranos skvarbos. Tirpinių nešiklių superšeima, turinti apie 300 nešiklių (Hediger et al., 2004; Cass et al., 1999) gali pernešti nukleozidais paremtais AT slopiklius. Tuo pačiu ATP

surišančios kasetės šeimos baltymai sugeba išmesti nukleozidų ir nukleotidų analogus iš ląstelių (Schuetz et al., 1999). Dėl menko specifiškumo virusų užkrečiamoms ląstelėms, įvairių nešiklių ir ATP surišančių kasečių bendro veikimo inkstuose slopikliai gali būti pašalinti iš kūno (Imaoka et al., 2007).

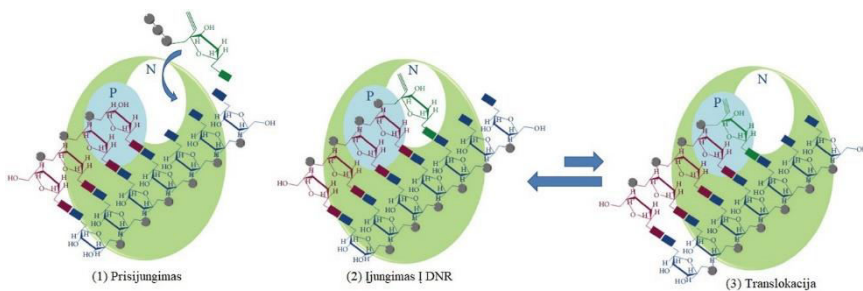
Be defosforilinimo, kai kurie iš šių slopiklių yra papildomai katabolizuojami. Nors zalcitabinas, lamivudinas, emtricitabinas ir tenofoviras nėra pastebimai metabolizuojami ir didžioji dalis dozės aptinkama nepakitusi šlapime, zidovudinas, stavudinas, didanosinas ir abakaviras šalinami kaip metabolitai. Kitaip nei kiti naudojami vaistai, nukleozidais paremti atvirkštinių transkriptazių slopikliai silpnai sąveikauja su citochromu P450 fermentais. Dėl sugebėjimo sudaryti 3' amino grupę turintį junginį, per nespecifinę sąveiką su citochromu P450 ir reduktazėmis, zidovudinas yra vienintelė išimtis (Cretton ir Sommadossi, 1993). Be trifosfatų susidarymo, didanosinas ir stavudinas katabolizuojami ląstelių nukleozidų degradavimo keliuose. Didanosinas ir stavudinas greitai praranda heterociklines bazes depurinacijos ir depirimidacijos metu (Ahluwalia et al., 1987; Cretton et al., 1993). Be to, didanosinas degraduojamas purino nukleozido fosforilazės (Stoeckler et al., 1980). Šie slopikliai taip pat gali dalyvauti įprastuose kataboliniuose keliuose. 74% zidovudino dozės pašalinama šlapime kaip 5'-O-glukuronidas, dėl UDP-glukuronoziltransferazės veikimo (Resetar ir Spector, 1989). Tuo tarpu abakaviras irgi yra metabolizuojamas UDP-glukuronoziltransferazės iki 5'-O-glukuronido. Abakaviro 5' hidroksi grupė atpažįstama alkoholio dehidrogenazės. Šio fermento sukeliama oksidacija ir UDP-glukuronoziltransferazės sukeliama modifikacija tepalieka tik 1.2% nepaveikto abakaviro dozės, aptinkamos šlapime (McDowell et al., 1999).

### **1.3.4 Kitaip veikiantys nukleozidiniai AT slopikliai**

Atsparumą NRTI lemiančios mutacijos gali būti suskirstomos į dvi dideles grupes pagal atsparumo mechanizmą (Meteer et al., 2014). NRTI trifosfatų diskriminacija susidaro, kai ŽIV-1 AT mutacijos padidina atvirkštinės transkriptazės atrankumą gamtiniams dNTP palyginus su NRTI trifosfatu. Kita mutacijų grupė – atsparumo timidino analogams mutacijos, lemiančios modifikuoto nukleotido pašalinimą iš DNR grandinės pirofosforolizės būdu naudojant ATP PP<sub>i</sub> donoru (Meteer et al., 2014). Todėl be grandinės terminuojančių nukleozidų, būtina kurti kitaip veikiančius nukleozidinius AT slopiklius.



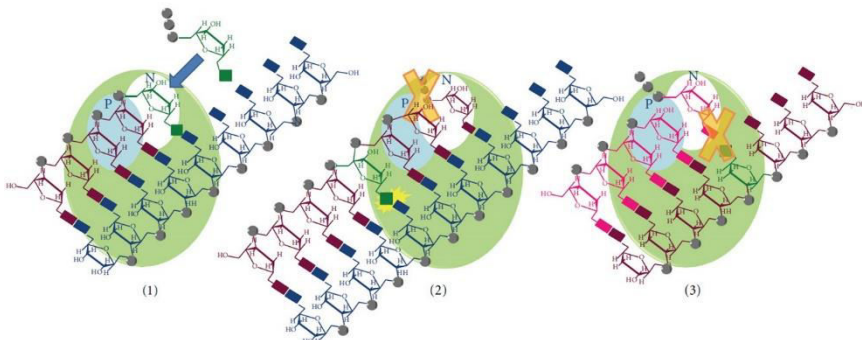
**1.27 pav. Kitaip veikiantis atvirkštinių transkriptazių slopinkliai ir jų cheminės struktūros.** Pagal Esposito et al., 2012.



**1.28 pav. EFdA veikimo mechanizmas.** AT yra pavaizduotas kaip šviesiai žalias apskritimas. Pradmens (P) ir nukleotidų (N) surišimo vietos nuspalvintos mėlsva spalva ir baltai. RNR matrica yra mėlynos spalvos ir DNR pradmuo yra violetinės spalvos. EFdA trifosfatas (žalias) gali būti naudojamas kaip AT substratas (1) ir įjungtas į DNR (2). Įjungtas EFdA blokuoja tolesnę DNR sintezę, nes fermentas nesugeba efektyviai judėti nukleorūgščių substratu (3). Pagal Esposito et al., 2012.

4-etinil-2-fluor-2'-deoksiadenozinas (EFdA) (1.27 pav.) vienas iš nukleozidų analogų, turi 3' hidroksi grupę ir ribozės modifikaciją (Hayakawa et al., 2004). EFdA slopina M184V mutantą ir kai kuriuos atsparesnius vaistams ŽIV-1 mutantus (Kawamoto et al., 2008). AT gali naudoti EfdA trifosfatą kaip substratą, tačiau įjungtas EFdA monofosfatas

blokuoja DNR biosintezę, nes fermentas negali efektyviai judėti matricos atžvilgiu (1.28 pav.) (Michailidis et al., 2009). Molekulinio modeliavimo tyrimai parodė, kad EFdA 4-etinil grupė gali įlysti į hidrofobinę kišenę, sudarytą iš A114, Y215, F160, M184 ir D185 aminorūgščių (Michailidis et al., 2009). Tai gali prisidėti prie AT stabilizavimo prieštranslokacijos būsenoje, nors šioje būsenoje EFdA nukleotidas pašalinamas pirofosforolizės metu. Pirofosforolizės metu susidaręs EFdA trifosfatas greitai vėl įjungimas (Michailidis et al., 2009). Be to, EFdA yra prastas DNR polimerazės  $\gamma$  substratas, o tai nurodo minimalų toksiškumą mitochondrijoms (Sohl et al., 2011).



**1.30 pav. 8iPrNdA veikimo mechanizmas.** AT yra pavaizduotas kaip šviesiai žalias apskritimas. Pradmenys (P) ir nukleotidų (N) surišimo vietos nuspalvintos mėlsva spalva ir baltai. RNR matrica yra mėlynos spalvos ir DNR pradmuo yra violetinės spalvos. 8iPrNdA trifosfatas (žalias) yra įjungiamas į augančią DNR grandinę (1). Po papildomų nukleotidų įjungimų, jo buvimas blokuoja DNR prailginimą, tikriausiai per sterinius trukdžius (geltona) tarp nukleorūgšties ir AT (2). Be to, šio junginio įjungimas taip pat gali blokuoti kitos DNR grandinės sintezę, tikriausiai dėl bazių poravimosi (3). Pagal Esposito et al., 2012.

Kita nukleozidinių AT slopiklių grupė pasižymi grandinės terminacija. Šie junginiai leidžia toliau įjungti dNTP į augančią DNR grandinę, nes turi 3' hidroksi grupę. Tačiau po papildomo nukleotidų įjungimo, jų buvimas blokuoja DNR prailginimą, tikriausiai dėl sterinių trukdžių tarp nukleorūgščių substrato ir AT netoli polimerazės aktyvaus centro. Junginys PPI-801 (1.27 pav.) leidžia įterpti vieną papildomą dNTP, prieš įvykstant grandinės terminacijai (Cihlar ir Ray, 2010). 8iPrNdA (1.27 pav.) yra slopiklis su natūralia deoksiriboze ir modifikacija adenino bazės 8 padėtyje (Vivet-Boudou et al., 2011). Ši modifikacija gali sukelti sterinius trūkščius p66 subvieneto nykščio subdomene, sukeliant uždelstą grandinės nutraukimą. 8iPrNdA, įtrauktas į DNR, sustabdo tolesnę DNR biosintezę po

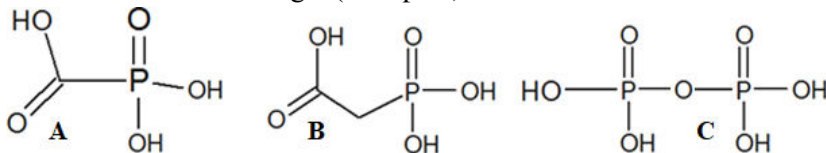
trijų papildomų dNTP įjungimo (1.30 pav.) (Vivet-Boudou et al., 2011). Ši junginių klasė būtų patraukli tuo, kad gali būti aktyvus prieš ŽIV-1 mutantus, kurie gali pašalinti NRTI pirofosforolizės metu.

Kita slopiklių grupė sukelia mirtiną mutageniškumą. Šių junginių įjungimas padidina klaidingų nukleotidų įjungimo dažnį, kuris lemia didelį mutacijos greitį, galiausiai sukelia viruso replikacijos slopinimą. 5-OH-dC (1.27 pav.) yra deoksicitidino analogas, galintis efektyviai sudaryti bazių porą su guanozinu ir adenozino nukleotidais (Loeb et al., 1999). Viruso dauginimosi metu, esant 5-OH-dC, 2,5 karto padidėja G į A pakeitimas ir virusinis užkrečiamumas mažėja bėgant laikui (Loeb et al., 1999). KP-1212 (1.27 pav.) yra deoksicitidino analogas su modifikuota baze ir natūraliu ribozės fragmentu, kuris taip pat gali sudaryti bazių porą su guanozino ir adenozino nukleotidais (Harris et al., 2005). Virusas, auginamas dalyvaujant KP-1212, sukaupia daug mutacijų, kurios galiausiai sustabdo jo replikaciją (Harris et al., 2005). KP-1212 sąveikauja ir su DNR polimeraze  $\gamma$  (Smith et al., 2005), o tai rodo galimą toksiškumą mitochondrijoms, nors ląstelėse jis nebuvo fiksuotas (Harris et al., 2005).

Pagrindinis NRTI atsparumo mechanizmas – nukleotidų pašalinimas pirofosforolizės metu. Šio mechanizmo metu dalyvaujant  $PP_i$  donorui ATP, AT katalizuoja reakciją, dėl kurios susidaro dinukleozido tetrafosfatas ir taip atlaisvina 3' galą tolesniam DNR prailginimui. Ap4AZT (1.27 pav.) dinukleotido AMP dalis skirtingai sąveikauja su *wt* ir vaistams atsparių mutantų AT (Tu et al., 2010). Tai rodo, kad AT gali katalizuoti atvirkštinę reakciją ir atsparumo vaistams mutacijos suformuoja ATP surišimo vietą. Tai galima panaudoti kuriant vaistus, imituojančius dinukleozido tetrafosfatus, ir taip slopinti AT su NRTI atsparumu. Keli dinukleozido tetrafosfatai gali slopinti *wt* AT ir AZT atsparią AT (Meyer et al., 2006). Nors tetrafosfatas išvengia ląstelinės fosforilavimo pakopas, tai yra kliūtis jų stabilumui ir patekimui į ląsteles.

### 1.3.5 Pirofosfato analogai – fosfonoforminė ir fosfonoacto rūgštys

Fosfonoactorūgštis (PAA) ir fosfonoforminė rūgštis (PFA) yra pirofosfato struktūriniai analogai (1.30 pav.).



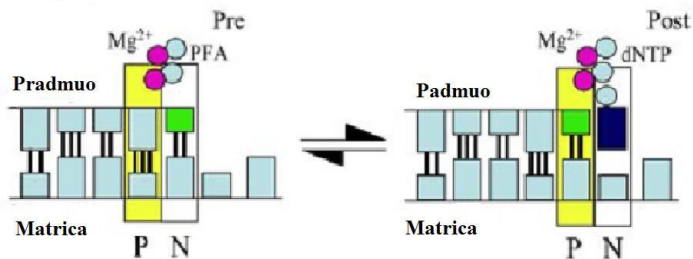
1.30 pav. Fosfonoforminės (A), fosfonoacto rūgšties (B) ir pirofosfato struktūros (C).

Fosfonoacto rūgštis pasižymi antivirusiniu aktyvumu prieš *Herpesviridae* narius (Overby et al., 1977), o fosfonoforminė rūgštis pažymi plačiu antivirusiniu aktyvumu prieš įvairius *Herpesviridae* ir *Retroviridae* narius (Öberg, 1982). Fosfonoforminė rūgštis naudojama gydant susirgimus, kuriuos sukelia herpes simpleks virusas 1 ir 2, žmogaus citomegalovirusas ir kiti giminingi herpesvirusai, kai įprasti gydymo būdai neveikia (De Clercq, 2004). Šalutinis poveikis ir prastas biologinis pateikimas į ląsteles apriboja įgytu imunodeficito sindromu sergančių pacientų gydymą. Nepaisant šių problemų, PFA kartais naudojamas gydyti pacientus, kurie infekuoti kelių vaistų atsparumą turinčiais ŽIV-1 mutantais, kai kiti gydymo būdai nebetinka (Mathiesen et al., 2004). Vienintelis šio vaisto privalumas yra mažas ŽIV atsparumo susidarymas. Mutacijos, susijusios su nukleozidais paremtų ir nenukleozidinių atvirkštinių transkriptazių slopiklių atsparumu, neturi įtakos PFA slopinimui (Meyer et al., 2003; Tachedjian et al., 1995). Mutacijos, susijusios su PFA atsparumu, kaip tik padidina zidovudino poveikį (Tachedjian et al., 1996). Biocheminiai tyrimai parodė, kad su PFA atsparumu susijusios mutacijos sumažina fosforolizę, kuri leidžia pašalinti grandinės terminatorių zidovudiną (Meyer et al., 2003; Arion et al., 2000). ŽIV-1 AT laukinis tipas sugeba pašalinti zidovudiną esant pirofosfatui (Rigourd et al., 2000) arba ATP (Meyer et al., 1998).

Stacionarios būsenos kinetiniai tyrimai su retrovirusų AT ir herpes simpleks viruso, cytomegaloviruso DNR polimerazėmis rodo nekonkurencinį DNR sintezės slopinimą dNTP atžvilgiu (Öberg, 1982; Tchesnokov et al., 2006). Priešingai, PFA konkurentiškai slopina pirofosforolizę ir pirofosfato pakeitimo reakcijas. Tai rodo, kad PFA ir pirofosfato surišimo vietos persidengia (Derse et al., 1982). Vieno nukleotido įjungimo metu pirofosfatas susidaro susiformuojant naujam fosfodiesteriniui ryšiui (Hsieh et al., 1993). Norint prijungti kitą komplementarų nukleotidą, reikia iš komplekso pašalinti pirofosfatą. Fermentas turi pereiti per vieną matricos poziciją pirmyn, kad atlaisvintų nukleotido surišimo vietą. Tokio judėjimo metu pradmens 3' galas atsiranda produkto vietoje (Sarafianos et al., 2002). Ši būseną vadinama posttranslokacine būseną. Pirofosforolizė ir nuo ATP priklausomas nukleotidų pašalinimas gali įvykti pretranslokacinėje būsenoje (Sarafianos et al., 2003; Marchand ir Gotte, 2003). Dėl PFA nekonkurencinio slopinimo, PFA tikriausiai sugeba prisijungti prie pretranslokacinio komplekso (Meyer et al., 2003). Tai patvirtina tyrimai, kurių metu didelė PFA koncentracija sugeba pašalinti įjungtą zidovudino monofosfatą (Cruchaga et al., 2006).

Galimi du slopinimo mechanizmai (Marchand et al., 2006). Pirmuoju mechanizmo atveju kompleksas prieš nukleotido prisijungimą ir įjungimą būna daugiausia pretranslokacijos būsenoje. PFA prisijungimas sulaiko kompleksą šioje būsenoje (1.31 pav.), dėl to nukleotido prisijungimas neįmanomas. Šiose sąlygose toks slopinimas yra konkurencinis. Be to, kito nukleotido prisijungimas yra sumažėjęs dėl iš anksto egzistuojančių pretranslokacijos kompleksų ir riboti dNTP kiekiai sukelia būdingus ŽIV-1 AT sustojimus. Taip tuo pačiu metu vykstantis PFA ir dNTP prisijungimas prie šio komplekso pretranslokacinėje būsenoje neįmanomas (Marchand et al., 2006). Antrasis mechanizmas bando paaiškinti, kodėl tam tikromis sąlygomis PFA pasireiškia nekonkurencinis slopinimas (Öberg, 1982; Tchesnokov et al., 2006). Po PFA atpalaidavimo, nukleotidai yra tolygiai įvedami į DNR grandinę ir translokacijos pusiausvyra pasiekama ties kita pozicija. Polinkis pretranslokacijos būsenai leidžia prijungti PFA, kuris stabilizuoja kompleksą (Marchand et al., 2006). Taip susiformavęs nekonkurencinis slopinimas pasireiškia sumažinta nukleotidų apykaita. Tai paaiškina, kodėl stacionarios būsenos sąlygomis, kai įvedama daug nukleotidų, DNR sintezės metu pasireiškia nekonkurencinis slopinimas.

PFA prisijungimas



**1.31 pav. PFA slopinimo schema.** PFA prisijungimas sulaiko pretranslokacinį kompleksą (pažymėta Pre) šioje būsenoje, dėl to nukleotido prisijungimas neįmanomas. Nukleotidas gali prisijungti posttranslokacinėje būsenoje (Post). Šiose sąlygose PFA slopinimas yra konkurencinis. PFA (melsva spalva) prisijungia aktyviajame centre prie kataliziškai svarbių magnio jonų (violetinė spalva). P – pradmens surišimo vieta, N – nukleotidų surišimo vieta. Pagal Marchand et al., 2006.



## 2 MEŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Prietaisai, reagentai ir medžiagos

#### 2.1.1 Naudoti prietaisai

- analitinės svarstyklės „SCALTEC“;
- autoklavas „Sanyo“;
- baltymų elektroforezės aparatas „BIO-RAD Protean mini“ ir jo priedai;
- DNR elektroforezės aparatas „Sigma-Aldrich“ ir jo priedai;
- elektroforezės aparatas „BIO-RAD Protean™ II“ ir jo priedai;
- fotovaizdintuvas „FUJIFILM FLA-5100“ ir jo priedai; ekranas „FUJIFILM BAS GAUGE 2040“;
- magnetinė maišyklė „HANNA instruments HI 190M“;
- metalų chelatinės chromatografijos kolonėlė su sefarozės sorbentu, turinčiu įmobilizuotų Ni<sup>2+</sup> jonų;
- mikrobiologinis boksas „Fatron Lf“;
- pH-metras „HANNA instruments HI 9321“;
- spektrofotometras „Eppendorf BioPhotometer“;
- šaldoma mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“;
- šildoma vandens purtyklė „GFL 1083“;
- termostatas „BT 120“;
- ultragarso šaltinis „Sonics Vibra cell“;
- UV/RŠ šaltinis su gelių dokumentavimo sistema „BIO-RAD Gel Doc XR+“;
- vakuuminė gelių džiovyklė;
- vandeninis termostatas „Julabo“.

## 2.1.2 Reagentai

Applichem GMBH, Vokietija: agarozė, kalcio chlorido dihidratas, glicerolis, glicinas, Tris, karbamidas;

Carl Roth GmbH, Vokietija: amonio peroksi disulfatas, EDTA, imidazolas, natrio lauril sulfatas, magnio chlorido heksahidratas, ličio chloridas, Triton X100, TEMED, chloramfenikolis, etidžio bromidas, fenilmetilsulfonilo fluoridas,  $\beta$ -merkaptoetanolis, kanamicino sulfatas, Rotiphorese® Gel40, Rotiphorese® Gel30, ampicilinas, IPTG, formamidas;

Merck KGaA, Vokietija: 2-propanolis, ledinė acto rūgštis, boro rūgštis, chloroformas, 37% druskos rūgštis, monokalio fosfatas, natrio acetato trihidratas, natrio chloridas, natrio hidroksidas;

Chempur, Vokietija: metanolis;

Sigma-Aldrich, Vokietija: bromfenolio mėlio-ksileno cianolio dažų mišinys, fosfonoacto rūgštis, fosfonoforminės rūgšties natrio druska, Whatman® 3MM;

Thermo Fisher, Lietuva: Depc vanduo, 6X Orange Loading Dye, O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, restrikcijos endonukleazės: DraI, EcoRV; T4 polinukleotidų kinazė, Klenow  $exo^-$  polimerazė, Taq polimerazė, BSA standartiniai tirpalai, dTTP, pirofosfotazė;

Vilniaus degtinė, Lietuva: etanolis 96%;

Perkin Elmer, JAV:  $^{33}P$ - $\gamma$ ATP;

Liofilchem, Italija: peptonas, mielių ekstraktas;

Metabion, Vokietija: oligonukleotidai.

Biochemijos institutas, Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyrius, VU GMC: piridoniniai nukleozidai, piridoniniai nukleotidai, PA5T, PA5TT, PAT, 5 aminoalil-dUTP, pirofosfatas.

Ferak Berlin, Vokietija: Coomassie Brilliant Blue R-250.

## 2.1.3 Buferiai, tirpalai ir terpės

„Na“: 5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl;

„Ca“: 5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM CaCl<sub>2</sub>;

2x TE: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM EDTA, pH 8,0;

1x TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8,0;

NaOH/SDS: 1 % SDS, 0,2 M NaOH;

3 M NaAc, pH 7,0;

10 M LiCl: 4,24 g LiCl ištirpinama dejonizuotame vandenyje ir skiedžiama iki 10 mL bendro tūrio;

1x TAE (pH 8,3) 0,04 M Tris-Ac, 0,02 M EDTA;

Etidžio bromido tirpalas: 10 mg/mL etidžio bromido tirpalas vandenyje, prieš naudojimą skiedžiamas 10000 kartų;

LB terpė: 10 g peptono, 5 g mielių ekstrakto, 5 g NaCl ištirpinta vandenyje ir skiedžiama iki 1 L bendro tūrio. Autoklavuota 15 min. 120 °C;

Agarizuota LB terpė: „FastMedia™ M9-CA Agar“ kaitinant ištirpinama steriliame vandenyje pagal gamintojo protokolą;

Ampicilino tirpalas: 50 mg/mL ampicilino vandeninis tirpalas;

1 M IPTG: 0,238 g IPTG ištirpinama dejonizuotame vandenyje ir skiedžiama iki 10 mL bendro tūrio. Laikoma -20 °C;

100x PMSF tirpalas: 100 mM fenilmetilsulfonilo fluorida 96% etanolyje;

Lizės buferis: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM imidazolo, 10 % glicerolio;

Praplovimo buferis: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM imidazolo, 10 % glicerolio, 1 % Triton X-100, prieš pat naudojimą pridedama 10 mM β-merkaptotanolio;

Eliucijos buferiai: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 % glicerolio, 1 % Triton X-100, prieš pat naudojant pridedama 10 mM β-merkaptotanolio ir nuo 50 mM iki 500 mM imidazolo;

EDTA eliucijos buferis: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 % glicerolio, 1 % Triton X-100, prieš pat naudojant pridedama 10 mM β-merkaptotanolio ir 100 mM EDTA (pH 8,0);

Dializės buferis: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8,0), 100 mM NaCl, 0,1 % Triton X100, 50 % glicerolio, prieš pat naudojant pridedama 10 mM β-merkaptotanolio;

1,5 M TRIS-HCl/SDS (pH 8,8): 1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8;

0,5 M TRIS-HCl/SDS (pH 6,8): 0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8;

10 % APS: 0,5 g APS ištirpinama minimaliame dejonizuotame vandens tūryje ir skiedžiama iki 5 mL dejonizuotu vandeniu. Laikoma +4 °C;

5x baltymų dažas: 0.313 M Tris-HCl (pH 6.8), 10 % SDS, 0.14 % bromfenolio mėlio ir ksileno cianolio, 50% glicerolio;

20x DTT tirpalas: 2 M DTT;

1x glicino–SDS–TRIS-HCl buferinis tirpalas: 25 mM Tris, 192 mM glicino, 0,1 % SDS, pH 8.3;

Coomasie Brilliant Blue tirpalas: 1,5 g Coomasie Brilliant Blue R-250 ištirpinta 225 mL metanolio, sumaišyta su 50 mL acto rūgšties ir 225 mL dejonizuoto vandens;

10 % glicerolio tirpalas: 10 mL glicerolio sumaišyta su 90 mL dejonizuotu vandeniu;

0,5 M EDTA: 0,5 M EDTA, pH 8,0;

Nukleorūgščių elektroforezės 15% poliakrilamidinio gelio tirpalas: 1x TBE buferiu Rotiphorese® Gel40 (19:1) praskiestas iki 15 %, su 8 M karbamido, 89 mM Tris, 89 mM boro rūgštis, 2 mM EDTA;

1x TBE elektroforezės buferinis tirpalas: 89 mM Tris, 89 mM boro rūgštis, 2 mM EDTA;

45 mM TB elektroforezės buferinis tirpalas: 45 mM Tris, 45 mM boro rūgštis;

Nukleorūgščių elektroforezės 8% poliakrilamidinio gelio tirpalas: 1x TBE buferiu Rotiphorese® Gel40 (37,5:1) praskiestas iki 8 %, 45 mM Tris, 45 mM boro rūgštis;

Nukleorūgščių elektroforezės 12% poliakrilamidinio gelio tirpalas: 1x TBE buferiu Rotiphorese® Gel40 (19:1) praskiestas iki 12 %, 45 mM Tris, 45 mM boro rūgštis;

Nukleorūgščių elektroforezės 4% poliakrilamidinio gelio tirpalas: 1x TBE buferiu Rotiphorese® Gel40 (37,5:1) praskiestas iki 4 %, 45 mM Tris, 45 mM boro rūgštis;

STOP tirpalas: 95 % formamido, 0.060 % bromfenolio mėlio ir ksileno cianolio, 25 mM EDTA;

10 % acto rūgštis tirpalas: 100 mL acto rūgštis sumaišyta su 900 mL dejonizuoto vandens;

10x reakcijos buferis A T4 polinukleotidų kinazei: 500 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM magnio chlorido, 50 mM DTT, 1 mM spermidino;

Glutamatinis buferis: 20 mM natrio glutamato (pH 8,2), 10 mM DTT, 0.5 % Triton X-100, 20 mM NaCl, prieš naudojimą pridedamas reikiamas kiekis divalenčių metalų druskų (MgCl<sub>2</sub> arba MnSO<sub>4</sub>);

Tris-acetatinis buferis: 33 mM Tris-acetatas (pH 7,9), 66 mM kalio acetatas, 0,1 mg/mL BSA, prieš naudojimą pridedamas reikiamas kiekis divalenčių metalų druskų (MgCl<sub>2</sub> arba MnSO<sub>4</sub>);

Baltymų elektroforezės poliakrilamidinis gelis:

1) 8 % apatinis frakcionuojantis gelis (10,0 mL):

2,7 mL Rotiphorese® Gel30;

2,5 mL 1,5 M TRIS-HCl/SDS (pH 8,8);

4,73 mL dejonizuoto vandens;

100 µL 10 % APS;

20 µL TEMED;

2) 4 % viršutinis koncentruojantis gelis (5 mL):

0,7 mL Rotiphorese® Gel30;

1,25 mL 0,5 M TRIS-HCl/SDS (pH 6,8);

3 mL dejonizuoto vandens;

25 µL 10 % APS;

20 µL TEMED.

### 2.1.4 Bakterijų kamienai

Plazmidinės DNR padauginimui naudotas *E. coli* DH10B, kurio genotipas *F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ*;

Rekombinantinių baltymų raiškai ir gryninimui naudotas *E. coli* BL21 (DE3), kurio genotipas *dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal*. Dėl ląstelės chromosomoje esančio λ profago, BL21 (DE3) kamieno ląstelės savo chromosomoje turi IPTG indukuojamą T7 RNR polimerazės geną. Susintetinta T7 RNR polimerazė jungiasi prie raiškos vektoriaus T7 promotoriaus ir pradedama rekombinantinio baltymo sintezė.

### 2.1.5 Plazmidės

phisMLV: pET pagrindu sukonstruota plazmidė, turinti rekombinantinį M.MuLV atvirkštinės transkriptazės geną, kuris N gale turi polihistidino uodegą, o šio geno raiška reguliuojama T7 promotoriumi ir lac operatoriumi. Plazmidė koduoja atsparumo ampicilinui geną *Amp<sup>R</sup>* ir represorių koduojantį *lacI* geną.

pHIVRT-Prot plazmidė koduoja rekombinantinį ŽIV-1 atvirkštinės transkriptazės p66 subvieneto geną su polihistidino fragmentu N-gale, o šio geno raiška reguliuojama T7 promotoriumi ir lac operatoriumi. Plazmidė koduoja atsparumo ampicilinui geną *Amp<sup>R</sup>* ir represorių koduojantį *lacI* geną. Plazmidėje yra ir konstitutyviai sintetinos ŽIV-1 proteazės genas. Proteazė suskaido dalį susintetinto p66 baltymo ir susidaro antrasis ŽIV-1 AT subvienetas p51.

### 2.1.6 DNR pradmenys ir matricos

Pradmenys: T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGGAGA 3';

T7-PrA488: 5' TAAT(A488)ACGACTCACTATAGGGAGA 3'.

Matricos:

T7-mA: 5'CCGGAATTTAAATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3';

T7-mT: 5'CCGGTTAATTTTTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3';

T7-mG: 5'TTAAGGCCGGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3';

T7-mC: 5'TTAACCGCCCCCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3';

T7Tm: 5'GGTTAACCAAAATCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3';

T7Am: 5'CTCAAACCTTTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA3' .

DNR substratai: T7/mA T7 hibridizuojamas su T7-mA, T7/mT T7 su T7-mT, T7/mG T7 su T7-mG, T7/mC T7 su T7-mC, T7/A T7 su T7Tm, T7/T T7 su T7Am.

Fluorescencinė žymė Atto488 yra prijungta prie T7-PrA488 pradmens ketvirtuo nukleotido, dT nuo 5' DNR galo. T7-PrA488 hibridizuojamas su T7-mA, gaunamas T7A/mA DNR substratas.

## 2.2 Tyrimo metodai

### 2.2.1 Bakterijų cheminė transformacija

Į stiklinį uždengiamą mikrobiologinį mėgintuvėlį įpilama 5 mL skystos LB terpės. Laikoma šildomoje vandens purtyklėje 37 °C (purtymas 250 – 300 rpm), užsėjama *E. coli* bakterijų ir paliekama per naktį (apie 16 val.). Iš stacionarią augimo fazę pasiekusios bakterijų kultūros imama po 50 µl suspensijos ir pilama į mėgintuvėlius su 5 mL skystos LB terpės ir laikoma šildomoje vandens purtyklėje apie 2,5 val (purtymas 250 – 300 rpm). Perpilama į mėgintuvėlius, pritaikytus centrifugavimui. Centrifuguojama 3000 g 5 min +4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas ir nuosėdos suspenduojamos atšaldytame „Na“ tirpale, kurio pilama 2,5 mL. Dar kartą centrifuguojama 3000 g 5 min +4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas ir nuosėdos suspenduojamos atšaldytame „Ca“ tirpale, kurio pilama 2,5 mL. Laikoma 0 °C temperatūroje 30 min. Centrifuguojama 3000 g 3 min +4 °C temperatūroje. Nupilamas supernatantas, paliekant jo virš nuosėdų apie 200 µl. Nuosėdos suspenduojamos ir išpilstomos į ependorfinius mėgintuvėlius po 50 µl. Į kiekvieną mėgintuvėlį pridedama po 1 µL – 5 µL plazmidinės DNR tirpalo ir suspenduojama. Laikoma 0 °C temperatūroje 1 val. Temperatūriniam šokui 2 min mėgintuvėliai laikomi vandens vonioje, 42 °C temperatūroje. Po to dar 2 min. laikoma 0 °C temperatūroje. Į mėgintuvėlius pripilama 1 mL skystos LB terpės. Inkubuojama 1 val. 37 °C temperatūroje nepurtant. Į Petri lėkšteles, padengtas agarizuota LB M9-CA terpe, įpilama 100 µl 50 mg/mL ampicilino tirpalo tolygiai paskleidžiant. Jam susigėrus, lėkštelėse užsėjama po 40 µl bakterijų suspensijos, padengiant per visą terpės paviršių. Jai susigėrus, užsėjama likusi sukonzentruotos bakterijų suspensijos dalis (suspensija sukonzentruojama centrifuguojant, po to nupylus didžiąją dalį supernatanto ir suspenduojama), padengiant ja dalį lėkštelės. Lėkšteles inkubuojame per naktį 37 °C temperatūroje, kol užauga 1 mm skersmens kolonijos, kurias galima atskirti. Kelios pavienės kolonijos persėjamos į naujas analogiškas lėkšteles ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje.

Užaugusios bakterijų kultūros analizuojamos iš karto arba laikomos 4 °C temperatūroje.

### **2.2.2 Plazmidinės DNR išskyrimas iš *E. coli***

*E. coli* bakterijos, augintos 50 mL LB terpėje, perpilamos į centrifuginį mėgintuvėlį ir centrifuguojamos 3000 g 5 min. 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas ir bakterijų masė užpilama 6 mL 2x TE. Ląstelės suspenduojamos. Ant ląstelių suspensijos užpilama 12 mL SDS/NaOH tirpalo ir švelniai sumaišoma. Užpilama 9 mL 3 M NaAc (pH 7). Švelniai sumaišoma. Inkubuojama 30 min 4 °C temperatūroje. Centrifuguojama 15000 g 15 min. 4 °C temperatūroje. Supernatantas perpilamas į 50 mL centrifuginį mėgintuvėlį su 20 mL 2-propanoliu. Centrifuguojama 15000 g 15 min. 4 °C temperatūroje. Nupilamas supernatantas. Nuosėdos užpilamos 5 mL 75 % EtOH, praplaunamos ir skystis nupilamas. Nuosėdos džiovinamos kambario temperatūroje, kol nesijaučia etanolio kvapo. Užpilama du kartus po 800 µL 1x TE, nuosėdos praplaunamos ir perkeliamos į 1,5 mL ependorfinius mėgintuvėlius su 800 µL 10 M LiCl. Inkubuojama -20 °C temperatūroje 30 min. Centrifuguojama 20000 g 15 min. Supernatantas dalinamas po 800 µL ir perkeliamas 1,5 mL ependorfinius mėgintuvėlius su 800 µL 2-propanolio. Centrifuguojama 20000 g 20 min. Nupilamas supernatantas. Įpilama 0,5 mL 75% EtOH tirpalo. Nuosėdos praplaunamos ir skystis nupilamas, džiovinama, kol nesijaučia etanolio kvapo. Įpilama 25 µL vandens arba 1x TE ir nuosėdos ištirpinamos. DNR saugoma -20 °C temperatūroje.

### **2.2.3 Mažų plazmidinės DNR kiekių išskyrimas**

Nuo persėtos kolonijos, užaugusios Petri lėkštelėje, kilpele paimtas biomasės kiekis suspenduojamas 100 µL 1x TE. Į suspensiją įpilama 200 µL NaOH/SDS tirpalo ir švelniai suspenduojama. Po to įpilama 150 µL 3 M NaAc (pH 7,5). Švelniai suspenduojama. Įpilama 200 µL chloroformo ir suplakama. Centrifuguojama 20000 g 10 min. Nusiurbiamas vandeninė fazė ir perkeliama į tokį pat tūrį izopropanolio ir sumaišoma. Centrifuguojama 20000 g 10 min. Nupilamas supernatantas, nuosėdos užpilamos 75% EtOH tirpalu. Centrifuguojama 20000 g 10 min. Nupilamas supernatantas ir nuosėdos išdžiovinamos. Nuosėdos užpilamos 20 µL H<sub>2</sub>O arba 1x TE. DNR saugoma -20 °C temperatūroje.

## 2.2.4 Plazmidinės DNR ir DNR fragmentų elektroforetinis frakcionavimas agaroziniame gelyje

Paruošiamas 0,8 % agarozės gelis 1x TAE DNR elektroforezės buferiniame tirpale. DNR mėginiai sumaišomi su 6x Orange Loading Dye ir užnešama ant gelio. Šalia mėginių užnešami 2  $\mu$ L DNR molekulinio dydžio standartas (O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix). Elektroforezė vykdoma 10 min, esant 50 V įtampai, po to 120 V. Naudojamas 1x TAE DNR elektroforezės buferinis tirpalas. Orange G dažui, kuris yra 6x Orange Loading Dye buferyje, pasiekus gelio galą, elektroforezė nutraukiama. Gelis pamerkiamas etidžio bromido tirpale apie 20 min, praplaunamas distiliuotu vandeniu ir analizuojamas naudojant UV/WL šaltinį su gelių dokumentavimo sistema.

## 2.2.5 ŽIV-1 ir M.MuLV AT gryninimas iš *E. coli*

*E. coli* BL21 (DE3), transformuotos atitinkama plazmide, auginamos 5 mL LB terpėje su atitinkamu antibiotiku šildomoje vandens purtyklėje 37 °C (purtymas 250 – 300 rpm) per naktį. Užaugusios bakterijos su terpe perpilamos į kūginę kolbą su 400 mL LB su atitinkamu antibiotiku ir tokiomis pat sąlygomis auginamos iki optinio tankio ( $OD_{600}$ ) 0,6 - 0,8. Pasiėkus tinkamą optinį tankį, kolba su bakterijų mase atvėsinama iki kambario temperatūros, paimama 1 mL bakterijų suspensijos baltymų sudėties palyginimui ir į kolbą su bakterijų suspensija įlašinama 60  $\mu$ L 1 M IPTG tirpalo. Toliau bakterijos auginamos kambario temperatūroje per naktį. Po to paimama 0,5 mL bakterijų suspensijos baltymų sudėties palyginimui ir likusi biomasė surenkama 5 min centrifuguojant 4000 g 4 °C temperatūroje. Nupylus supernatantą, šlapia bakterijų biomasė užpilama 15 mL lizės buferiu ir ląstelės suspenduojamos. Po to įpilama 150  $\mu$ L 100x PMSF tirpalo ir 9,1  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptopetanolio ir švelniai sumaišoma. Ląstelės ardomos ultragarsu keturis kartus po 1 min, darant 1 – 2 min pertrauką, esant apie 25% vibracijos amplitudei. Lizatas centrifuguojamas 12000 g 1 val. 4 °C temperatūroje. Paruošta chromatografinė kolonėlė su  $Ni^{+2}$  jonais nulygsvarinama 2 mL lizės buferio. Į kolonėlę supilamas visas lizato supernatantas. Surenkamas išbėgęs mėginys. Po to pilama 5 mL praplovimo buferio; eliucijos buferiai su didėjančia imidazolo koncentracija (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM) ir EDTA eliucijos buferiu. Visi mėginiai laikomi 4 °C temperatūroje. Paimami eliucijų mėginiai (po 25  $\mu$ L iš frakcijos), lizato (5  $\mu$ L iš frakcijos) ir bakterijų biomasės (prieš ir po indukcijos), sumaišomi su 10  $\mu$ L 5x baltymų dažų, 2,5  $\mu$ L 20x DTT tirpalu ir



pridedama vandens iki bendro 50  $\mu\text{L}$  tūrio. Mėginiai kaitinami 95 °C temperatūroje 5 min. Atliekama baltymų elektroforezė. Gelis dažomas ir plaunamas. Pagal baltymų pasiskirstymą frakcijose pasirenkamos eliucijos frakcijos su didžiausiu ir gryniausiu rekombinantinio baltymo kiekiu, perkeliamos į dializės mėgintuvėlius, kurie panardinami į dializės buferį 4 °C temperatūroje parai. Po to rekombinantinių baltymų tirpalai perkeliama į 1,5 mL mėgintuvėlius ir saugomi -20 °C temperatūroje.

### **2.2.6 Baltymų elektroforetinis frakcionavimas**

Baltymų elektroforezė vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis natrio dodecilsulfato turinčiame poliakrilamido gelyje. Apatinis frakcionuojantis gelio tirpalas pilamas tarp švariai nuvalytų dviejų elektroforezės stiklų, paliekant apie 1,5 cm atstumą nuo jų viršaus. Užpilama distiliuotu vandeniu. Geliui sustingus, distiliuotas vanduo nupilamas. Pilamas viršutinio gelio tirpalas iki elektroforezės stiklų viršaus ir įstatomos „šukutės“. Viršutiniam geliui sustingus, stiklai su geliu statomi į elektroforezės aparatą, aparato blokas užpilamas 1x glicino–SDS–TRIS–HCl baltymų elektroforezės buferiniu tirpalu ir išimamos „šukutės“. Į susidariusius gelio šulinėlius įnešami baltymų standartinių dydžių žymenys ir mėginiai. Elektroforezė vykdoma, esant 200 V įtampos srovei, kol dažo linija pasiekia frakcionuojančio gelio apačią.

### **2.2.7 Baltymų akrilamidinio gelio dažymas**

Pasibaigus elektroforezei, baltymų akrilamidinis gelis atskiriamas nuo stiklų ir pamerkiamas į distiliuotą vandenį. Vanduo su geliu kaitinamas mikrobangų krosnelėje 5 min, po to vanduo nupilamas ir gelis užpilamas Coomassie Brilliant Blue tirpalu, trumpai pašildoma mikrobangų krosnelėje ir purtoma 15 min. Po to Coomassie Brilliant Blue tirpalas nupilamas, ir gelis plaunamas karštu vandeniu, kol nublunka fonas. Gelis perkeliamas į 10 % glicerolio tirpalą ir purtomas 10 min. Po to gelis nuskenuojamas, prilipinamas prie Whatman® 3MM popieriaus, padengiamas polietileno plėvele ir džiovinamas vakuuminėje gelių džiovyklėje.

### **2.2.8 Baltymų kiekio nustatymas**

Iš rekombinantinių baltymų tirpalo paimamas mėginys ir sumaišoma su 20  $\mu\text{L}$  5x baltymų dažų, 5  $\mu\text{L}$  20x DTT tirpalu, užpilama vandeniu iki 100  $\mu\text{L}$  tūrio. Paruošiamas BSA mėginys iš BSA kiekio standartų su 20  $\mu\text{L}$  5x

baltymų dažų, 5 µL 20x DTT tirpalu ir užpilama vandeniu iki 100 µL tūrio. Mėginiai kaitinami 95 °C temperatūroje 5 min. Mėginiai užnešami į gelį taip, kad būtų galima iš BSA kiekio standartų gelyje nustatyti signalo intensyvumo priklausomybę nuo baltymo kiekio mėginyje. Užnešami keli skirtingo kiekio BSA mėginiai, rekombinantinio baltymo mėginiai ir baltymų standartinių dydžių žymuo. Elektroforezė vykdoma, esant 200 V įtampai, kol dažo linija pasiekia frakcionuojančio gelio apačią. Baltymų akrilamidinis gelis dažomas ir išplaunamas dažų pertekliu. Gelis nuskenuojamas ir paruošiamas džiovinimui. Gelyje esančio baltymų Coomassie Brilliant Blue R-250 komplekso signalo dydis nustatomas densitometriškai panaudojant *Optiquant* programą. Naudojant *Microsoft Office 2010 Excel* programą iš gautų BSA mėginių nustatoma signalo – baltymo kiekio priklausomybė ir pagal ją apskaičiuojamas rekombinantinių baltymų kiekis gelyje, koncentracija mėginiuose ir rekombinantinių baltymų tirpaluose. Nustačius koncentraciją, paruošiami reakcijoms naudojami fermentų tirpalai, kurie gaminami praskiedžiant rekombinantinių baltymų tirpalus dializės buferiu ir pridėdant β-merkaptioetanolio tiek, kad jo koncentracija būtų 10 mM. Fermentų tirpalai laikomi -20 °C temperatūroje.

## 2.2.9 Fosfato grupės su <sup>33</sup>P įvedimas į 5' DNR pradmenis

Paruošiamas reakcijos mišinys (T7\*):

2 µL 10x reakcijos buferio A T4 polinukleotidų kinazei

1 µL 10 u/µL T4 polinukleotidų kinazės

6 µL 3,3 µM <sup>33</sup>P-γATP

2 µL 10 µM T7

9 µL vandens

Reakcija vykdoma 37 °C temperatūroje 20 min. Po to į reakcijos mišinį pridedama 1 µL 0,5 M EDTA ir kaitinama 80 °C temperatūroje 10 min. Naudojama iš karto arba saugoma -20 °C temperatūroje.

### 2.2.10 DNR substratų paruošimas

Paruošiamas hibridizacijos mišinys (100 nM DNR substrato):

10 µL T7\* oligonukleotidas arba T7A oligonukleotidas

1,2 µL 10 µM norimos matricos

88,8 µL vandens

Kaitinama 95 °C temperatūroje 3 min. ir po to lėtai atvėsinama iki kambario temperatūros. Druskos pašalinamos pagal gamintojo protokolą naudojant *Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting Columns 7K MWCO* nudruskinimo kolonėlę.

### **2.2.11 DNR pradmens prailginimo reakcijos**

Reakcijos mišinio sudėtis: fermento koncentracija nuo 10 iki 50 nM, DNR substrato koncentracija nuo 5 iki 10 nM, atitinkama nukleozidų, nukleotidų ar slopiklių koncentracija nuo 0,1 μM iki 10 mM. Jei naudojamas glutamatinis buferis, papildomai pridedama MgCl<sub>2</sub> iki 1 mM, jei naudojamas tris-acetatinis buferis, papildomai pridedama MnSO<sub>4</sub> nuo 0,1 mM Klenow exo- iki 1 mM M.MuLV AT. Reakcijos vykdomos 5÷60 min 37 °C temperatūroje. Jei mėginiai naudojami natyviame PAGE, jie iš karto leidžiami į gelį; jei denatūruojančiam PAGE, stabdomi STOP tirpalu santykiu 1:1 ir kaitinami 95°C temperatūroje 5 min prieš užnešant 5 gelį.

### **2.2.12 DNR fragmentų elektroforetinis frakcionavimas akrilamidiniame gelyje, denatūruojančiomis sąlygomis, vizualizacija ir analizė**

DNR fragmentų elektroforezė vykdoma denatūruojančiomis sąlygomis, esant 8 M karbamido poliakrilamido gelyje. Į 15 mL 15% gelio tirpalą įpilama 150 μL 10 % APS tirpalo ir 15 μL TEMED tirpalo, sumaišoma, gelio tirpalas pilamas tarp švariai nuvalytų dviejų elektroforezės stiklų ir įstatomos „šukutės“. Geliui sustingus, stiklai su geliu statomi į elektroforezės aparatą, aparato blokas užpilamas 1x TBE elektroforezės buferiniu tirpalu ir išimamos „šukutės“. Į susidariusius gelio šulinėlius įnešama bromfenolio mėlio ir ksileno cianolo dažų mišinio ir 20 min vykdoma elektroforezė, esant 600 V įtampai. Po to įnešami DNR mėginiai ir 30 min vykdoma elektroforezė esant 200 V įtampai, o toliau - 600 V įtampai, kol dažo linija pasiekia gelio apačią.

Jei mėginių substratai žymėti radioaktyvia žyme, elektroforezei pasibaigus gelis 15 min mirkomas 10 % acto rūgšties tirpale ir 15 min plaunamas po tekančio vandens srove. Po to gelis prilipinamas prie Whatman® 3MM popieriaus ir kita gelio pusė padengiama polietileno plėvele. Toks gelis džiovinamas vakuuminėje gelių džiovyklėje. Geliui išdžiūvus, gelis autoradiografuojamas specialaus Fujifilm ekrano pagalba, o rezultatai vizualizuojami fotovaizdintuvu Fujifilm FLA-5100 naudojant raudoną lazerį. Jei mėginiai nėra radioaktyvūs, tai gelis 10 min mirkomas vandenyje. Gelis skenuojamas fotovaizdintuvu Fujifilm FLA-5100 naudojant

mėlyną lazerį. Kiekvieno DNR produkto signalas įvertinamas densitometriškai, *Optiquant* programa. Pagal gautus rezultatus, naudojant *Microsoft Office 2010 Excel* programą nustatomas santykinis nukleotidų įjungimas kiekvienam DNR produktui.

### 2.2.13 Sustabdyto elektroforetinio judrumo poslinkio analizė

DNR fragmentų elektroforezė natyviomis sąlygomis vykdoma 8 % poliakrilamido gelyje, skirta įvertinti Klenow exo- ir DNR substrato kompleksus. Į 15 mL 8 % gelio tirpalą įpilama 150 µL 10 % APS tirpalo ir 15 µL TEMED tirpalo, sumaišoma, gelio tirpalas pilamas tarp švariai nuvalytų dviejų elektroforezės stiklų ir įstatomos „šukutės“. Geliui sustingus, stiklai su geliu statomi į elektroforezės aparatą, aparato blokas užpilamas 45 mM TB elektroforezės buferiniu tirpalu ir išimamos „šukutės“. 20 min vykdoma elektroforezė, esant 150 V įtampai. Po to esant 20 V įtampa įnešami DNR mėginiai ir 30 min vykdoma elektroforezė esant 100 V įtampai, o toliau 2 valandas esant 150 V įtampai.

DNR fragmentų elektroforezė vykdoma natyviomis sąlygomis 12 % poliakrilamido gelyje, skirta įvertinti ŽIV-1 AT ir DNR substrato kompleksus. Į 15 mL 12 % gelio tirpalą įpilama 100 µL 10 % APS tirpalo ir 10 µL TEMED tirpalo, sumaišoma, gelio tirpalas pilamas tarp švariai nuvalytų dviejų elektroforezės stiklų, paliekant apie 1 cm atstumą nuo jų viršaus. Užpilama distiliuotu vandeniu. Geliui sustingus, distiliuotas vanduo nupilamas. Pilamas 4% poliakrilamidinio gelio tirpalas, kurio 3 mL yra sumaišyta su 30 µL 10 % APS tirpalo ir 3 µL TEMED tirpalo, iki elektroforezės stiklų viršaus ir įstatomos „šukutės“. Geliui sustingus, stiklai statomi į elektroforezės aparatą, aparato blokas užpilamas 45 mM TB elektroforezės buferiniu tirpalu ir išimamos „šukutės“. 20 min vykdoma elektroforezė, esant 150 V įtampai. Po to įnešami DNR mėginiai esant 20 V įtampa ir 30 min vykdoma elektroforezė esant 100 V įtampai, o toliau 6 valandas esant 200 V įtampai.

Jei mėginių substratai žymėti radioaktyvia žyme, elektroforezei pasibaigus gelis 15 min mirkomas 10 % acto rūgšties tirpale ir 15 min plaunamas po tekančio vandens srove. Po to gelis prilipinamas prie Whatman® 3MM popieriaus ir kita gelio pusė padengiama polietileno plėvele. Toks gelis džiovinamas vakuuminėje gelių džiovyklėje. Geliui išdžiūvus, gelis autoradiografuojamas specialaus Fujifilm ekrano pagalba, o rezultatai vizualizuojami fotovaizdintuvu Fujifilm FLA-5100 naudojant raudoną lazerį. Jei mėginiai nėra radioaktyvūs, tai gelis 10 min mirkomas vandenyje. Gelis skenuojamas fotovaizdintuvu Fujifilm FLA-5100 naudojant

mėlyną lazerį. Kiekvieno DNR produkto signalas įvertinamas densitometriškai, *Optiquant* programa. Pagal gautus rezultatus, naudojant *Microsoft Office 2010 Excel* programą nustatomas santykinis nukleotidų įjungimas kiekvienam DNR produktui.

### 3 REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Nukleotidų modifikacijų tyrimai plačiai paplitę sintetinės biologijos, genetinio kodo praplėtimo tyrimų srityje (Eremeeva ir Herdewijn, 2018), epitranskriptomos tyrimuose (Palumbo ir Beal, 2018) ir modifikuotų oligonukleotidų gamyboje (Morihiro et al., 2017). Pirmieji modifikuoti nukleotidai sukurti prieš pusę amžiaus ir naudoti kaip antivėžiniai ar antivirusiniai preparatai įvairių polimerazių slopinimui (Jordheim et al., 2013). Tiriant modifikuotų nukleotidų panaudojimą DNR biosintezei, galima geriau suprasti fundamentalias DNR struktūros savybes ir polimerazėms būdingus dėsningumus (Kropp et al., 2018).

Retrovirusai pasižymi unikalia virusinės reprodukcijos strategija, atvirkštinę transkriptazę naudojant DNR biosintezei iš virusinės RNR. Šių retrovirusų atvirkštinės transkriptazės pasižymi kitomis biocheminėmis savybėmis nei šeimininko replikacinės polimerazės. Sugebėjimas išnaudoti šių polimerazių savybes leistų kurti slopiklius, nukreiptus prieš virusines polimerazes, bet neturinčius didelės įtakos šeimininko polimerazėms. Tuo pačiu, šių polimerazių gebėjimas panaudoti kitokios struktūros nukleotidus leistų sintetinti Kseno nukleorūgštis su pakeistomis savybėmis, kas leidžia išplėsti nukleorūgščių naudingumą biotechnologijoje ir nanotechnologijoje (Schmidt, 2010; Pinheiro ir Holliger, 2014).

ŽIV-1 atvirkštinė transkriptazė yra svarbiausias antivirusinio gydymo taikynys. Atvirkštinę transkripciją stabdantys junginiai skirstomi į kelias grupes: nukleozidinius AT slopiklius, nenukleozidinius AT slopiklius ir naujausią AT slopiklių klasę – nukleotidams konkurencinius slopiklius (Menéndez-Arias et al., 2017). NRTI ir NNRTI sudaro labai efektyvaus antiretrovirusinio gydymo pagrindą (Lu et al., 2018). Nauji vaistai turi būti reguliariai įtraukiami į prieinamų vaistų rinkinį, kad pacientai nepatirtų nepageidaujamo šalutinio poveikio (Lewis et al., 2003; Kohler ir Lewis, 2007) ar nesusidarytų viruso atsparumas vaistams (Meteer et al., 2014). Naujų junginių paieška nuolat vyksta, naudojant kitokius struktūrinius junginius, kaip piridoninius NNRTI (Medina-Franco et al., 2007; Debnath et al., 2013) arba nukleotidus su modifikuotomis bazėmis (Cihlar ir Ray, 2010; Vivet-Boudou et al., 2011; Loeb et al., 1999; Harris et al., 2005). Kitas būdas yra sujungti skirtingus slopiklius į vieną molekulę (Velazquez et al., 1995; Renoud-Grappin et al., 1998; Pontikis et al., 2000) ir tikėtis geresnio efektyvumo slopinti AT.

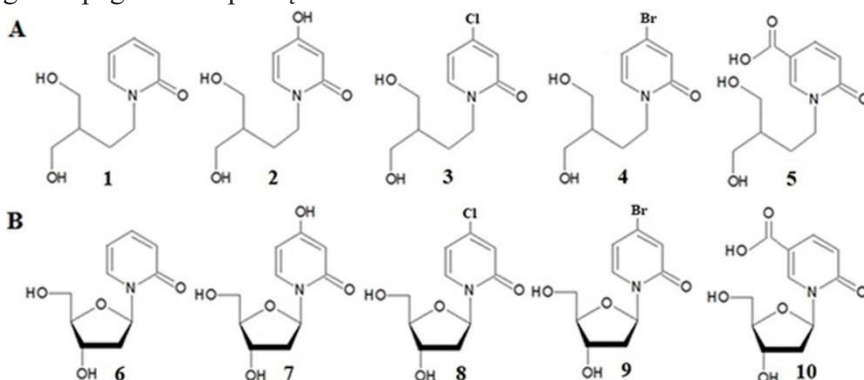
M.MuLV AT atstovauja grupę monomerinių retrovirusų atvirkštinių transkriptazių (Hizi ir Herschhorn, 2008) ir nors struktūriškai panaši į ŽIV-1 AT (Coté ir Roth, 2008), pasižymi kitomis biocheminėmis savybėmis.

Klenow *exo*- ir Taq DNR polimerazės priklauso A šeimai (Braithwaite ir Ito, 1993), kas leidtų įvertinti potencialių virusinių slopiklių specifiskumą.

Šioje disertacijoje aptariamas ciklinių ir neciklinių piridoninių nukleozidų, kurie struktūriškai panašūs į piridoninius NNRTI (Medina-Franco et al., 2007; Debnath et al., 2013), panaudojamas DNR polimerazių slopiklių vaidmenyje. Taip pat tirtas piridoninių nukleotidų alternatyvaus bazių poravimosi potencialo panaudojimas DNR biosintezėje ir šių junginių pritaikymas. Mes taip pat sutelkėme dėmesį į fosfonoacto rūgšties nukleotidų konjugatus, sukurtus taip, kad pasireikštų veikimo mechanizmu paremtas slopinimas DNR polimerazėms.

### 3.1 DNR biosintezės slopinimo piridoniniais nukleozidais tyrimas

Tirti įvairūs piridoniniai junginiai, kurie turi neciklinę grandinę (3.1 pav. A) arba deoksiribozę (3.1 pav. B). Šie junginiai struktūriškai panašūs į piridoninius NNRTI (Medina-Franco et al., 2007; Debnath et al., 2013). Tikimasi, kad tiriami junginiai slopins AT ir bus galima panaudoti šiuos junginius pagrindu slopiklių kūrimui.



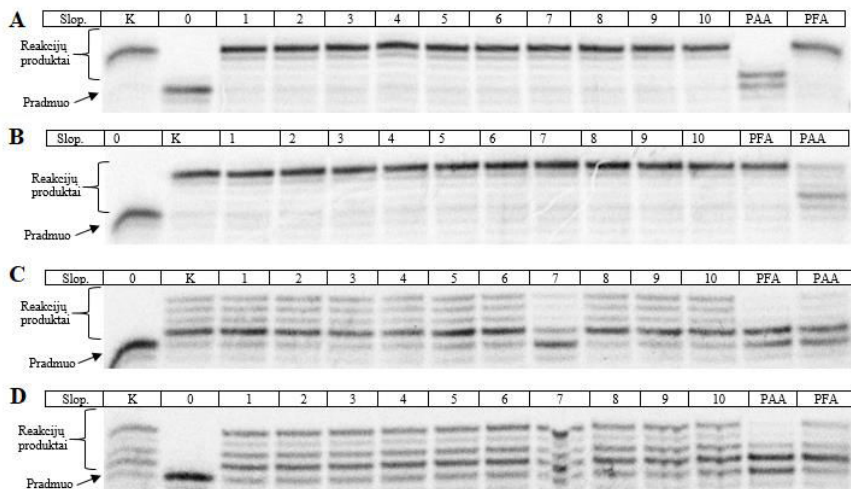
**3.1 pav. Piridoninėmis bazėmis ir necikline angliavandens grandine turinčių junginių struktūros schema (A) ir piridoninėmis bazėmis turinčių nukleozidų struktūros schema (B).**

Įvertintas šių junginių sugebėjimas slopinti M.MuLV AT ir Klenow *exo*- DNR biosintezę. Eksperimentams naudotas dTTP įjungimui tirti skirtas DNR substratas T7/A (3.2 pav.) ir 0,1  $\mu\text{M}$  dTTP bei iki 1 mM piridoninių junginių koncentracija. Taip pat naudota PAA (1 mM) ir PFA (10  $\mu\text{M}$ ) kaip teigiamos kontrolės slopinimo įvertimui. Reakcijos atliktos, naudojant skirtingus reakcijos buferinius tirpalus: M.MuLV AT glutamatinis buferis su 1 mM  $\text{MgCl}_2$  ir tris-acetatinis buferis su 1 mM  $\text{MnSO}_4$ , Klenow *exo*- atveju naudoti glutamatinis buferis su 1 mM  $\text{MgCl}_2$  ir tris-acetatinis buferis su 0,1

mM MnSO<sub>4</sub> (Mikalkėnas, 2014). Tris-acetatinis buferis yra plačiai naudojamas, jis tinka ir DNR polimerazėms. Glutamatinis buferis yra alternatyvus DNR polimerazėms, naudojamas, kad padidintų DNR polimerazių sąveiką su DNR substratu (Deredge et al., 2010). Naudojant tokią sistemą, galima komplementariai įjungti iki 4 timidino nukleotidų. Deja, nė vienu tirtu atveju nepastebėtas reikšmingo dTTP įjungimo į DNR slopinimo (3.3 pav.), išskyrus junginį 7, kuris sugeba silpnai slopinti M.MuLV AT esant tris-acetatiniam buferiui su 1 mM MnSO<sub>4</sub> (3.3 pav. C dalis) palyginus su PAA ir PFA sąlygotu fermentų slopinimu.

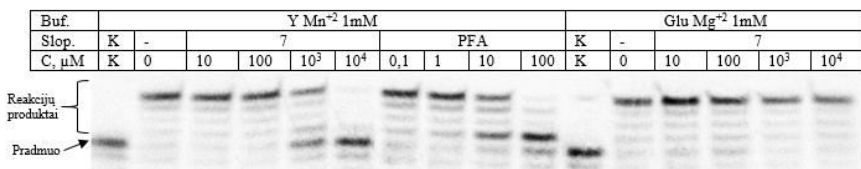
T7/A  
 5' \*TAATACGACTCACTATAGGGAGA  
 3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTAAAACCAATTGG

**3.2 pav. DNR substratas T7/A naudotas nukleotidų įjungimo tyrimams.** Pradmens 5' gale (pažymėta žvaigždute), įvesta fosfato grupė su <sup>33</sup>P.



**3.3 pav. Pradmens prailginimo reakcijos su piridoniniais junginiais gelio nuotrauka.** (A) Klenow exo- katalizuojama reakcija tris-acetatiname buferyje su 0,1 mM MnSO<sub>4</sub>, (B) Klenow exo- katalizuojama reakcija glutamatiname buferyje su 1mM MgCl<sub>2</sub>, (C) M.MuLV AT katalizuojama reakcija tris-acetatiname buferyje su 1 mM MnSO<sub>4</sub>, (D) M.MuLV AT katalizuojama reakcija glutamatiname buferyje su 1mM MgCl<sub>2</sub>. Virš gelio nuotraukos lentelė, kurioje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: atitinkamas piridoninis junginys (3.1 pav.), PFA ar PAA, K – nėra slopiklio.





**3.4 pav. M.MuLV AT katalizuojamos pradmens prailginimo reakcijos gelio nuotrauka.** Reakcijos atliktos tris-acetatiniame buferyje su 1 mM MnSO<sub>4</sub> arba glutamatiniame buferyje su 1mM MgCl<sub>2</sub>. Virš gelio nuotraukos lentelė, kurioje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: buferinis tirpalas, junginys 7 ir PFA koncentracijos, K – nėra slopiklio.

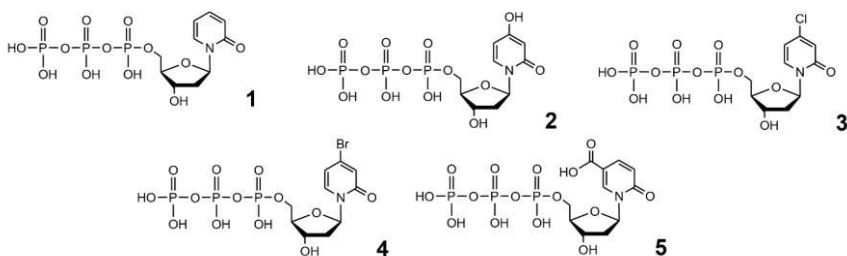
Buvo nuspręsta detaliau ištirti junginio 7 sąlygotą slopinimą. Tam buvo pakeistos sąlygos: naudota 1 μM dTTP, junginio 7 koncentracija nuo 10 μM iki 10 mM, PFA koncentracija nuo 100 nM iki 100 μM. dTTP įjungimo į DNR slopinimas (3.4 pav.) stebimas nuo 1 mM junginio 7, kai PFA slopina nuo 10 μM. PFA slopina M.MuLV AT apie 100 kartų efektyviau nei junginys 7. Junginys 7 (4-hidroksi 2-piridono deoksiribozidas) geba slopinti M.MuLV AT, kai reakcijos mišinyje yra buferis su mangano jonais, bet slopinimas nėra stebimas esant buferiui su magnio jonais. Tai leidžia manyti, kad M.MuLV AT, esant buferiui su mangano jonais, struktūros pasikeitimą, kas leidžia slopikliui prisijungti prie fermento. Vis dėlto slopinimas yra per silpnas, palyginus su PFA, tad šį junginį būtina papildomai modifikuoti, kad slopinimo efektyvumas padidėtų.

### 3.2 Piridoninių nukleotidų panaudojimo DNR biosintezei tyrimas

Po piridoninių nukleozidų tyrimo buvo susidomėta, ar šių junginių trifosfatai veikia kaip AT slopikliai. Tam buvo paruošti penki skirtingi piridoniniai nukleotidai (3.5 pav.).

Kadangi tirtų nukleotidų nukleobazių struktūra skiriasi nuo pirimidininių nukleotidų (3.5 pav.) ir Watson'o ir Crick'o bazių poros gali nesusidaryti, buvo parinkti du skirtingi DNR substratai, kurie leistų įvertinti piridoninių nukleotidų įjungimą prieš pirimidinus ar purinus (3.6 pav.). Naudojant DNR substratą T7/A atliktos pradmens prailginimo reakcijos: Klenow exo- ir M.MuLV AT su 100 μM tiriamų piridoninių nukleotidų ir naudojant glutamatinį buferį su 1 mM MgCl<sub>2</sub> (3.7 pav. A ir B dalys). Buvo pastebėtas pradmens degradavimas su tiriamais piridoniniais nukleotidais, tik junginys 3 pasižymėjo mažesniu pradmens degradavimu ir buvo stebėtas pradmens prailginimas. Klenow exo- ir M.MuLV AT neturi 3'–5' egzonukleazės aktyvumo, tad pačios DNR polimerazės nesugeba hidrolizuoti pradmens. Kontroliniame mėginyje, kuriame yra visos

reakcijos sudėtinės dalys, išskyrus DNR polimerazę ir tiriamus piridoninius nukleotidus, pradmens degradavimas nebuvo pastebėtas. Pradmuo degradavo, kai į reakcijos mišinį vietoj nukleotidų buvo įdėta 100 μM pirofosfato. Dėl to kilo įtarimas, kad piridoniniai nukleotidai yra užteršti pirofosfatu, kuris per DNR polimerazių katalizuojamą pirofosforolizę sukelia stebimą pradmens degradavimą. Ši problema buvo išspręsta panaudojant fermentą pirofosfatazę, kuri hidrolizuoja pirofosfatą iki fosfato. Prieš pridėdant į reakcijos mišinį DNR polimerazę ir DNR substratą, mėginiai su piridoniniais nukleotidais veikiami su pirofosfotaze (0,1 μL į 10 μL bendrą reakcijos mišinį, 60 min kambario temperatūroje). Po to pridėjus į reakcijos mišinį DNR polimerazę ir DNR substratą, įvykdytos pradmens prailginimo reakcijos (3.7 pav. A ir B dalys). Iš gautų rezultatų stebimas piridoninių nukleotidų įjungimas ir nestebimas pradmens degradavimas. Tolimesnėse reakcijose su piridoniniais nukleotidais visuomet prieš pridėdant į reakcijos mišinį DNR polimerazę ir DNR substratą, mėginiai su piridoniniais nukleotidais buvo veikiami su pirofosfataze.



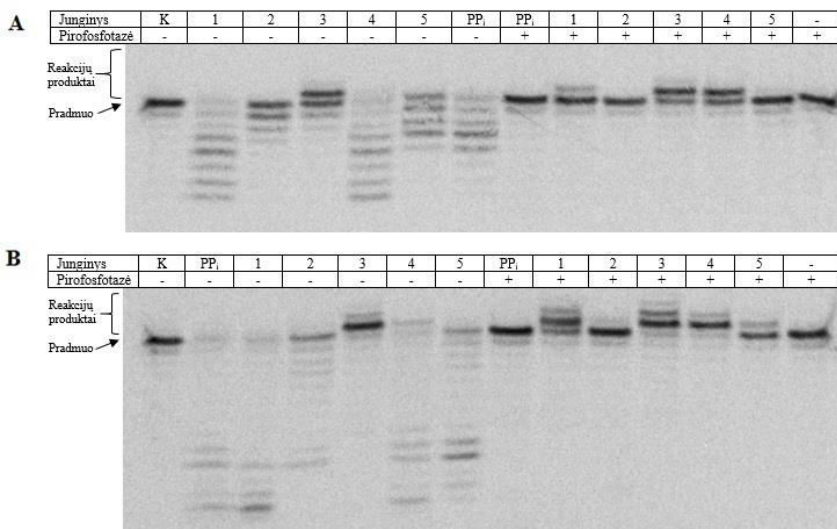
### 3.5 pav. Piridoninių nukleotidų struktūros. Junginiai:

- 1 – 3-hidroksi-5-(2-okso-1-piridil)tetrahidrofuran-2-il)metil trifosfatas,
- 2 – 3-hidroksi-5-(4- hidroksi-2-okso-1- piridil)tetrahidrofuran-2-il)metil trifosfatas,
- 3 – 3-hidroksi-5-(4-chloro-2-okso-1-piridil)tetrahidrofuran-2-il)metil trifosfatas,
- 4 – 3-hidroksi-5-(4-bromo-2-okso-1-piridil)tetrahidrofuran-2-il)metil trifosfatas,
- 5 – 3-hidroksi-5-(5-karboksi-2-okso-1-piridil)tetrahidrofuran-2-il)metil trifosfatas.

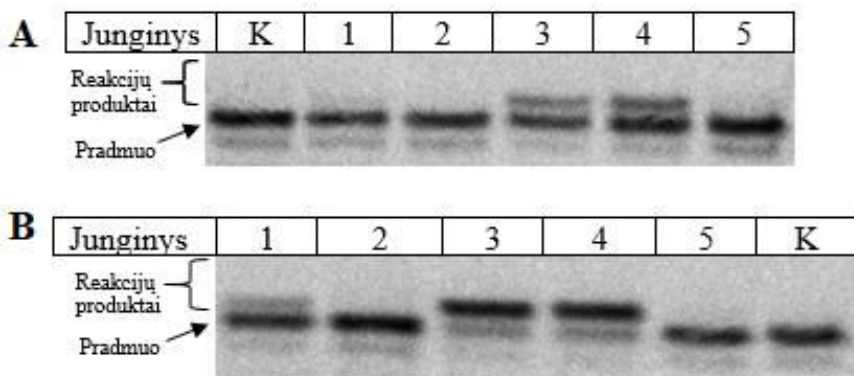
T7/A  
 5' \*TAATACGACTCACTATAGGGAGA  
 3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTAAAACCAATTGG

T7/T  
 5' \*TAATACGACTCACTATAGGGAGA  
 3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTTTCAAAACTC

**3.6 pav. T7/A ir T7/T DNR substratai, naudoti piridoninių nukleotidų įjungimo tyrimams. Pradmens 5' gale (pažymėta žvaigždute) įvesta fosfato grupė su <sup>33</sup>P.**



**3.7 pav. Pradmens prailginimo reakcijos naudojant DNR substratą T7/A su piridoniniais nukleotidais. (A) M.MuLV AT katalizuojama reakcija, (B) Klenow exo- katalizuojama reakcija. Reakcijos atliktos su 100 μM tiriamų piridoninių nukleotidų ir naudojant glutamatinį buferį su 1 mM MgCl<sub>2</sub> ir vyko 5 min. Virš gelio nuotraukos lentelėje pateikta DNR biosintezėje dalyvaujančio piridoninio nukleotido numeris (3.5 pav.). Kontrolinis mėginys, kuriame yra visos reakcijos sudėtinės dalys, išskyrus DNR polimerazę, pirofosfatazę ir tiriamus piridoninius nukleotidus, pažymėtas K.**



**3.8 pav. Pradmens prailginimo reakcijos naudojant DNR substratą T7/T su piridoniniais nukleotidais.** (A) M.MuLV AT katalizuojama reakcija, (B) Klenow exo- katalizuojama reakcija. Reakcijos atliktos su 100  $\mu$ M tiriamų piridoninių nukleotidų ir naudojant glutamatinį buferį su 1 mM  $MgCl_2$  ir vyko 5 min. Virš gelio nuotraukos lentelėje pateikta DNR biosintezėje dalyvaujantį piridoninio nukleotido numeris (3.5 pav.). Kontrolinis mėginys, kuriame yra visos reakcijos sudėtinės dalys, išskyrus DNR polimerazę ir tiriamus piridoninius nukleotidus, pažymėtas K.

Išsprendus pirofosfato užteršimo problemą, buvo galima analizuoti piridoninių junginių panaudojimą DNR biosintezėje. Pradmens prailginimo reakcijose, naudojant DNR substratą T7/A su M.MuLV AT (3.7 pav. A dalis) ir Klenow exo- (3.7 pav. B dalis) stebimas šių junginių įjungimas. M.MuLV AT sugeba panaudoti junginius **1**, **3**, **4**, o junginio **2** produktas nestebimas. Junginio **5** produkto signalas yra silpnas, ir stebimas pakartojus reakcijas (duomenys nerodomi). Kiekvieno junginio įjungimas yra labai skirtingas, efektyviausiai įjungiami **3** ir **4** junginiai. Tuo tarpu Klenow exo- sugeba panaudoti visus junginius labai skirtingu efektyvumu, efektyviausiai įjungiami junginiai **1**, **3** ir **4**, kai junginiai **2** ir **5** įjungiami silpniausiai.

Siekiant įvertinti piridoninių junginių specifiškumą ir atrankumą prieš purinus DNR biosintezėje, pradmens prailginimo reakcijos buvo atliktos naudojant kitą DNR substratą T7/T. Atliktos pradmens prailginimo reakcijos su M.MuLV AT (3.8 pav. A dalis) ir Klenow exo- (3.8 pav. B dalis) esant 100  $\mu$ M tiriamų piridoninių nukleotidų. Su šiuo DNR substratu M.MuLV AT sugebėjo panaudoti tik junginius **3** ir **4**, o junginių **1**, **2** ir **5** įjungimas į DNR pradmenį nėra stebimas. Klenow exo- sugebėjo panaudoti tik junginius **1**, **3** ir **4**, o junginių **2** ir **5** įjungimas į DNR pradmenį nėra stebimas. Junginiai **1**, **3** ir **4** įjungiami tik vieną kartą ir antras įjungimas nėra stebimas.

T7/mA  
5' \*TAATACGACTCACTATAGGGAGA  
3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTAAAATTAAGGCC

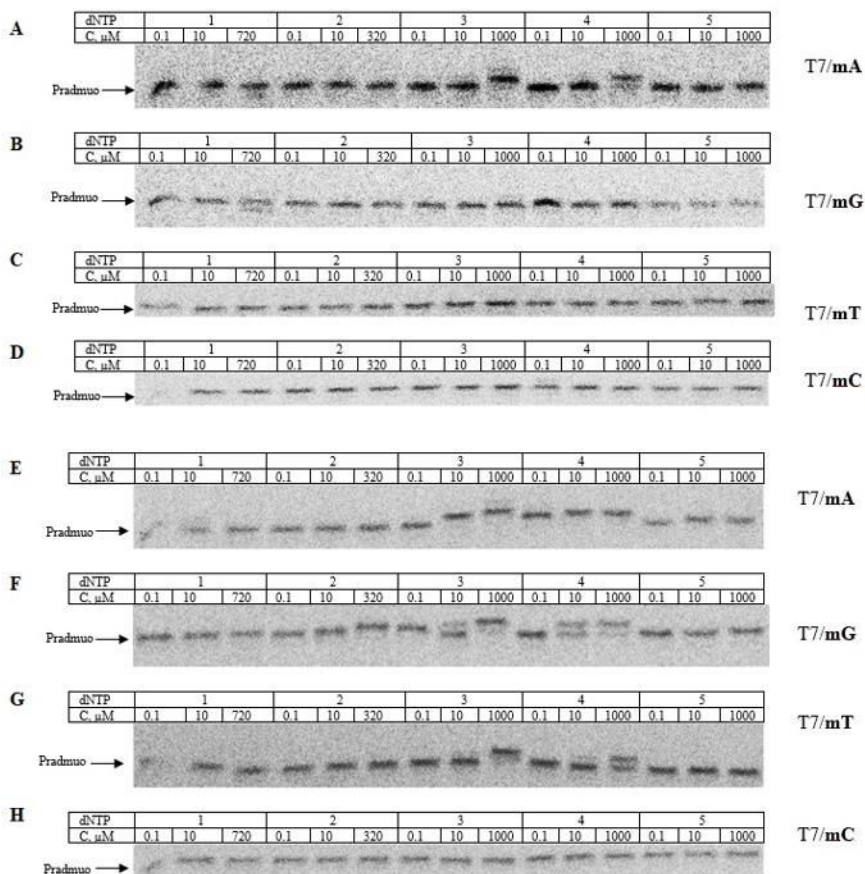
T7/mT  
5' \*TAATACGACTCACTATAGGGAGA  
3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTTTTTAATTGGCC

T7/mG  
5' \*TAATACGACTCACTATAGGGAGA  
3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGGGCCGGAATT

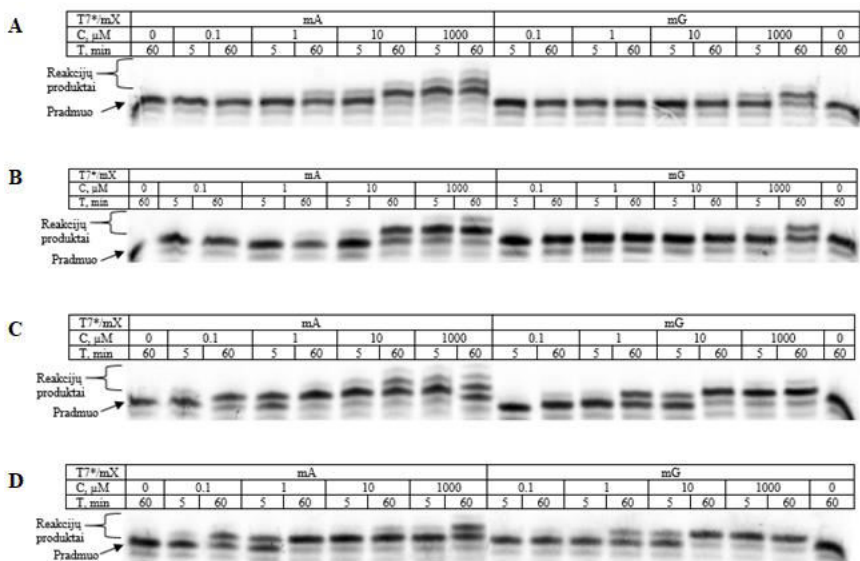
T7/mC  
5' \*TAATACGACTCACTATAGGGAGA  
3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTCCCCGGCCAATT

**3.9 pav. DNR substratai T7/mA, T7/mT, T7/mG ir T7/mC, naudoti nukleotidų įjungimo tyrimams.** Pradmens 5' gale (pažymėta žvaigždute) įvesta fosfato grupė su <sup>33</sup>P.

Dėl sugebėjimo įjungti tiek prieš adeniną, tiek prieš timidiną buvo nuspręsta patikrinti šių junginių panaudojimą įvairiose matricose (3.9 pav.). Atliktos pradmens prailginimo reakcijos su naujais DNR substratais su M.MuLV AT (3.10 pav. A – D) ir Klenow exo- (3.10 pav. E – H) naudojant skirtingas piridoninių nukleotidų koncentracijas. M.MuLV AT sugebėjo įjungti junginius **3** ir **4** su T7/mA DNR substratu (3.10 pav. A), kai šių junginių koncentracijos yra 1000 μM, o su kitais DNR substratais įjungimas nebuvo stebimas (3.10 pav. B, C ir D). Klenow exo- sugeba įjungti **3** ir **4** junginius su T7/mA (3.10 pav. E) ir silpniau su T7/mG (3.10 pav. F) tirtame koncentracijų diapozone, bei stebimas įjungimas su T7/mT (3.10 pav. G), kai junginių koncentracija yra 1000 μM. Su T7/mC įjungimas nebuvo stebimas (3.10 pav. H). Junginiai **3** ir **4** įjungiami efektyviausiai, matricos grandinėje priimtinausios nukleobazės: A ≥ G > T > C.



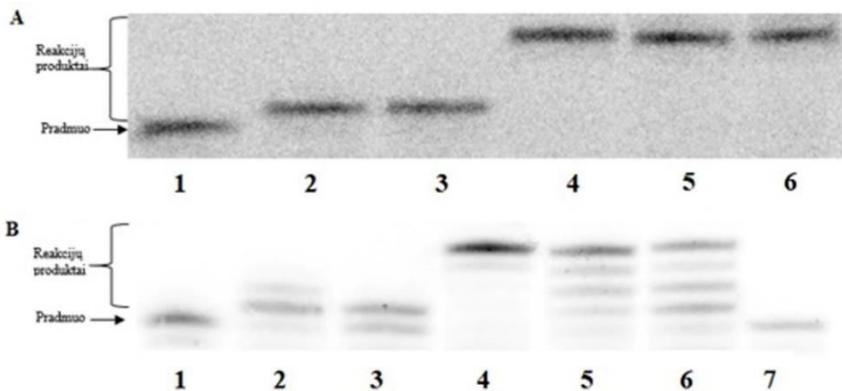
**3.10 pav. Pradmens prailginimo reakcijos su piridoniniais nukleotidais.** Gelių nuotraukos su skirtingais DNR substratais (dešinėje pusėje pateikta, su kokiais DNR substratais atliktos reakcijos). (A – D) M.MuLV AT katalizuojama reakcija, (E – H) Klenow exo- katalizuojama reakcija. Reakcijos atliktos su skirtingomis tiriamų piridoninių nukleotidų koncentracijomis, naudojant glutamatinį buferį su 1 mM MgCl<sub>2</sub> ir reakcijos vyko 5 min. Virš gelio nuotraukos lentelė, kurioje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: atitinkamas piridoninio nukleotido numeris (3.5 pav.) ir jo koncentracija.



**3.11 pav. Pradmens prailginimo reakcijos su piridoniniais nukleotidais ir skirtingomis DNR matricomis (mA arba mG).** (A) M.MuLV AT katalizuojama reakcija su junginiu **3**, (B) M.MuLV AT katalizuojama reakcija su junginiu **4**, (C) Klenow exo- katalizuojama reakcija su junginiu **3**, (D) Klenow exo- katalizuojama reakcija su junginiu **4**. Virš gelių nuotraukų lentelės, kur pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: DNR substrato matrica, piridoninio nukleotido koncentracija, pradmens prailginimo reakcijos trukmė.

Norint įvertinti, ar stebimas DNR biosintezės sustojimas įjungus piridono nukleotidą sukelia struktūrinės kliūtis kito piridono nukleotido įjungimui, buvo siekta efektyvesnio pradmenų pratęsimo. Parinktas platesnis laiko ir 2-piridono nukleotidų koncentracijų diapazonas. Pasirinktos mA ir mG matricos (3.9 pav.), nes su šiomis matricomis geriausiai įjungiami piridoniniai nukleotidai (3.10 pav.). M.MuLV AT sugeba įjungti du ar tris nukleotidus, esant 1000  $\mu$ M piridoninų nukleotidų koncentracijai ir ilgai reakcijos trukmei su T7/mA (3.11 pav. A ir B dalys). Tuo tarpu su DNR substratu T7/mG piridono nukleotidų įjungimas yra menkas, stebimas tik su 1000  $\mu$ M koncentracija ir 60 min trukmės reakcijoje (3.11 pav. A ir B dalys). Klenow exo- DNA polimerazė sugeba įjungti tris ar keturius nukleotidus, esant 1000  $\mu$ M piridoninų nukleotidų koncentracijai ar ilgai reakcijos trukmei su T7/mA (3.11 pav. C ir D dalys). Esant tarpinėms koncentracijoms, stebimas vieno nukleotido įjungimas. Kitaip nei M.MuLV AT, su DNR substratu T7/mG piridono nukleotidų įjungimas yra stebimas, nors DNR polimerazė įjungia vieną nukleotidą. Junginys **3** yra panaudojamas efektyviau nei junginys **4**.

Ribotas junginių **3** ir **4** įjungimas į pradmenį paskatino įvertinti DNR grandinės biosintezės nutraukimo savybes. DNR pradmens prailginimo reakcijos buvo atliktos su Klenow exo- ir 10  $\mu\text{M}$  junginiais **3** ir **4**, esant sąlygoms, skirtoms gauti vienodą pradmens prailginimą tik vienu nukleotidu (3.12 pav. A dalis, takeliai 2 ir 3). Baigus reakciją, šių mėginių dalys buvo papildytos dTTP ir reakcijos buvo tęsiamos. Klenow exo- gali po junginio **3** ir **4** nukleotido įjungimo į DNR grandinę papildomai įjungti dTTP (3.12 pav. A dalis, takeliai 5 ir 6). Taip pat panašiai reakcijai naudojome M.MuLV AT. Remiantis ankstesniais duomenimis, buvo pasirinkta junginių **3** ir **4** koncentracijos po 1000  $\mu\text{M}$ , DNR pradmuo buvo papildomai prailgintas iki 1 ar 2 piridoninių nukleotidų (3.12 pav. A dalis, takeliai 2 ir 3) prieš pridėdant 10  $\mu\text{M}$  dTTP. Čia stebimi pratęsimo tarpiniai junginiai, atsirandantys tikriausiai dėl nepalankaus piridoninių nukleotidų ir dTTP santykio (3.12 pav. B dalis, takeliai 5 ir 6).



**3.12 pav. T7/mA prailginimas su junginiais 3 ir 4, ir papildomai pridėdant dTTP.** (A) Klenow exo- katalizuojamos reakcijos, (B) M.MuLV AT katalizuojamos reakcijos. Takeliai: 1 – kontrolinis mėginys, kuriame ne pridėta jokių nukleotidų; 2 – T7/mA pradmens prailginimas su piridoniniu nukleotidu **3**; 3 – T7/mA pradmens prailginimas su piridoniniu nukleotidu **4**; 4 – T7/mA pradmens prailginimas su dTTP; 5 – T7/mA pradmens, kuris prailgintas su piridoniniu nukleotidu **3**, prailginimas su dTTP; 6 – T7/mA pradmens, kuris prailgintas su piridoniniu nukleotidu **4**, prailginimas su dTTP; 7 – kontrolinis mėginys, kuriame ne pridėta jokių nukleotidų.

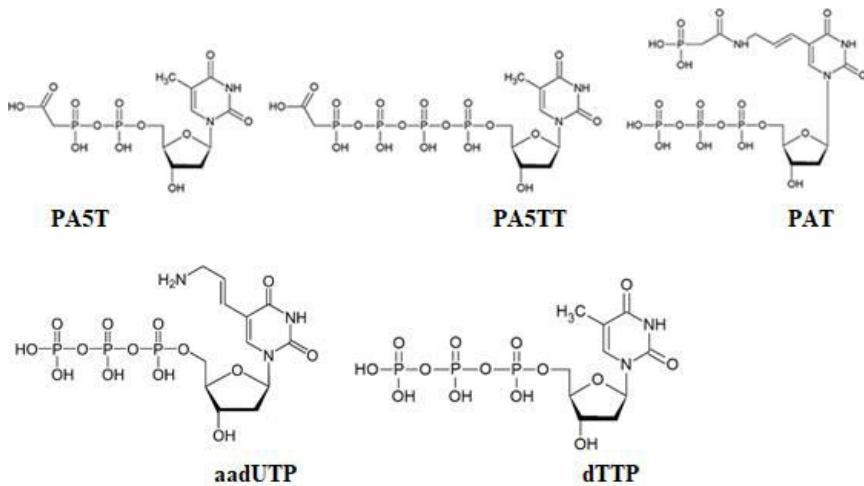
Remiantis turimais duomenimis, galima teigti, kad tirti piridoniniai nukleotidai nėra efektyvūs DNR polimerazių slopikliai, kurie galėtų slopinti DNR biosintezę. Nors jų įjungimas stabdo Klenow exo- ir M.MuLV AT sugebėjimą efektyviai įjungti kitą piridoninį nukleotidą, dTTP įjungimas nėra stabdomas arba M.MuLV AT atveju stabdomas menkai. Dėl junginių **3** ir **4** įjungimo prieš adenino ir guanino nukleobazes, galimas jų panaudojimas



kaip mirtiną mutagenę sukeliančius antivirusinius preparatus. Kadangi M.MuLV AT įjungia silpniau nei Klenow *exo-*, galimas mažas specifiskumas AT kitų polimerazių atžvilgiu. Be to, pagal gautus duomenis M.MuLV AT  $K_M$  reikšmė gali būti per didelė, norint panaudoti kaip antivirusinius vaistus.

### 3.3 DNR biosintezės slopinimo nukleotidų konjugatais su fosfonoacto rūgštimi tyrimas

Šiame tyrime mes sutelkėme dėmesį į fosfonoacto rūgšties nukleotidų konjugatus, sukurtus taip, kad pasireikštų slopinimas DNR polimerazėms. Tirti trys skirtingi PAA konjugatai, tokie kaip dTMP konjuguotas su PAA fosfono dalimi per 5' fosfatą (PA5T), dTTP konjuguotas su PAA fosfono dalimi per 5'  $\gamma$  fosfatą (PA5TT), ir 5 aminoalil-dUTP (aadUTP) konjuguotas su PAA karboksigrupe per 5' amino grupę (PAT) (3.13 pav.). Struktūriškai PA5T atveju natūralaus dTTP  $\gamma$  fosfatas buvo pakeistas aceto grupe, taip paliekant ryšį tarp  $\alpha$  ir  $\beta$  fosfatų, kuris svarbus DNR biosintezėje. PA5TT turi dTTP struktūrą. PAT atveju, PAA prijungta prie nukleobazės.



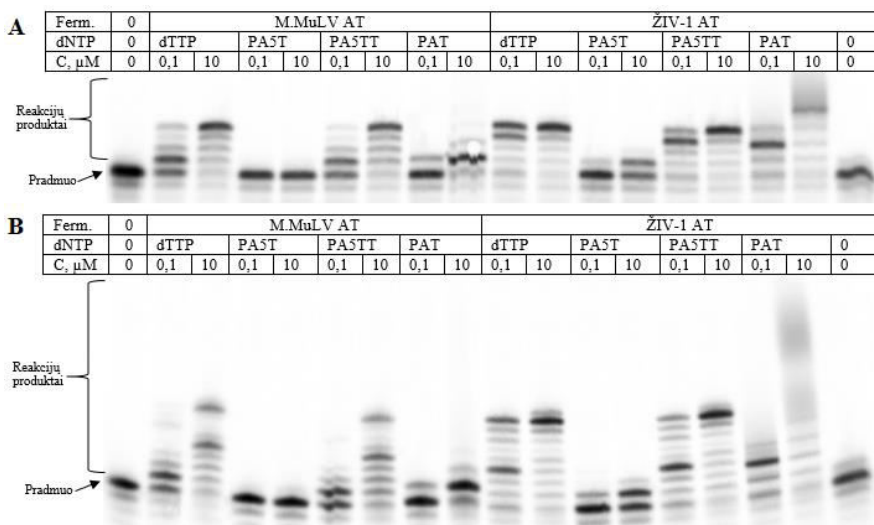
3.13 pav. Nukleotidų su fosfonoacto rūgštimi ir kitų tirtų nukleotidų struktūros.

T7/mA

5' \*TAATACGACTCACTATAGGGAGA

3' ATTATGCTGAGTGATATCCCTCTAAAATTAAGGCC

**3.14 pav. DNR substratas T7/mA, naudotas nukleotidų įjungimo tyrimams.** Pradmens 5' gale (pažymėta žvaigždute) įvesta fosfato grupė su <sup>33</sup>P.

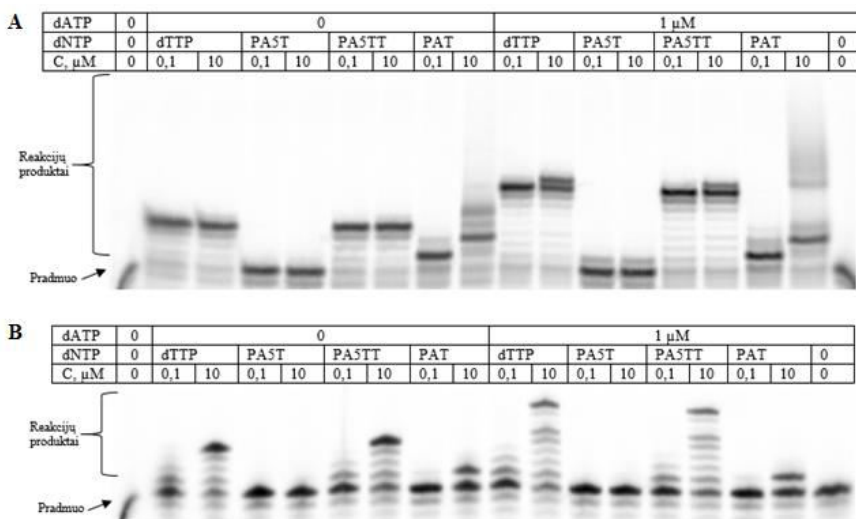


**3.15 pav. M.MuLV ir ŽIV-1 AT T7/mA prailginimas.** (A) su dTTP ir tiriamais modifikuotais nukleotidais, (B) su dTTP ir tiriamais modifikuotais nukleotidais, ir papildomai pridėdant dATP. Lentelėje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: atitinkama AT, nukleotidai ir jų koncentracija.

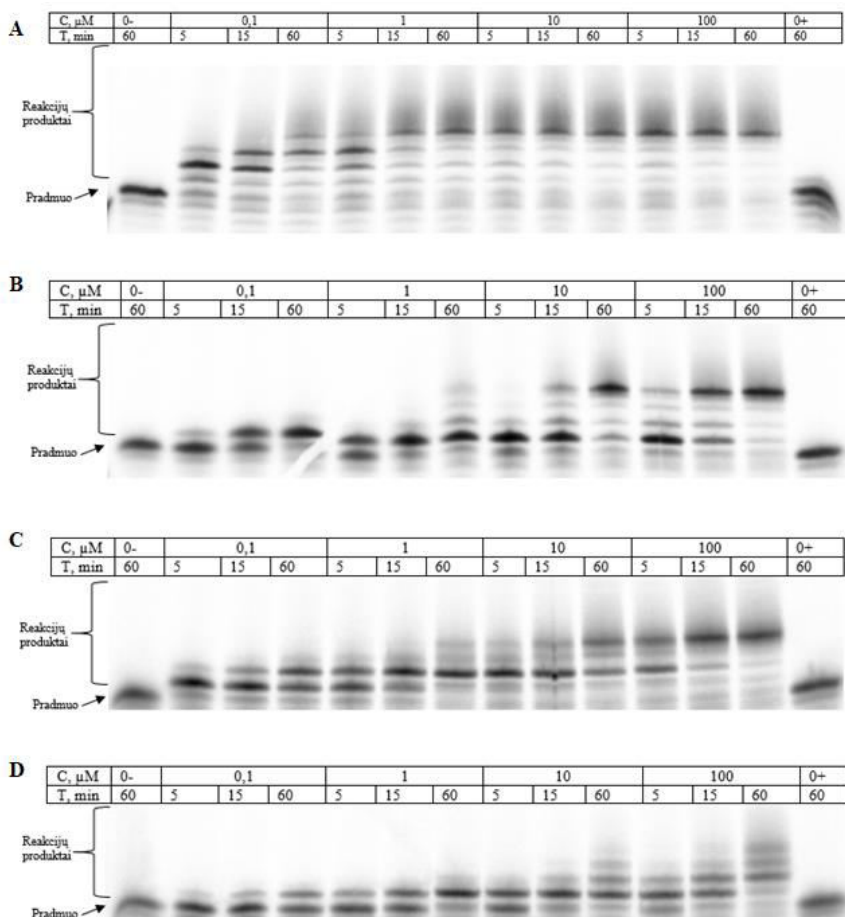
Analizuotos DNR biosintezės reakcijos, dalyvaujant ŽIV-1 ir M.MuLV AT, taip pat Klenow exo- ir Taq DNR polimerazėms. DNR biosintezės tyrimams buvo naudota T7/mA DNR substratas (3.14 pav.), į kurį tyrimo sąlygomis galima įjungti keturis dTTP iš eilės. Siekiant geriau įvertinti biosintezės produktus, buvo pasirinktas 5 min. reakcijos laikas (3.15 ir 3.16 pav.). Polimerazės skyrėsi savo gebėjimu panaudoti tiriamus konjugatus kaip substratą. Visų išbandytų polimerazių atveju tik PA5TT įjungimas buvo panašus kaip dTTP. Priešingai, PA5T buvo panaudojamas tik ŽIV-1 AT (3.15 pav.), ir tik nedidelis šio junginio kiekis buvo panaudojamas M.MuLV AT ir Klenow exo- po ilgesnės trukmės ir esant didesnėms PA5T koncentracijoms (duomenys nerodomi). Taq polimerazė nesugeba PA5T įjungti į DNR (3.16 pav.). PAT įjungimas į DNR skyrėsi kiekvienos DNR polimerazės atveju. Šis modifikuotas nukleotidas buvo panaudotas ŽIV-1 AT ir Klenow exo- DNR polimerazių, nors ir šiek tiek

mažesniu efektyvumu palyginus su dTTP (3.15 ir 3.16 pav.). M.MuLV AT ir Taq DNR polimerazės įjungia nedidelį PAT kiekį (3.15 ir 3.16). Visos DNR polimerazės pasižymėjo panašia nukleotidų įjungimo tendencija: dTTP~PA5TT> PAT >> PA5T.

Norėdami patikrinti, ar PAA modifikuotų nukleotidų įjungimas sutrikdė DNR substrato struktūrą, kas gali trukdyti tolesniam DNR pradmens pratęsimui, reakcijoje buvo įtrauktas papildomas žingsnis. Tam įvertinti buvo atliktos DNR pradmens prailginimo reakcijos su tiriamais junginiais ir papildomai pridėdant dATP reakcija tęsiama dar penkias minutes. Pailgėjimas vyko tik tada, kai pradmuo turėjo keturis įjungtus dTTP nukleotidus. Pradmens produktai, turintys tris ar mažiau įjungtų nukleotidų, dėl substrato struktūros negali būti prailginami su dATP (3.15 B dalis ir 3.16 pav. A ir B dalys). PA5TT atveju su visais fermentais DNR produktai panašūs į dTTP produktus, kas leidžia manyti, kad PA5TT nepasižymi slopinimu (3.15 B dalis ir 3.16 pav. A ir B dalys). Su PAT, DNR produktai skiriasi nuo dTTP. Nors dATP įjungimas stebimas su ŽIV-1 AT ir Klenow exo-, kas rodo, kad PAT nestabdo dATP įjungimo (3.15 B dalis ir 3.16 pav. A dalis), vis dar stebimi tarpiniai produktai, ypačingai su Klenow exo-.



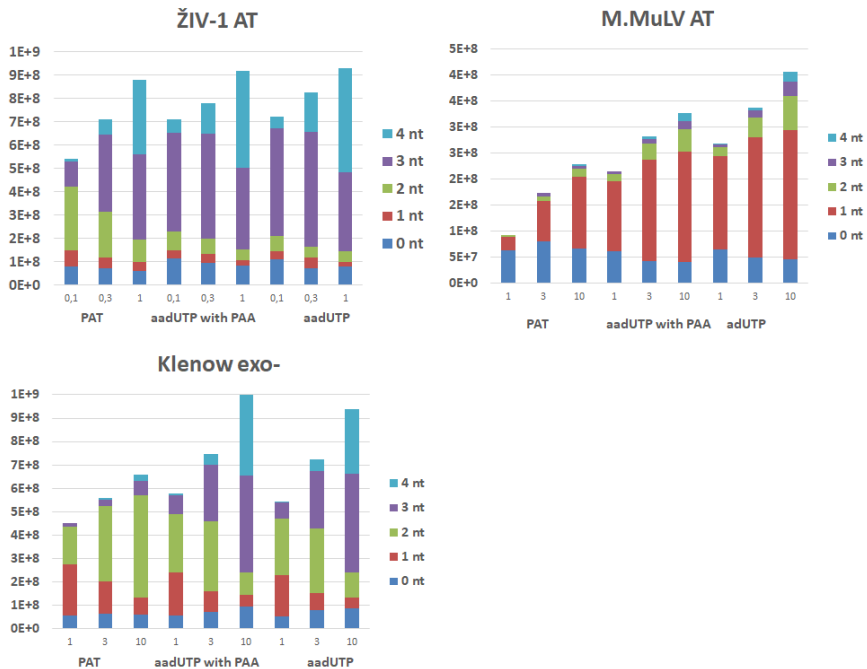
**3.16 pav. T7/mA prailginimas su dTTP ir tiriamais modifikuotais nukleotidais, ir papildomai pridėdant dATP.** (A) Klenow exo-polimerazės katalizuojama reakcija, (B) Taq polimerazės katalizuojama reakcija. Lentelėje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: nukleotidai ir jų koncentracija, dATP papildomas įdėjimas.



**3.17 pav. T7/ma prailginimas su PAT.** (A) su ŽIV-1 AT, (B) M.MuLV AT, (C) Klenow exo- polimerazė, (D) Taq polimerazė. Lentelėje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: PAT koncentracija, reakcijos trukmė.

Dėl skirtingo PAT panaudojimo DNR polimerazėmis buvo nuspręsta detaliau ištirti šio junginio įjungimą. ŽIV-1 AT sugebėjo į pradmenį įjungti 4 PAT nukleotidus. Silpnesnis įjungimas stebimas ties 0,1  $\mu\text{M}$  PAT koncentracija (3.17 pav. A dalis). Tuo tarpu M.MuLV AT pasižymėjo silpnu įjungimu, PAT keturi nukleotidai įjungiami esant didelei PAT koncentracijai, kai reakcijos trunka 15 min arba 60 min (3.17 pav. B dalis). Esant 10  $\mu\text{M}$  ir mažesnėms koncentracijoms, dominuoja vieno nukleotido įjungimas (3.17 pav. B dalis). Klenow exo- polimerazė kur kas efektyviau panaudojo PAT DNR biosintezėi nei M.MuLV AT, bet silpniau nei ŽIV-1 AT (3.17 pav. C dalis). Stebint nukleotidų įjungimo priklausomybę nuo laiko, būdingi pirmo arba antro nukleotido dominuojantys produktai. Taq

polimerazė panaudoja PAT mažesniu efektyvumu nei M.MuLV AT (3.17 pav. D dalis). ŽIV-1 AT iš visų tiriamų polimerazių geriausiai panaudoja PAT DNR biosintzei. Kitos trys DNR polimerazės turėjo mažesnę gebėjimą įtraukti minėtą junginį: Klenow exo- > M.MuLV AT > Taq polimerazė. Taip pat šių fermentų DNR biosintzės metu buvo stebimi tarpiniai pradmens prailginimo produktai, apimantys vieną ar du PAT nukleotidus. Toks laipsniškas reakcijos tarpinių produktų susidarymas būdingas DNR polimerazei veikiant distributyviniu būdu. Tuo tarpu DNR biosintzę vykdant su dTTP, naudojami fermentai pasižymi procesyvinu DNR biosintzės būdu.



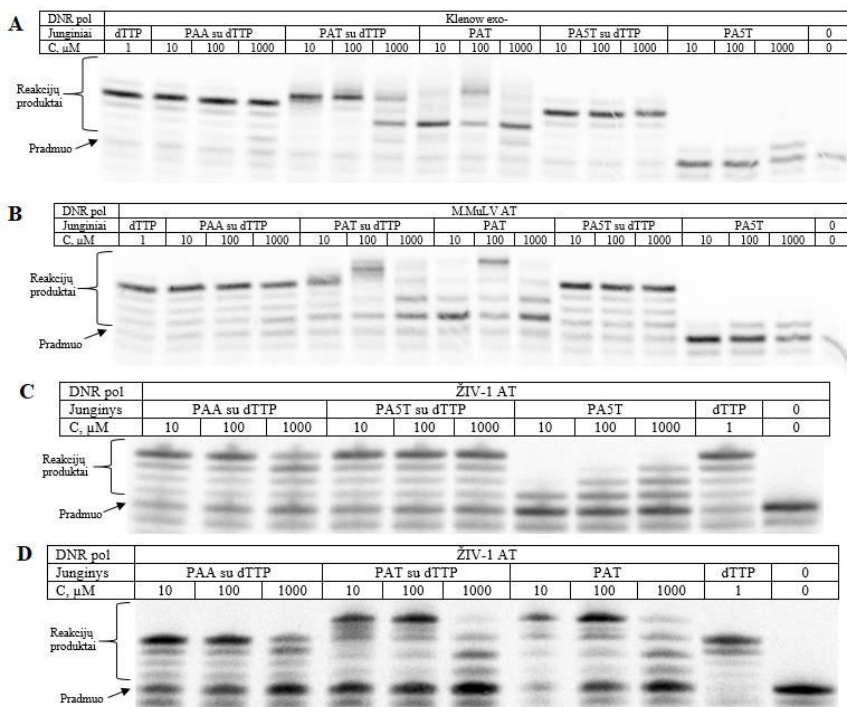
**3.18 pav. Pradmens prailginimas esant PAT, aadUTP ir PAA mišiniui arba vien aadUTP.** Polimerazės, naudojami pradmens pratęsimos reakcijose nurodytos virš grafiko. PAT, aadUTP ir PAA koncentracijos pateiktos žemiau grafiko. Reakcijos trukmė 5 min. Skaičiuojant reakcijos rezultatus, atsižvelgiama į įtrauktų nukleotidų kiekį ir nurodomas bendras juostos dydis. Skirtingos juostos dalys žymi atitinkamų produktų pasiskirstymą ir nurodytos grafiko legendoje.

Norint išsiaiškinti, kodėl įjungiant PAT sumažėjo polimerazių procesyvumas, pradmens prailginimo reakcijos buvo atliktos su vien tik PAT, aadUTP ir PAA mišiniu, kuriame aadUTP kiekis lygus PAA, arba vien aadUTP ir įvertinta densitometriškai (3.18 pav.). Stebimi ryškūs skirtumai

tarp DNR polimerazių sugebėjimo panaudoti PAT ir aadUTP (3.18 pav.). ŽIV-1 AT DNR produktuose dominuoja 3 ir 4 nukleotido įjungimo produktai su PAT ir aadUTP, išskyrus mažesnę PAT koncentraciją (3.18 pav. ŽIV-1 AT). M.MuLV AT atveju dominuoja vieno nukleotido įjungimo produktas, kai antro ir kitų nukleotidų įjungimo DNR produktų stebimi mažesni kiekiai (3.18 pav. M.MuLV AT). Tai rodo, kad tiek PAT, tiek aadUTP pakeičia šios AT veikimą. Klenow exo- DNR produktai primena tarpinį variantą tarp tiriamų AT. PAT atveju, stebima 1 ir 2 įjungimo produktai ir kitų DNR produktų mažesni kiekiai (3.18 pav. Klenow exo-). Kai reakcijos mišinys yra aadUTP, 3 ir 4 nukleotido įjungimai pradeda dominuoti ties didesnėmis šio nukleotido koncentracijomis. PAA buvimas neslopino aadUTP panaudojimo DNR biosintezei, išskyrus M.MuLV AT (3.18 pav.). Be to, nedidelis reakcijos stimuliavimas stebimas su Klenow exo-. Akivaizdu, kad funkcinės grupės nukleobazės 5 pozicijoje prigimtis ir/ar dydis yra svarbus nukleotidų įjungimui į DNR.

Dėl prasto įjungimo į DNR tikėtasi, kad PA5T ir PAT gali slopinti DNR polimerazes, todėl šie junginiai buvo atrinkti konkurenciniam pradmenų prailginimui su dTTP (3.19 pav.). Šiam eksperimentui dTTP koncentracija buvo pasirinkta 1  $\mu\text{M}$ , taip pat naudotas slopiklis PAA, kad būtų galima palyginti slopinimo efektyvumą, ir pavieniai PA5T ir PAT nukleotidai, kad būtų galima įvertinti jų įjungimą į DNR. Slopiklių koncentracijos parinktos didesnės 10, 100 ir 1000 kartų, nei dTTP koncentracija. Toks slopinimo įvertinimas apribotas: PA5T ir dTTP įjungimo produktas yra tas pats nukleotidas, o PAT įjungimo produktas pasižymi skirtingu judrumu gelyje, palyginus su dTTP produktu. Bendrai tikimasi, kad slopinimas stebimas per DNR produktų profilio pasikeitimą – DNR gamybos sumažėjimą, palyginus su natūraliu junginiu ir slopinant PAA. PA5T nepasižymėjo slopinimu nei su Klenow exo- DNR polimeraze (3.19 A dalis), nei su M.MuLV AT (3.19 B dalis), nei su ŽIV-1 AT (3.19 C dalis) (Ravoitytė, 2014), netgi kai koncentracija buvo 1000 kartų didesnė nei dTTP, kai tuo tarpu PAA ties šita koncentracija sugeba slopinti. Klenow exo- DNR polimerazė (3.19 A dalis), M.MuLV AT (3.19 B dalis) ir ŽIV-1 AT (3.19 D dalis) (Ravoitytė, 2014) tiriamomis sąlygomis sugebėjo įjungti PAT, sprendžiant iš DNR produktų judrumo pokyčio lyginant su vien dTTP ir vien PAT mėginiais. PAT DNR produktai skyrėsi tarp tirtų DNR polimerazių, ypatingai su M.MuLV AT. Kai PAT koncentracija 10  $\mu\text{M}$ , šis nukleotidas sugeba nukonkuruoti dTTP ties 1  $\mu\text{M}$ , ir stebima PAT DNR produktai su Klenow exo- DNR polimeraze (3.19 A dalis) ir ŽIV-1 AT (3.19 D dalis). Su M.MuLV AT DNR produktų judrumas panašus į dTTP produktus. Tuo tarpu su visomis DNR polimerazėmis, kai PAT koncentracija 1000  $\mu\text{M}$ , stebimas

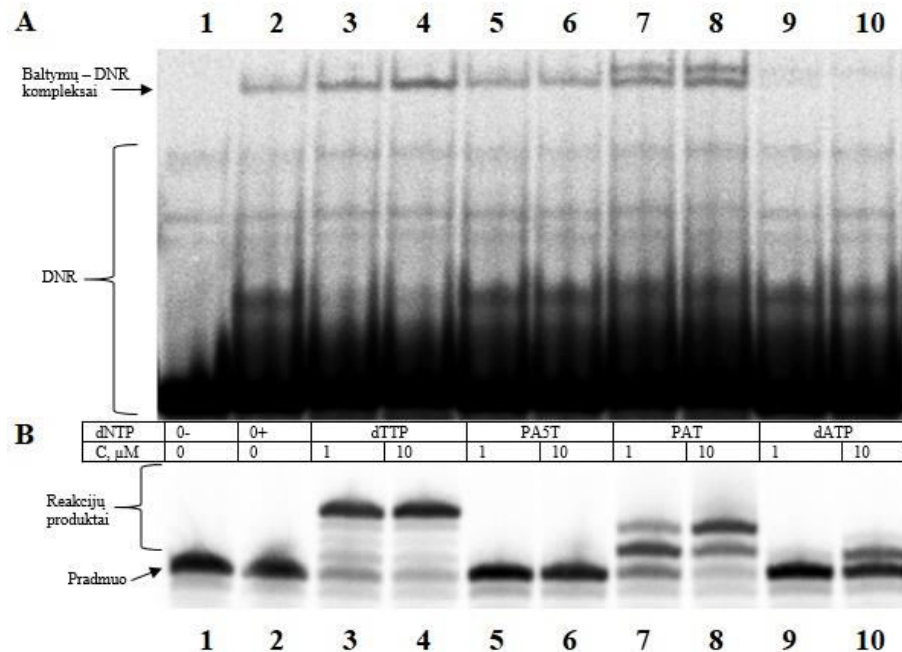
šio nukleotido substratinis slopinimas, lyginant su PAT įjungimu, kai nėra dTTP.



**3.19 pav.** T7/mA konkurencinis prailginimas (A) su Klenow exo-polimeraze, (B) su M.MuLV AT, (C) ir (D) su ŽIV-1 AT (Ravoitytė, 2014). Lentelėje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: PAT, PA5T, dTTP ir PAA koncentracijos.

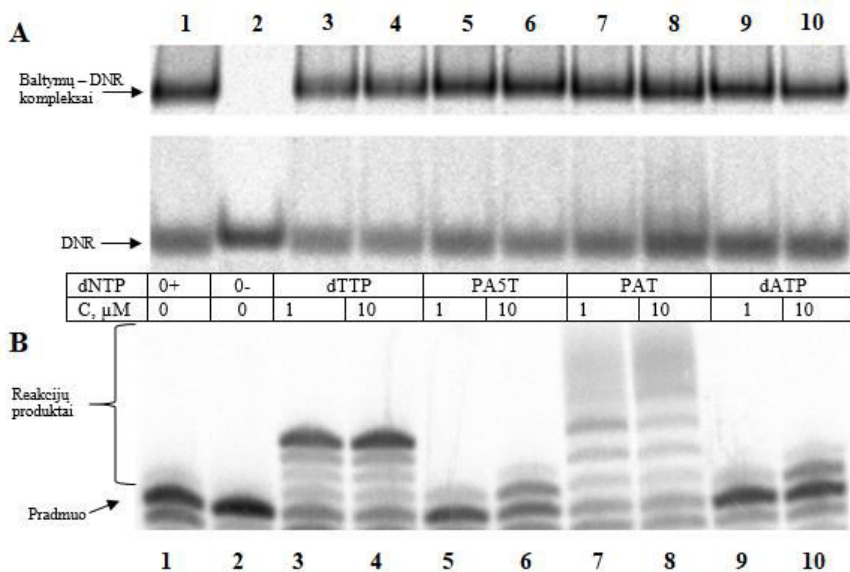
Siekiant išsiaiškinti, kodėl Klenow exo- polimerazė ir ŽIV-1 AT ribotai įjungia PAT, buvo tiriamas polimerazės prisijungimas prie DNR substrato, kai kompleksas yra kataliziškai kompetentingas. DNR substrato ir DNR polimerazės komplekso judrumo pokyčiai turėtų priklausyti nuo fermento konformacijos. Tai leistų įvertinti bendrą tretinio komplekso konformaciją. Šiame tyrime buvo naudojami du natūralūs nukleotidai – dTTP ir dATP – ir modifikuoti PA5T ir PAT, kas leistų identifikuoti tiek specifinius, tiek nespecifinius kompleksus. Pradmens pratęsimo reakcija truko penkias minutes, ir reakcijos produktai buvo ištirti pagal 2.2.13 skyriuje aprašytą metodiką. Nesant nukleozidų trifosfatų ar esant su PA5T, Klenow exo- polimerazės prisijungimas prie DNR substrato šiek tiek silpnesnis, palyginus dTTP arba PAT (3.20 pav., A dalis, takeliai 2 – 8). Esant dATP, stebimas Klenow exo- polimerazės prisijungimas prie DNR

substrato yra labai silpnas (3.20 pav., A dalis, takeliai 9 ir 10). Klenow exo-ir DNR substrato komplekso stabilumas gali priklausyti nuo dNTP buvimo. Be to, su dATP ir PAT stebimas skirtingo judrumo kompleksų susidarymas (3.20 pav., A dalis, takeliai 8 – 10). dATP buvo įterptas į pradmenį gana neveiksmingai, kaip rodo denatūruojančio gelio elektroforezė (3.20 pav., B dalis, takeliai 9 ir 10). Tuo tarpu PAT įjungimas buvo efektyvesnis (3.20 pav., B dalis, takeliai 7 ir 8). Mūsų rezultatai rodo, kad dalyvaujant DNR ir PAT, kataliziškai kompetentingame trinariame komplekse Klenow exopolimerazės konformacija pakeista. ŽIV-1 atvirkštinės transkriptazės tretinių kompleksų analizė su nukleotidais taip pat parodė konformacinius pokyčius (3.21 pav. A dalis). Čia PAT savo sudėtyje turintis kompleksas migravo šiek tiek greičiau nei dTTP turintis tretinis kompleksas (3.21 pav. A dalis 7 ir 8). Be to, stebima laisvo DNR substrato migracija rodo, kad tretinis kompleksas su PAT gali būti mažai stabilus (3.21 pav. A dalis, takelis 8).



**3.20 pav. Klenow exo- T7/mA prailginimas su dTTP, PA5T, PAT ar dATP (A) tirtas natyviu PAGE ar (B) denatūruojančiu PAGE. Lentelėje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: nukleotidai ir jų koncentracija. 0 rodo, kad nepridėta nukleotidų, + reiškia pridėta DNR polimerazė ir naudojama kaip kontrolinis mėginys, - reiškia, kad mėginyje nėra DNR polimerazės ir naudojama kaip kontrolinis mėginys įverti DNR ir polimerazės kompleksų buvimui.**





**3.21 pav. ŽIV-1 AT T7/ma prailginimas su dTTP, PA5T, PAT ar dATP tirtas natyviu PAGE ar denatūruojančiu PAGE.** Lentelėje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: nukleotidai ir jų koncentracija. 0 rodo, kad nepridėta nukleotidų, + reiškia pridėta DNR polimerazė ir naudojama kaip kontrolinis mėginys, - reiškia, kad mėginyje nėra DNR polimerazės ir naudojama kaip kontrolinis mėginys įverti DNR ir polimerazės kompleksų buvimui.

T7A/ma

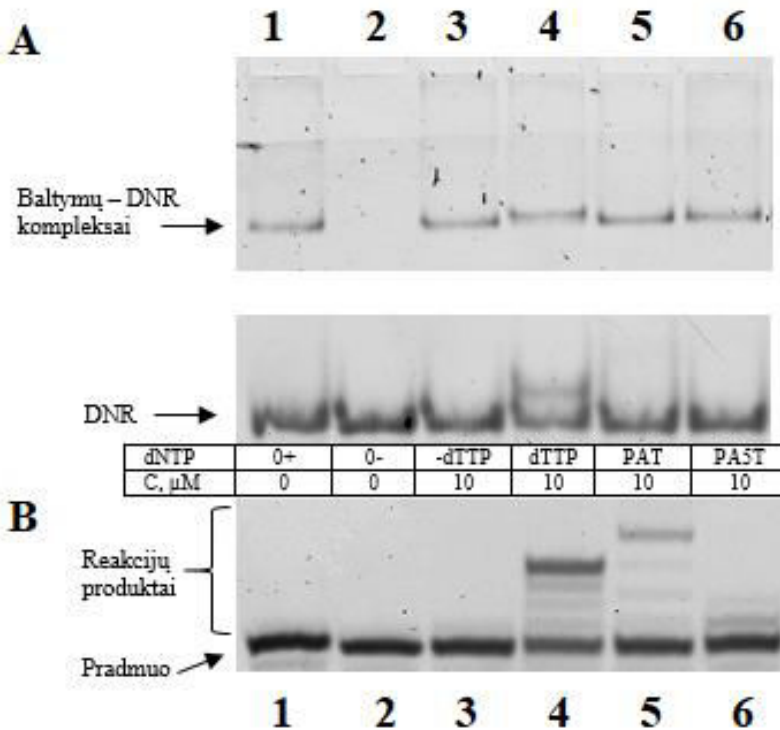
5' TAAT\*ACGACTCACTATAGGGAGA

3' ATTA TGCTGAGTGATATCCCTCTAAAATTAAGGCC

**3.22 pav. DNR substratas T7A/ma, naudotas nukleotidų įjungimo tyrimams.** Fluorescencinė žymė Atto488 yra prijungta prie T7-PrA488 pradmens ketvirto nukleotido, dT (pažymėta žvaigždute), nuo 5' DNR galo.

Siekiant išsiaiškinti ŽIV-1 AT ir DNR komplekso migravimo ypatumus su skirtingais nukleotidais, buvo optimizuoti natyvaus poliakrilamidinio gelio elektroforezės parametrai. Naudotas gelis, pagamintas iš nukleorūgščių elektroforezės 12% poliakrilamidinio gelio tirpalo. Elektroforezė vykdoma 5 °C temperatūroje 6 valandas. Reakcijos atliktos, esant 100 nM ŽIV-1 AT koncentracijai ir 40 nM T7A/ma DNR substratu (3.22 pav.), su dATP, dGTP ir dCTP mišiniu, dTTP, PAT ir PA5T (3.23 pav.). ŽIV-1 atvirkštinės transkriptazės tretinių kompleksų analizė su nukleotidais parodė ryškesnius konformacinius pokyčius (3.23 pav. A dalis). Čia kompleksas su PAT migravo šiek tiek greičiau nei dTTP turintis tretinis

kompleksas ir panašiai kaip dTTP neturintis kompleksas (3.23 pav. A dalis, takeliai 3, 4 ir 5). Stebima papildoma DNR substrato juostelė su dTTP (3.23 pav. A dalis, takelis 4), bet tai tikriausiai yra DNR substratas su keturiais įjungtais dTTP, remiantis denatūruojančio gelio rezultatais (3.23 pav. B dalis, takelis 4). Nestebima pakitusi DNR substrato migracija mišinyje su PAT (3.23 pav. A dalis, takelis 5). Prisijungus PAT ar įjungus PAT į DNR, Klenow exo- polimerazės ir ŽIV-1 AT tretinis kompleksas turi alternatyvią konformaciją. Klenow exo- alternatyvus tretinis kompleksas su PAT primena tretinius kompleksus, kai įjungiami klaidingi nukleotidai. Tuo tarpu ŽIV-1 AT ir DNR substrato kompleksas su PAT pasižymi pakitusiu judrumu. Būtinai tolimesni tyrimai siekiant, išsiaiškinti tikslus fosfonoacto rūgšties sukeltus pokyčius.



**3.23 pav. ŽIV-1 AT T7A/mA prailginimas su dTTP, PA5T, PAT ar – dTTP (dCTP, dATP ir dGTP mišinys) natyviu PAGE ar denatūruojančiu PAGE. Lentelėje pateiktos kiekvieno takelio DNR biosintezės sąlygos: nukleotidai ir jų koncentracija. 0 rodo, kad nepridėta nukleotidų, + reiškia pridėta DNR polimerazė ir naudojama kaip kontrolinis mėginys, - reiškia, kad mėginyje nėra DNR polimerazės ir naudojama kaip kontrolinis mėginys įverti DNR ir polimerazės kompleksų buvimui.**

### 3.4 Aptarimas

Modifikuotų nukleotidų panaudojimas DNR biosintezėje ir jų tyrimai yra svarbūs sintetinei biologijai, modifikuotų oligonukleotidų gamybai, antivėžinių ar antivirusinių preparatų įvertinimui. Šioje disertacijoje aptariamas ciklinių ir neciklinių piridoninių nukleozidų panaudojimas DNR polimerazių slopinimui. Taip pat tirtas piridoninių nukleotidų alternatyvaus bazių poros panaudojimas DNR biosintezėje. Mes taip pat sutelkėme dėmesį į fosfonoacto rūgšties nukleotidų konjugatus, sukurtus taip, kad pasireikštų veikimo mechanizmu paremtas slopinimas DNR polimerazėms.

Tirtas piridoninių nukleozidų sugebėjimas slopinti M.MuLV AT ir Klenow *exo-* DNR biosintezę. Nė vienu atveju nepastebėtas reikšmingas dTTP įjungimo į DNR slopinimas. Tik junginys **7** (4-hidroksi 2-piridono deoksiribozidas) geba slopinti M.MuLV AT, kai reakcijos mišinys yra buferis su mangano jonais, bet slopinimas nėra stebimas esant buferiui su magnio jonais. Magnio jonai dažniausiai naudojami *in vitro* ir spėjama, kad *in vivo* atvirkštinės transkriptazės irgi naudoja juos DNR biosintezėi. Tačiau M.MuLV ir kitų gamaretrovirusų AT DNR biosintezėi *in vitro* sugeba panaudoti mangano jonus (Herschhorn ir Hizi, 2010). Mangano jonai siejami su DNR polimerazių sumažėjusiu tikslumu dėl sugebėjimo stipriau prijungti trifosfatus ir stabilizuoti tautomerines bazių poras (Vashishtha et al., 2016). Junginio **7** sugebėjimas slopinti M.MuLV AT, esant buferiui su mangano jonais, rodo galimą fermento struktūros pasikeitimą, kas leidžia slopikliui prisijungti prie fermento. Būtinai papildomi tyrimai, norint išsiaiškinti šio piridoninio nukleozido slopinimo mechanizmą.

Ištirtas piridoninių nukleotidų panaudojimas DNR polimerazių vykdomoms reakcijoms. Tyrimui pasirinktos DNR polimerazės – Klenow *exo-* ir M.MuLV AT – skirtingomis savybėmis ir pritaikymu pasižymintys fermentai. Klenow *exo-* sugebėjo halogenintus piridoninius nukleotidus įjungti prieš matricinius nukleotidus A ir G, kai M.MuLV AT įjungimas daug silpnesnis. Tai rodo skirtingą fermentų pritaikomumą naudojant dirbtines bazių poras. Nors Klenow *exo-* polimerazės veikimas gali padidinti klaidų kiekį ir paskatinti mutageniškumą, *in vivo* DNR polimerazė I arba bakterijų reparacijos sistemos galėtų pašalinti neteisingai įjungtus nukleotidus.

Piridoninių nukleotidų savybių ištyrimas padeda atskleisti nukleobazės pakaitų įtaką DNR biosintezės efektyvumui. Panašūs junginiai naudoti, siekiant išsiaiškinti fluoro pakaito aromatiniaame žiede įtaką bazių porų susidarymui. Šios poros buvo mažiau stabilios nei fluoropiridonų

tarpusavio ir heteroporos, išskyrus su G ir A. Porų stabilumui daug įtakos turi hidrofobinė sąveika ir galimi vandeniliniai ryšiai tarp funkcinių grupių (Hwang et al., 2007). Halogenintų piridoninių nukleotidų įjungimas efektyvesnis nei nemodifikuoto ar 4-hidroksi piridoninių nukleotidų. Tai rodo, kad chloro ar bromo grupės efektyviau sąveikauja su DNR polimerazių aktyviuoju centru. Paprastai halogenų atomai vaistiniuose junginiuose dalyvauja netiesioginėse hidrofobinėje sąveikose arba užpildo tuščias erdves ir nedalyvauja sudarant stabilizuojančias sąveikas. Elektronų turtingos grupės – deguonies, azoto ir sieros atomai, taip pat aromatinės  $\pi$ -elektronų grupės, halogeno atomai, kai struktūriškai įmanoma, gali sudaryti halogeninius ryšius su aplinkinėmis aminorūgštimis (Parisini et al., 2011). Vis dėl to tyrimai su bazių poromis, kuriuose funkcinės grupės pakeistos taip, kad vietoj vandenilinių ryšių susidarytų halogeniniai ryšiai, rodo, kad halogeninis ryšis silpnesnis nei vandenilinis ryšis arba struktūriškai sunkiau susidaro (Parker et al., 2012; Tawarada et al., 2008). Halogeno grupių įvedimas gali padidinti DNR stabilumą (Ramzaeva et al., 2014) arba slopiklių efektyvumą (Herman et al., 2012).

Fosfonoacto rūgštis pasižymi antivirusiniu aktyvumu prieš *Herpesviridae* narius (Overby et al., 1977), kai jos analogiškos struktūros fosfonoforminė rūgštis pažymi plačiu antivirusiniu aktyvumu prieš įvairius *Herpesviridae* ir *Retroviridae* narius (Öberg, 1982). Norint pasiekti geresnį giminingumą su pasirinktomis DNR polimerazėmis, PAA konjuguota su skirtingomis nukleotido pozicijomis. DNR prailginimo metu mažamolekulinis slopiklis, konjuguotas su nukleotidu, turėtų atsirasti aktyviame polimerazės centre. Šis slopiklis, būdamas netoli katalizinių aminorūgščių, didele vietine koncentracija kompensuos mažą fosfonoacto rūgšties giminingumą. Nustatyta, kad paruoštų konjugatų 5' fosfato regiono struktūra svarbi DNR polimerazių atpažinimui. Tikriausiai dėl to PA5TT, kuris turi nepažeistą 5' trifosfatų struktūrą, buvo efektyviau įjungiamas nei PA5T.

Nukleobazės C5 padėtis pirimidine tinkama įvairių funkcinių grupių įjungimui į DNR. Su 5-aminoalilo grupe konjuguota PAA, palyginus su daugeliu kitų nukleobazės modifikacijų, kuriuos DNR polimerazės panaudoja efektyviai, nepasižymi ypatingu dydžiu ir krūviu (Hollenstein, 2012; Welter et al., 2016; Hottin ir Marx, 2016). Prisijungus PAT ar įjungus PAT į DNR, Klenow exo- polimerazės ir ŽIV-1 AT tretinis kompleksas turi alternatyvią konformaciją. ŽIV-1 AT DNR polimerizacijos metu gali turėti skirtingas konformacijas – atidarytą (Ding et al., 1998) ir uždarytą (Hsiou et al., 1996), kurios apsprendžia fermento veikimą. Su nenukleozidiniais AT slopikliais ŽIV AT įgyja alternatyvią konformaciją (Esnouf et al., 1995), kuri

nėra kataliziškai efektyvi. PFA (tikriausiai tas pats galioja PAA) prisijungdamas prie ŽIV-1 AT, sulaiko ją pretranslokacijos būsenoje (Marchand et al., 2006). PAT įjungimas į DNR gali potencialiai sulaikyti ŽIV-1 AT pretranslokacijos būsenoje. Klenow exo- alternatyvus tretinis kompleksas su PAT primena tretinius kompleksus, kai įjungiami klaidingi nukleotidai. Tai leidžia spėti, kad PAT įjungimas į DNR sumažina polimerizacijos efektyvumą ir gali padidinti egzonukleazinį aktyvumą. DNR polimerazė I arba Klenow fragmentas su 3'-5' egzonukleazės aktyvumu turėtų pasižymėti dar mažesniu sugebėjimu įjungti PAT. Reikia papildomų tyrimų, siekiant išsiaiškinti tikslų fosfonoacto rūgšties sukeltus pokyčius, o tikslinga šių mažamolekulinių junginių konjugacija su nukleotidais gali tapti pagrindu tolesniam naujų antivirusinių vaistų kūrimui.

## IŠVADOS

1. Piridoniniai nukleozidai neslopina Klenow exo- ir M.MuLV AT vykdomos DNR biosintezės, išskyrus junginį **7** (4-hidroksi 2-piridono deoksiribozidas). Junginio **7** slopinimo savybės M.MuLV AT pasireiškia tik reakcijos mišinyje esant mangano jonams.
2. Klenow exo- ir M.MuLV AT gali įjungti į DNR vieną ar kelis piridoninius nukleotidus. Junginiai **3** ir **4** (4-chloro ir 4-bromo piridoniniai nukleotidai) panaudojami efektyviausiai, o matricos grandinėje priimtinausios nukleobazės: A $\approx$ G>T>C. Piridoninių nukleotidų įjungimas turi nedidelį poveikį tolesniam pradmens prailginimui natūraliais nukleotidais.
3. M.MuLV AT, ŽIV-1 AT, Klenow exo- ir Taq DNR polimerazėms būdinga panaši tirtų nukleotidų konjugatų įjungimo efektyvumo tendencija: dTTP $\approx$ PA5TT>PAT>PA5T.
4. PA5T neslopina visų tirtų polimerazių vykdomo DNR pratęsimo su dTTP, o PAT yra įjungiamas DNR biosintezės metu kartu su dTTP.
5. Klenow exo- polimerazei ir ŽIV-1 AT būdingi alternatyvių konformacijų trinariai kompleksai su PAT.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

### Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta straipsniuose

1. **Mikalkėnas, A.**, Ravoitytė, B., Tauraitė, D., Servienė, E., Meškys, R., and Serva, S. (2018). Conjugation of phosphonoacetic acid to nucleobase promotes a mechanism-based inhibition. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 384–389. doi:10.1080/14756366.2017.1417275
2. **Mikalkėnas, A.**, Ravoitytė, B., Tauraitė, D., and Serva, S. (2017). Pyridone-based nucleotide analogues accepted for DNA biosynthesis. *Biologija*, 63(1). doi:10.6001/biologija.v63i1.3473
3. Tauraitė, D., Ražanas, R., **Mikalkėnas, A.**, Serva, S., and Meškys, R. (2016). Synthesis of Pyridone-based Nucleoside Analogues as Substrates or Inhibitors of DNA Polymerases. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 35(4), 163–177. doi:10.1080/15257770.2015.1122197

### Disertacijoje pateikta medžiaga pristatyta tarptautinėse konferencijose

1. **A. Mikalkėnas**, B. Ravoitytė, D. Tauraitė, J. Jakubovska, R. Meškys, S. Serva. Pyridone-based Nucleotide Analogues as Substrates of DNA Polymerases. XIV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society. 2016 birželio 28-30, Druskininkai, Lietuva. Stendinis pranešimas.
2. **A. Mikalkėnas**, B. Ravoitytė, D. Tauraitė, E. Servienė, R. Meškys, S. Serva. DNA polymerase inhibition with derivatives of pyrophosphoric acid analogues *in vitro*. XV International Conference of the Lithuanian Biochemical Society. 2018 birželio 26-29, Dubingiai, Lietuva. Stendinis pranešimas.
3. **A. Mikalkėnas**, B. Ravoitytė, D. Tauraitė, E. Servienė, R. Meškys, S. Serva. Conjugation of small molecule inhibitor to nucleobase promotes a mechanism-based inhibition. 43<sup>rd</sup> FEBS Congress. 2018 liepos 7-12, Praha, Čekija. Stendinis pranešimas.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abbink, T. E., and Berkhout, B. (2008). HIV-1 reverse transcription initiation: A potential target for novel antivirals? *Virus Research*, 134(1-2), 4-18. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.009
2. Aguiar, R. and Peterlin, B. (2008). APOBEC3 proteins and reverse transcription. *Virus Research*, 134(1-2), pp.74-85.
3. Ahluwalia, G., Cooney, D. A., Mitsuya, H., Fridland, A., Flora, K. P., Hao, Z., Dalal M., Broder S., Johns, D. G. (1987). Initial studies on the cellular pharmacology of 2', 3'-dideoxyinosine, an inhibitor of HIV infectivity. *Biochemical Pharmacology*, 36(22), 3797–3800. doi:10.1016/0006-2952(87)90440-0
4. Akari, H., Bour, S., Kao, S., Adachi, A., and Strebel, K. (2001). The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *The Journal of experimental medicine*, 194(9), 1299–1311. doi:10.1084/jem.194.9.1299
5. Andersson, S., Antonsson, M., Elebring, M., Jansson-Löfmark, R., and Weidolf, L. (2018). Drug metabolism and pharmacokinetic strategies for oligonucleotide- and mRNA-based drug development. *Drug Discovery Today*, 23(10), 1733–1745. doi:10.1016/j.drudis.2018.05.030
6. Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford S., Prévost M. C., Allen T. D., Charneau P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *The EMBO journal*, 26(12), 3025–3037. doi:10.1038/sj.emboj.7601740
7. Arion, D., Sluis-Cremer, N., and Parniak, M. A. (2000). Mechanism by Which Phosphonoformic Acid Resistance Mutations Restore 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT) Sensitivity to AZT-resistant HIV-1 Reverse Transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9251–9255. doi:10.1074/jbc.275.13.9251 March 31, 2000
8. Arndt, J. W., Gong, W., Zhong, X., Showalter, A. K., Liu, J., Dunlap, C. A., Lin Z., Paxson C., Tsai M. D., Chan, M. K. (2001). Insight into the Catalytic Mechanism of DNA Polymerase  $\beta$ : Structures of Intermediate Complexes. *Biochemistry*, 40(18), 5368–5375. doi:10.1021/bi002176j
9. Avidan, O., and Hizi, A. (1998). The processivity of DNA synthesis exhibited by drug-resistant variants of human immunodeficiency



- virus type-1 reverse transcriptase. *Nucleic acids research*, 26(7), 1713–1717. doi:10.1093/nar/26.7.1713
10. Avidan, O., Entin Meer, M., Oz, I. and Hizi, A. (2002). The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus. *European Journal of Biochemistry*, 269: 859-867. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02719.x
  11. Badorrek, C. S., and Weeks, K. M. (2005). RNA flexibility in the dimerization domain of a gamma retrovirus. *Nature Chemical Biology*, 1(2), 104–111. doi:10.1038/nchembio712
  12. Bakhanashvili, M., and Hizi, A. (1992). Fidelity of the RNA-dependent DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptases of human immunodeficiency virus types 1 and 2 and of murine leukemia virus: mispair extension frequencies. *Biochemistry*, 31(39), 9393–9398. doi:10.1021/bi00154a010
  13. Bakhanashvili, M., and Hizi, A. (1993). The fidelity of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses and murine leukemia virus, exhibited by the mispair extension frequencies, is sequence dependent and enzyme related. *FEBS Letters*, 319(1–2), 201–205. doi:10.1016/0014-5793(93)80067-5
  14. Bakhanashvili, M., Avidan, O., and Hizi, A. (1996). Mutational studies of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase : the involvement of residues 183 and 184 in the fidelity of DNA synthesis, *FEBS Letters*, 391, doi:10.1016/0014-5793(96)00747-8
  15. Baltimore, D. (1970). Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature*, 226(5252), 1209–1211. doi:10.1038/2261209a0
  16. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–871. doi:10.1126/science.6189183
  17. Basu, V. P., Song, M., Gao, L., Rigby, S. T., Hanson, M. N., and Bambara, R. A. (2008). Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Research*, 134(1–2), 19–38. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.017
  18. Beard, W. A., and Wilson, S. H. (2003). Structural insights into the origins of DNA polymerase fidelity. *Structure*, 11(5), 489–496. doi:10.1016/S0969-2126(03)00051-0

19. Bebenek, K., Beard, W. A., Casas-Finet, J. R., Kim, H.-R., Darden, T. A., Wilson, S. H., and Kunkel, T. A. (1995). Reduced Frameshift Fidelity and Processivity of HIV-1 Reverse Transcriptase Mutants Containing Alanine Substitutions in Helix H of the Thumb Subdomain. *Journal of Biological Chemistry*, 270(33), 19516–19523. doi:10.1074/jbc.270.33.19516
20. Bebenek, K., Beard, W. A., Darden, T. A., Li, L., Prasad, R., Luton, B. A., Gorenstein, D. G., Wilson, S. H., and Kunkel, T. A. (1997). A minor groove binding track in reverse transcriptase. *Nature Structural Biology*, 4(3), 194–197. doi:10.1038/nsb0397-194
21. Beese, L., Derbyshire, V., and Steitz, T. (1993). Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science*, 260(5106), 352–355. doi:10.1126/science.8469987
22. Berdis, A. J. (2009). Mechanisms of DNA Polymerases. *Chemical Reviews*, 109(7), 2862–2879. doi:10.1021/cr800530b
23. Bhattacharya, A., Alam, S. L., Fricke, T., Zadrozny, K., Sedzicki, J., Taylor, A. B., Demeler, B., Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B. K., Diaz-Griffero, F., Ivanov, D. N., and Yeager, M. (2014). Structural basis of HIV-1 capsid recognition by PF74 and CPSF6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(52), 18625–18630. doi:10.1073/pnas.1419945112
24. Biondi, E., Lane, J. D., Das, D., Dasgupta, S., Piccirilli, J. A., Hoshika, S., Bradley, K. M., Krantz, B. A., and Benner, S. A. (2016). Laboratory evolution of artificially expanded DNA gives redesignable aptamers that target the toxic form of anthrax protective antigen. *Nucleic Acids Research*, gkw890. doi:10.1093/nar/gkw890
25. Bour, S., Perrin, C., Akari, H., and Strebel, K. (2001). The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein Inhibits NF- $\kappa$ B Activation by Interfering with  $\beta$ TrCP-mediated Degradation of I $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15920–15928. doi:10.1074/jbc.M010533200
26. Boyer, P. L., Sarafianos, S. G., Arnold, E., and Hughes, S. H. (2001). Selective Excision of AZTMP by Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase. *Journal of Virology*, 75(10), 4832–4842. doi:10.1128/JVI.75.10.4832-4842.2001
27. Braithwaite, D. K., and Ito, J. (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic acids research*, 21(4), 787–802. doi:10.1093/nar/21.4.787

28. Campbell, E. M., and Hope, T. J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 471–483. doi:10.1038/nrmicro3503
29. Carell, T., Kurz, M. Q., Müller, M., Rossa, M., and Spada, F. (2018). Non-canonical Bases in the Genome: The Regulatory Information Layer in DNA. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(16), 4296–4312. doi:10.1002/anie.201708228
30. Cases-González, C. E., Gutiérrez-Rivas, M., and Menéndez-Arias, L. (2000). Coupling Ribose Selection to Fidelity of DNA Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19759–19767. doi:10.1074/jbc.M910361199
31. Cass, C. E., Young, J. D., Baldwin, S. A., Cabrita, M. A., Graham, K. A., Griffiths, M., Jennings, L. L., Mackey, J. R., Ng, A..M., Ritzel, M. W., Vickers, M. F., and Yao, S. Y. M. (1999). Nucleoside Transporters of Mammalian Cells. *Pharmaceutical Biotechnology*, 313–352. doi:10.1007/0-306-46812-3\_12
32. Champoux, J. J., and Schultz, S. J. (2009). Ribonuclease H: properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription. *The FEBS journal*, 276(6), 1506–1516. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06909.x
33. Charneau, P., Alizon, M., and Clavel, F. (1992). A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *Journal of virology*, 66(5), 2814–2820.
34. Cihlar, T., and Ray, A. S. (2010). Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral Research*, 85(1), 39–58. doi:10.1016/j.antiviral.2009.09.014
35. Cisneros, G. A., Perera, L., García-Díaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. A., and Pedersen, L. G. (2008). Catalytic mechanism of human DNA polymerase lambda with Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> from ab initio quantum mechanical/molecular mechanical studies. *DNA repair*, 7(11), 1824–1834. doi:10.1016/j.dnarep.2008.07.007
36. Clercq, E. D., and Holý, A. (2005). Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(11), 928–940. doi:10.1038/nrd1877
37. Coffin, M. J., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
38. Coté, M. L., and Roth, M. J. (2008). Murine leukemia virus reverse transcriptase: structural comparison with HIV-1 reverse

- transcriptase. *Virus research*, 134(1-2), 186–202.  
doi:10.1016/j.virusres.2008.01.001
39. Coté, M. L., Yohannan, S. J., and Georgiadis, M. M. (2000). Use of an N-terminal fragment from Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to facilitate crystallization and analysis of a pseudo-16-mer DNA molecule containing G–A mispairs. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 56(9), 1120–1131. doi:10.1107/S09074444900008246
  40. Cretton, E. M., Zhou, Z., Kidd, L. B., McClure, H. M., Kaul, S., Hitchcock, M. J., and Sommadossi, J. P. (1993). In vitro and in vivo disposition and metabolism of 3'-deoxy-2', 3'-didehydrothymidine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(9), 1816–1825.  
doi:10.1128/aac.37.9.1816
  41. Cretton, E.M., and Sommadossi, J.P. (1993). Reduction of 3'-azido-2', 3'-dideoxynucleosides to their 3'-amino metabolite is mediated by cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase in rat liver microsomes. *DrugMetab. Dispos.* 21, 946–950.
  42. Cruchaga, C., Ansó, E., Rouzaut, A., and Martínez-Irujo, J. J. (2006). Selective Excision of Chain-terminating Nucleotides by HIV-1 Reverse Transcriptase with Phosphonoformate as Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 27744–27752.  
doi:10.1074/jbc.M603360200
  43. Dahlberg, M. E., and Benkovic, S. J. (1991). Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow fragment): identification of a second conformational change and evaluation of the internal equilibrium constant. *Biochemistry*, 30(20), 4835–4843.  
doi:10.1021/bi00234a002
  44. Das, D., and Georgiadis, M. M. (2004). The Crystal Structure of the Monomeric Reverse Transcriptase from Moloney Murine Leukemia Virus. *Structure*, 12(5), 819–829. doi:10.1016/j.str.2004.02.032
  45. Das, K., Bandwar, R. P., White, K. L., Feng, J. Y., Sarafianos, S. G., Tuske, S., Tu, X., Clark, A. D. Jr, Boyer, P. L., Hou, X., Gaffney, B. L., Jones, R. A., Miller, M. D., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2009). Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. *The Journal of biological chemistry*, 284(50), 35092–35100. doi:10.1074/jbc.M109.022525
  46. Das, K., Martinez, S. E., Bauman, J. D., and Arnold, E. (2012). HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals

- non-nucleoside inhibition mechanism. *Nature structural and molecular biology*, 19(2), 253–259. doi:10.1038/nsmb.2223
47. Davies, J., Hostomska, Z., Hostomsky, Z., Jordan, and Matthews, D. (1991). Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*, 252(5002), 88–95. doi:10.1126/science.1707186
48. De Clercq, E. (2004). Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology*, 30(2), 115–133. doi:10.1016/j.jcv.2004.02.009
49. Debnath, U., Verma, S., Jain, S., Katti, S. B., and Prabhakar, Y. S. (2013). Pyridones as NNRTIs against HIV-1 mutants: 3D-QSAR and protein informatics. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(7), 637–654. doi:10.1007/s10822-013-9667-1
50. Derbyshire, V., Freemont, P., Sanderson, M., Beese, L., Friedman, J., Joyce, C., and Steitz, T. (1988). Genetic and crystallographic studies of the 3', 5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I. *Science*, 240(4849), 199–201. doi:10.1126/science.2832946
51. Deredge, D. J., Baker, J. T., Datta, K., and LiCata, V. J. (2010). The Glutamate Effect on DNA Binding by Pol I DNA Polymerases: Osmotic Stress and the Effective Reversal of Salt Linkage. *Journal of Molecular Biology*, 401(2), 223–238. doi:10.1016/j.jmb.2010.06.009
52. Derse, D., Bastow, K. F., and Cheng, Y. (1982). Characterization of the DNA polymerases induced by a group of herpes simplex virus type I variants selected for growth in the presence of phosphonoformic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 257(17), 10251–10260.
53. Ding, J., Das, K., Tantillo, C., Zhang, W., Clark, Jr, A., Jessen, S., Hsiou, Y., Jacobo-Molina, A., Andries, K., Pauwels, R., Moereels, H., Koymans, L., Janssen, P. A. J., Smith, R. H. Jr, Kroeger Koepke, M., Michejda, C. J., Hughes, S. H., and Arnold, E. (1995). Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non-nucleoside inhibitor  $\alpha$ -APA R 95845 at 2.8 Å resolution. *Structure*, 3(4), 365–379. doi:10.1016/S0969-2126(01)00168-X
54. Ding, J., Das, K., Hsiou, Y., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jacobo-Molina, A., Tantillo, C., Hughes, S. H., and Arnold, E. (1998). Structure and functional implications of the polymerase active site region in a complex of HIV-1 RT with a double-stranded DNA template-primer and an antibody fab fragment at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 284(4), 1095–1111. doi:10.1006/jmbi.1998.2208

55. Douglas, J. L., Viswanathan, K., McCarroll, M. N., Gustin, J. K., Früh, K., and Moses, A. V. (2009). Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta} TrCP-dependent mechanism. *Journal of virology*, 83(16), 7931–7947. doi:10.1128/JVI.00242-09
56. Dvorin, J. D., Bell, P., Maul, G. G., Yamashita, M., Emerman, M., and Malim, M. H. (2002). Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *Journal of virology*, 76(23), 12087–12096. doi:10.1128/jvi.76.23.12087-12096.2002
57. Eckert, K. A., and Kunkel, T. A. (1993). Effect of reaction pH on the fidelity and processivity of exonuclease-deficient Klenow polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(18), 13462–13471.
58. Entin-Meer, M., Avidan, O., and Hizi, A. (2003). The mature reverse transcriptase molecules in virions of mouse mammary tumor virus possess protease-derived sequences. *Virology*, 310(1), 157–162. doi:10.1016/S0042-6822(03)00113-2
59. Entin-Meer, M., Sevilya, Z., and Hizi, A. (2002). The role of phenylalanine-119 of the reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus in DNA synthesis, ribose selection and drug resistance. *The Biochemical journal*, 367(Pt 2), 381–391. doi:10.1042/BJ20020712
60. Eremeeva, E., and Herdewijn, P. (2019). Non canonical genetic material. *Current Opinion in Biotechnology*, 57, 25–33. doi:10.1016/j.copbio.2018.12.001
61. Esnouf, R., Ren, J., Ross, C., Jones, Y., Stammers, D., and Stuart, D. (1995). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2(4), 303–308. doi:10.1038/nsb0495-303
62. Esposito, F., Corona, A., and Tramontano, E. (2012). HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions. *Molecular biology international*, 2012, 586401. doi:10.1155/2012/586401
63. Freemont, P. S., Friedman, J. M., Beese, L. S., Sanderson, M. R., and Steitz, T. A. (1988). Cocrystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), 8924–8928. doi:10.1073/pnas.85.23.8924

64. Freemont, P. S., Ollis, D. L., Steitz, T. A., and Joyce, C. M. (1986). A domain of the klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I has polymerase but no exonuclease activity. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1(1), 66–73.  
doi:10.1002/prot.340010111
65. Frey, M. W., Sowers, L. C., Millar, D. P., and Benkovic, S. J. (1995). The nucleotide analog 2-aminopurine as a spectroscopic probe of nucleotide incorporation by the Klenow fragment of *Escherichia coli* polymerase I and bacteriophage T4 DNA polymerase. *Biochemistry*, 34(28), 9185-9192.  
doi:10.1021/bi00028a031
66. Friedberg, E. C., Feaver, W. J., and Gerlach, V. L. (2000). The many faces of DNA polymerases: strategies for mutagenesis and for mutational avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5681–5683.  
doi:10.1073/pnas.120152397
67. Fuller, C. W., Kumar, S., Porel, M., Chien, M., Bibillo, A., Stranges, P. B., Dorwart, M., Tao, C., Li, Z., Guo, W., Shi, S., Korenblum, D., Trans, A., Aguirre, A., Liu, E., Harada, E. T., Pollard, J., Bhat, A., Cech, C., Yang, A., Arnold, C., Palla, M., Hovis, J., Chen, R., Morozova, I., Kalachikov, S., Russo, J. J., Kasianowicz, J. J., Davis, R., Roeber, S., Church, G. M., and Ju, J. (2016). Real-time single-molecule electronic DNA sequencing by synthesis using polymer-tagged nucleotides on a nanopore array. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(19), 5233–5238. doi:10.1073/pnas.1601782113
68. Furman, P. A., Fyfe, J. A., St Clair, M. H., Weinhold, K., Rideout, J. L., Freeman, G. A., Lehrman, S. N., Bolognesi, D. P., Broder, S., Mitsuya, H., and Mitsuya, H. (1986). Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(21), 8333–8337. doi:10.1073/pnas.83.21.8333
69. Gangurde, R., Kaushik, N., Singh, K., and Modak, M. J. (2000). A Carboxylate Triad Is Essential for the Polymerase Activity of *Escherichia coli* DNA Polymerase I (Klenow Fragment). *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19685–19692.  
doi:10.1074/jbc.M002307200
70. Gao, G., Orlova, M., Georgiadis, M. M., Hendrickson, W. A., and Goff, S. P. (1997). Conferring RNA polymerase Activity to a DNA

- polymerase: A single residue in reverse transcriptase controls substrate selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2), 407–411. doi:10.1073/pnas.94.2.407
71. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J. M., Pedersen, L. C., and Kunkel, T. A. (2007). Role of the catalytic metal during polymerization by DNA polymerase lambda. *DNA Repair*, 6(9), 1333–1340. doi:10.1016/j.dnarep.2007.03.005
  72. Georgiadis, M. M., Jessen, S. M., Ogata, C. M., Telesnitsky, A., Goff, S. P., and Hendrickson, W. A. (1995). Mechanistic implications from the structure of a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *Structure*, 3(9), 879–892. doi:10.1016/S0969-2126(01)00223-4
  73. Ghosh, M., Williams, J., Powell, M. D., Levin, J. G., and Le Grice, S. F. J. (1997). Mutating a Conserved Motif of the HIV-1 Reverse Transcriptase Palm Subdomain Alters Primer Utilization†. *Biochemistry*, 36(19), 5758–5768. doi:10.1021/bi963045e
  74. Golinelli, M.-P., and Hughes, S. H. (2002). Nontemplated Base Addition by HIV-1 RT Can Induce Nonspecific Strand Transfer in Vitro. *Virology*, 294(1), 122–134. doi:10.1006/viro.2001.1322
  75. Goodwin, S., McPherson, J. D., and McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49
  76. Gotte, M. (2006). Effects of Nucleotides and Nucleotide Analogue Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase in a Ratchet Model of Polymerase Translocation. *Current Pharmaceutical Design*, 12(15), 1867–1877. doi:10.2174/138161206776873626
  77. Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *New England Journal of Medicine*, 305(24), 1425–1431. doi:10.1056/NEJM198112103052401
  78. Grobler, J. A., Dornadula, G., Rice, M. R., Simcoe, A. L., Hazuda, D. J., and Miller, M. D. (2006). HIV-1 Reverse Transcriptase Plus-strand Initiation Exhibits Preferential Sensitivity to Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 282(11), 8005–8010. doi:10.1074/jbc.M608274200
  79. Gross, L. (1951). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-



- embryos. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 76(1), 27-32.
80. Gross, L. (1957). Development and serial cellfree passage of a highly potent strain of mouse leukemia virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 94(4), 767-771.
81. Guajardo, R., and Sousa, R. (1997). A model for the mechanism of polymerase translocation 1 Edited by A. R. Fersht. *Journal of Molecular Biology*, 265(1), 8–19. doi:10.1006/jmbi.1996.0707
82. Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M., and Sharp, P. M. (2000). AIDS as a Zoonosis: Scientific and Public Health Implications. *Science*, 287(5453), 607–614. doi:10.1126/science.287.5453.607
83. Hameau, L., Jeusset, J., Lafosse, S., Coulaud, D., Delain, E., Unge, T., Restle, T., Le Cam, E., and Mirambeau, G. (2001). Human immunodeficiency virus type 1 central DNA flap: dynamic terminal product of plus-strand displacement dna synthesis catalyzed by reverse transcriptase assisted by nucleocapsid protein. *Journal of virology*, 75(7), 3301–3313. doi:10.1128/JVI.75.7.3301-3313.2001
84. Haracska, L., Acharya, N., Unk, I., Johnson, R. E., Hurwitz, J., Prakash, L., and Prakash, S. (2005). A single domain in human DNA polymerase iota mediates interaction with PCNA: implications for translesion DNA synthesis. *Molecular and cellular biology*, 25(3), 1183–1190. doi:10.1128/MCB.25.3.1183-1190.2005
85. Harris, D., Lee, R., Misra, H. S., Pandey, P. K., and Pandey, V. N. (1998). The p51 Subunit of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Is Essential in Loading the p66 Subunit on the Template Primer. *Biochemistry*, 37(17), 5903–5908. doi:10.1021/bi9728452
86. Harris, K. S., Brabant, W., Styrchak, S., Gall, A., and Daifuku, R. (2005). KP-1212/1461, a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis. *Antiviral Research*, 67(1), 1–9. doi:10.1016/j.antiviral.2005.03.004
87. Hayakawa, H., Kohgo, S., Kitano, K., Ashida, N., Kodama, E., Mitsuya, H., and Ohrui, H. (2004). Potential of 4'-C-Substituted Nucleosides for the Treatment of HIV-1. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 15(4), 169–187. doi:10.1177/095632020401500401
88. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2012). NF- B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes and Development*, 26(3), 203–234. doi:10.1101/gad.183434.111
89. Hediger, M. A., Romero, M. F., Peng, J.-B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E. A. (2004). The ABCs of solute carriers:

- physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 465–468. doi:10.1007/s00424-003-1192-y
90. Herman, B. D., Schinazi, R. F., Zhang, H. W., Nettles, J. H., Stanton, R., Detorio, M., Obikhod, A., Pradère, U., Coats, S. J., Mellors, J. W., and Sluis-Cremer, N. (2012). Substrate mimicry: HIV-1 reverse transcriptase recognizes 6-modified-3'-azido-2', 3'-dideoxyguanosine-5'-triphosphates as adenosine analogs. *Nucleic acids research*, 40(1), 381–390. doi:10.1093/nar/gkr756
91. Herschhorn, A., and Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16), 2717–2747. doi:10.1007/s00018-010-0346-2
92. Herschlag, D., Piccirilli, J. A., and Cech, T. R. (1991). Ribozyme-catalyzed and nonenzymic reactions of phosphate diesters: rate effects upon substitution of sulfur for a nonbridging phosphoryl oxygen atom. *Biochemistry*, 30(20), 4844–4854. doi:10.1021/bi00234a003
93. Hizi A. (2008). The reverse transcriptase of the Tf1 retrotransposon has a specific novel activity for generating the RNA self-primer that is functional in cDNA synthesis. *Journal of virology*, 82(21), 10906–10910. doi:10.1128/JVI.01370-08
94. Hizi, A., and Herschhorn, A. (2008). Retroviral reverse transcriptases (other than those of HIV-1 and murine leukemia virus): A comparison of their molecular and biochemical properties. *Virus Research*, 134(1–2), 203–220. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.008
95. Hizi, A., and Joklik, W. K. (1977). RNA-dependent DNA polymerase of avian sarcoma virus B77. I. Isolation and partial characterization of the alpha, beta2, and alpha beta forms of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 252(7), 2281–2289.
96. Hizi, A., Leis, J. P., and Joklik, W.K. (1977) RNA-dependent DNA polymerase of avian sarcoma virus B77. II. Comparison of the catalytic properties of the alpha, beta2, and alpha beta enzyme forms. *The Journal of biological chemistry*, 252(7), 2290–2295.
97. Hizi, A., McGill, C., and Hughes, S. H. (1988). Expression of soluble, enzymatically active, human immunodeficiency virus reverse transcriptase in *Escherichia coli* and analysis of mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(4), 1218–1222. doi:10.1073/pnas.85.4.1218

98. Hollenstein M. (2012). Nucleoside triphosphates--building blocks for the modification of nucleic acids. *Molecules* (Basel, Switzerland), 17(11), 13569–13591.  
doi:10.3390/molecules171113569
99. Hottin, A., and Marx, A. (2016). Structural Insights into the Processing of Nucleobase-Modified Nucleotides by DNA Polymerases. *Accounts of Chemical Research*, 49(3), 418–427.  
doi:10.1021/acs.accounts.5b00544
100. Houlihan, G., Arangundy-Franklin, S., and Holliger, P. (2017). Engineering and application of polymerases for synthetic genetics. *Current Opinion in Biotechnology*, 48, 168–179.  
doi:10.1016/j.copbio.2017.04.004
101. Hsieh, J. C., Zinnen, S., and Modrich, P. (1993). Kinetic mechanism of the DNA-dependent DNA polymerase activity of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *The Journal of biological chemistry*, 268(33), 24607-24613.
102. Hsiou, Y., Ding, J., Das, K., Clark, Jr, A., Hughes, S., and Arnold, E. (1996). Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure*, 4(7), 853–860.  
doi:10.1016/S0969-2126(96)00091-3
103. Hu, W. S., and Hughes, S. H. (2012). HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), a006882–a006882. doi:10.1101/cshperspect.a006882
104. Huang, W., Gamarnik, A., Limoli, K., Petropoulos, C. J., and Whitcomb, J. M. (2003). Amino acid substitutions at position 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increase susceptibility to delavirdine and impair virus replication. *Journal of virology*, 77(2), 1512–1523. doi:10.1128/jvi.77.2.1512-1523.2003
105. Hunter P. (2013). XNA marks the spot. What can we learn about the origins of life and the treatment of disease through artificial nucleic acids?. *EMBO reports*, 14(5), 410–413.  
doi:10.1038/embor.2013.42
106. Hwang, G. T., Leconte, A. M., and Romesberg, F. E. (2007). Polymerase Recognition and Stability of Fluoro-Substituted Pyridone Nucleobase Analogues. *ChemBioChem*, 8(13), 1606–1611.  
doi:10.1002/cbic.200700308
107. Imaoka, T., Kusuhara, H., Adachi, M., Schuetz, J. D., Takeuchi, K., and Sugiyama, Y. (2006). Functional Involvement of Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4/ABCC4) in the Renal

- Elimination of the Antiviral Drugs Adefovir and Tenofovir.  
*Molecular Pharmacology*, 71(2), 619–627.  
doi:10.1124/mol.106.028233
108. Ishikawa, K., Okumura, M., Katayanagi, K., Kimura, S., Kanaya, S., Nakamura, H., and Morikawa, K. (1993). Crystal Structure of Ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8 Refined at 2.8 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 230(2), 529–542.  
doi:10.1006/jmbi.1993.1169
109. Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. (2009). HIV-1 Accessory Protein Vpu Internalizes Cell-surface BST-2/Tetherin through Transmembrane Interactions Leading to Lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 35060–35072.  
doi:10.1074/jbc.M109.058305
110. Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark, A. D., Jr, Lu, X., Tantillo, C., Williams, R. L., Kamer, G., Ferris, A. L., Clark, P., Hizi A., Hughes, S. H., and Arnold, E. (1993). Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), 6320–6324. doi:10.1073/pnas.90.13.6320
111. Johnson, K. A. (1993). Conformational Coupling in DNA Polymerase Fidelity. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 685–713. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.003345
112. Johnson, S. J., Taylor, J. S., and Beese, L. S. (2003). Processive DNA synthesis observed in a polymerase crystal suggests a mechanism for the prevention of frameshift mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3895–3900. doi:10.1073/pnas.0630532100
113. Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F., and Dumontet, C. (2013). Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(6), 447–464. doi:10.1038/nrd4010
114. Julias, J. G., McWilliams, M. J., Sarafianos, S. G., Arnold, E., and Hughes, S. H. (2002). Mutations in the RNase H domain of HIV-1 reverse transcriptase affect the initiation of DNA synthesis and the specificity of RNase H cleavage in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9515–9520. doi:10.1073/pnas.142123199

115. Kakuda, T. N. (2000). Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clinical Therapeutics*, 22(6), 685–708. doi:10.1016/S0149-2918(00)90004-3
116. Kamtekar, S., Berman, A. J., Wang, J., Lázaro, J. M., de Vega, M., Blanco, L., Salas, M., and Steitz, T. A. (2004). Insights into Strand Displacement and Processivity from the Crystal Structure of the Protein-Primed DNA Polymerase of Bacteriophage  $\phi$ 29. *Molecular Cell*, 16(4), 609–618. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.019
117. Kati, W. M., Johnson, K. A., Jerva, L. F., and Anderson, K. S. (1992) Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *The Journal of biological chemistry*, 267(36), 25988-25997.
118. Kawamoto, A., Kodama, E., Sarafianos, S. G., Sakagami, Y., Kohgo, S., Kitano, K., Ashida, N., Iwai, Y., Hayakawa, H., Nakata, H., Mitsuya, H., Arnold, E., and Nakata, H. (2008). 2'-Deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(11), 2410–2420. doi:10.1016/j.biocel.2008.04.007
119. Kelman, Z., Hurwitz, J., and O'Donnell, M. (1998). Processivity of DNA polymerases: two mechanisms, one goal. *Structure*, 6(2), 121–125. doi:10.1016/S0969-2126(98)00014-8
120. Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Hünig, T., Schimpl, A., and Schubert, U. (1997). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *The Journal of experimental medicine*, 185(7), 1295–1305. doi:10.1084/jem.185.7.1295
121. Kiefer, J. R., Mao, C., Braman, J. C., and Beese, L. S. (1998). Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature*, 391(6664), 304–307. doi:10.1038/34693
122. Kim, C. H., and Tinoco, I., Jr (2000). A retroviral RNA kissing complex containing only two G.C base pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9396–9401. doi:10.1073/pnas.170283697
123. Kim, Y., Eom, S. H., Wang, J., Lee, D.-S., Suh, S. W., and Steitz, T. A. (1995). Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nature*, 376(6541), 612–616. doi:10.1038/376612a0
124. Kimoto, M., Yamashige, R., Matsunaga, K., Yokoyama, S., and Hirao, I. (2013). Generation of high-affinity DNA aptamers using an

- expanded genetic alphabet. *Nature Biotechnology*, 31(5), 453–457.  
doi:10.1038/nbt.2556
125. Kirshenboim, N., Hayouka, Z., Friedler, A., and Hizi, A. (2007). Expression and characterization of a novel reverse transcriptase of the LTR retrotransposon Tf1. *Virology*, 366(2), 263–276.  
doi:10.1016/j.virol.2007.04.002
126. Klenow, H., and Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 65(1), 168–175. doi:10.1073/pnas.65.1.168
127. Knowles, J. R. (1980). Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), 877–919.  
doi:10.1146/annurev.bi.49.070180.004305
128. Kohler, J. J., and Lewis, W. (2007). A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48(3–4), 166–172.  
doi:10.1002/em.20223
129. Kohlstaedt, L., Wang, J., Friedman, J., Rice, P., and Steitz, T. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256(5065), 1783–1790. doi:10.1126/science.1377403
130. Kreil, G. (1997). D-amino acids in animal peptides. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 337–345.  
doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.337
131. Kropp, H. M., Dürr, S. L., Peter, C., Diederichs, K., and Marx, A. (2018). Snapshots of a modified nucleotide moving through the confines of a DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(40), 9992–9997. doi:10.1073/pnas.1811518115
132. Kukko, E., and Heinonen, J. (1982). The Intracellular Concentration of Pyrophosphate in the Batch Culture of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 127(2), 347–349. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb06878.x
133. Lansdon, E. B., Samuel, D., Lagpacan, L., Brendza, K. M., White, K. L., Hung, M., Liu, X., Boojamra, C. G., Mackman, R. L., Cihlar, T., Ray, A. S., McGrath, M. E., and Swaminathan, S. (2010). Visualizing the Molecular Interactions of a Nucleotide Analog, GS-9148, with HIV-1 Reverse Transcriptase–DNA Complex. *Journal of Molecular Biology*, 397(4), 967–978. doi:10.1016/j.jmb.2010.02.019

134. Lapa, S. A., Chudinov, A. V., and Timofeev, E. N. (2015). The Toolbox for Modified Aptamers. *Molecular Biotechnology*, 58(2), 79–92. doi:10.1007/s12033-015-9907-9
135. Le Grice, S. F. J. (2003). “In the Beginning”: Initiation of Minus Strand DNA Synthesis in Retroviruses and LTR-Containing Retrotransposons. *Biochemistry*, 42(49), 14349–14355. doi:10.1021/bi030201q
136. Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., and Kornberg, A. (1958). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 233(1), 163-170.
137. Levin, H. L. (1997). It’s Prime Time for Reverse Transcriptase. *Cell*, 88(1), 5–8. doi:10.1016/S0092-8674(00)81851-6
138. Lewis, W., Day, B. J., and Copeland, W. C. (2003). Mitochondrial toxicity of nrti antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(10), 812–822. doi:10.1038/nrd1201
139. Li, Y., and Waksman, G. (2001). Bacterial DNA Polymerase I. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi:10.1038/npg.els.0001043
140. Li, Y., Korolev, S., and Waksman, G. (1998). Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *The EMBO journal*, 17(24), 7514–7525. doi:10.1093/emboj/17.24.7514
141. Lieber, M. R. (1997). The FEN-1 family of structure-specific nucleases in eukaryotic dna replication, recombination and repair. *BioEssays*, 19(3), 233–240. doi:10.1002/bies.950190309
142. Lightfoote, M. M., Coligan, J. E., Folks, T. M., Fauci, A. S., Martin, M. A., and Venkatesan, S. (1986). Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Journal of virology*, 60(2), 771–775.
143. Lim, D., Gregorio, G. G., Bingman, C., Martinez-Hackert, E., Hendrickson, W. A., and Goff, S. P. (2006). Crystal structure of the moloney murine leukemia virus RNase H domain. *Journal of virology*, 80(17), 8379–8389. doi:10.1128/JVI.00750-06
144. Limón, A., Nakajima, N., Lu, R., Ghory, H. Z., and Engelman, A. (2002). Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the

- central DNA flap. *Journal of virology*, 76(23), 12078–12086.  
doi:10.1128/jvi.76.23.12078-12086.2002
145. Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T. R. (1997). Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science*, 276(5312), 561–567.  
doi:10.1126/science.276.5312.561
146. Loeb, L. A., Essigmann, J. M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K. D., and Mullins, J. I. (1999). Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1492–1497.  
doi:10.1073/pnas.96.4.1492
147. Lu, D., Wu, H., Yarla, N., Xu, B., Ding, J. and Lu, T. (2018). HAART in HIV/AIDS Treatments: Future Trends. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 18(1), pp.15-22.  
doi:10.2174/1871526517666170505122800
148. Mace, D. C., and Alberts, B. M. (1984). T4 DNA polymerase. Rates and processivity on single-stranded DNA templates. *Journal of Molecular Biology*, 177(2), 295–311. doi:10.1016/0022-2836(84)90458-3
149. Maga, G., Radi, M., Gerard, M. A., Botta, M., and Ennifar, E. (2010). HIV-1 RT Inhibitors with a Novel Mechanism of Action: NNRTIs that Compete with the Nucleotide Substrate. *Viruses*, 2(4), 880–899. doi:10.3390/v2040880
150. Magadán, J. G., Pérez-Victoria, F. J., Sougrat, R., Ye, Y., Strelbel, K., and Bonifacino, J. S. (2010). Multilayered mechanism of CD4 downregulation by HIV-1 Vpu involving distinct ER retention and ERAD targeting steps. *PLoS pathogens*, 6(4), e1000869.  
doi:10.1371/journal.ppat.1000869
151. Malyshev, D. A., Dhami, K., Lavergne, T., Chen, T., Dai, N., Foster, J. M., Corrêa I. R. Jr, and Romesberg, F. E. (2014). A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature*, 509(7500), 385–388. doi:10.1038/nature13314
152. Mansky, L. M., Preveral, S., Selig, L., Benarous, R., and Benichou, S. (2000). The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *Journal of virology*, 74(15), 7039–7047.  
doi:10.1128/jvi.74.15.7039-7047.2000
153. Marchand, B., and Götte, M. (2003). Site-specific Footprinting Reveals Differences in the Translocation Status of HIV-1 Reverse



- Transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35362–35372. doi:10.1074/jbc.M304262200
154. Marchand, B., Tchesnokov, E. P., and Götte, M. (2006). The Pyrophosphate Analogue Foscarnet Traps the Pre-translocational State of HIV-1 Reverse Transcriptase in a Brownian Ratchet Model of Polymerase Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 3337–3346. doi:10.1074/jbc.M607710200
155. Margottin, F., Bour, S. P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., ... Benarous, R. (1998). A Novel Human WD Protein, h- $\beta$ TrCP, that Interacts with HIV-1 Vpu Connects CD4 to the ER Degradation Pathway through an F-Box Motif. *Molecular Cell*, 1(4), 565–574. doi:10.1016/S1097-2765(00)80056-8
156. Marsden, M. D., and Zack, J. A. (2007). Human immunodeficiency virus bearing a disrupted central DNA flap is pathogenic in vivo. *Journal of virology*, 81(11), 6146–6150. doi:10.1128/JVI.00203-07
157. Mathiesen, S., Roge, B. T., Weis, N., Lundgren, J. D., Obel, N., and Gerstoft, J. (2004). Foscarnet used in salvage therapy of HIV-1 patients harbouring multiple nucleotide excision mutations. *AIDS*, 18(7), 1076-1078.
158. Matsunaga, K., Kimoto, M., and Hirao, I. (2016). High-Affinity DNA Aptamer Generation Targeting von Willebrand Factor A1-Domain by Genetic Alphabet Expansion for Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Using Two Types of Libraries Composed of Five Different Bases. *Journal of the American Chemical Society*, 139(1), 324–334. doi:10.1021/jacs.6b10767
159. Maxwell, B. A., and Suo, Z. (2014). Recent Insight into the Kinetic Mechanisms and Conformational Dynamics of Y-Family DNA Polymerases. *Biochemistry*, 53(17), 2804–2814. doi:10.1021/bi5000405
160. McDowell, J. A., Chittick, G. E., Ravitch, J. R., Polk, R. E., Kerkering, T. M., and Stein, D. S. (1999). Pharmacokinetics of [(14C)abacavir, a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase inhibitor, administered in a single oral dose to HIV-1-infected adults: a mass balance study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(12), 2855–2861.
161. Medina-Franco, J. L., Martínez-Mayorga, K., Juárez-Gordiano, C., and Castillo, R. (2007). Pyridin-2(1H)-ones: A Promising Class of HIV-1 Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. *ChemMedChem*, 2(8), 1141–1147. doi:10.1002/cmdc.200700054

162. Menéndez-Arias L. (2009). Mutation rates and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases. *Viruses*, 1(3), 1137–1165.  
doi:10.3390/v1031137
163. Menéndez-Arias, L. (2002). Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 71, 91-147.
164. Menéndez-Arias, L. (2008). Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Research*, 134(1–2), 124–146. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.015
165. Menéndez-Arias, L., and Berkhout, B. (2008). Retroviral reverse transcription. *Virus Research*, 134(1–2), 1–3.  
doi:10.1016/j.virusres.2008.01.009
166. Menéndez-Arias, L., Sebastián-Martín, A., and Álvarez, M. (2017). Viral reverse transcriptases. *Virus Research*, 234, 153–176.  
doi:10.1016/j.virusres.2016.12.019
167. Merta, A., Votruba, I., Jindřich, J., Holý, A., Cihlář, T., Rosenberg, I., ... Herve, T. Y. (1992). Phosphorylation of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine and 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine by AMP (dAMP) kinase from L1210 cells. *Biochemical Pharmacology*, 44(10), 2067–2077.  
doi:10.1016/0006-2952(92)90110-5
168. Meteor, J. D., Schinazi, R. F., Mellors, J. W., and Sluis-Cremer, N. (2013). Molecular mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-2',3'-dideoxyguanosine. *Antiviral research*, 101, 62–67.  
doi:10.1016/j.antiviral.2013.10.017
169. Meyer, P. R., Matsuura, S. E., So, A. G., and Scott, W. A. (1998). Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13471–13476.  
doi:10.1073/pnas.95.23.13471
170. Meyer, P. R., Matsuura, S. E., Zonarich, D., Chopra, R. R., Pendarvis, E., Bazmi, H. Z., Mellors, J. W., and Scott, W. A. (2003). Relationship between 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance and primer unblocking activity in foscarnet-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Journal of virology*, 77(11), 6127–6137. doi:10.1128/jvi.77.11.6127-6137.2003
171. Meyer, P. R., Smith, A. J., Matsuura, S. E., and Scott, W. A. (2006). Chain-terminating dinucleoside tetraphosphates are substrates for

- DNA polymerization by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with increased activity against thymidine analogue-resistant mutants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), 3607–3614. doi:10.1128/AAC.00537-06
172. Michailidis, E., Marchand, B., Kodama, E. N., Singh, K., Matsuoka, M., Kirby, K. A., Ryan, E. M., Sawani, A. M., Nagy, E., Ashida, N., Mitsuya, H., Parniak, M. A., and Sarafianos, S. G. (2009). Mechanism of Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase by 4'-Ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine Triphosphate, a Translocation-defective Reverse Transcriptase Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 284(51), 35681–35691. doi:10.1074/jbc.M109.036616
173. Mikalkėnas A. (2014). Mažamolekulinio junginio ir nukleotido konjugatų panaudojimas virusinės polimerazės slopinimui: magistro darbas. Vilniaus Universitetas, Vilnius.
174. Misra, H. S., Pandey, P. K., and Pandey, V. N. (1998). An Enzymatically Active Chimeric HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) with the RNase-H Domain of Murine Leukemia Virus RT Exists as a Monomer. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9785–9789. doi:10.1074/jbc.273.16.9785
175. Mizrahi, V., Benkovic, P., and Benkovic, S. J. (1986). Mechanism of DNA polymerase I: exonuclease/polymerase activity switch and DNA sequence dependence of pyrophosphorolysis and misincorporation reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(16), 5769–5773. doi:10.1073/pnas.83.16.5769
176. Mizrahi, V., Henrie, R. N., Marlier, J. F., Johnson, K. A., and Benkovic, S. J. (1985). Rate-limiting steps in the DNA polymerase I reaction pathway. *Biochemistry*, 24(15), 4010–4018. doi:10.1021/bi00336a031
177. Moldovan, G.-L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, 129(4), 665–679. doi:10.1016/j.cell.2007.05.003
178. Moloney, J. B. (1960). Biological Studies on a Lymphoid-Leukemia Virus Extracted From Sarcoma 37. I. Origin and Introductory Investigations. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. doi:10.1093/jnci/24.4.933
179. Moon, A. F., Garcia-Diaz, M., Batra, V. K., Beard, W. A., Bebenek, K., Kunkel, T. A., Wilson, S. H., and Pedersen, L. C. (2007). The X family portrait: structural insights into biological functions of X

- family polymerases. *DNA repair*, 6(12), 1709–1725.  
doi:10.1016/j.dnarep.2007.05.009
180. Morihara, K., Kasahara, Y., and Obika, S. (2017). Biological applications of xeno nucleic acids. *Molecular BioSystems*, 13(2), 235–245. doi:10.1039/c6mb00538a
181. Naeger, L. K., Margot, N. A., and Miller, M.D. (2001). Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication. *Antiviral therapy*, 6(2), 115-126.
182. Najmudin, S., Coté, M. L., Sun, D., Yohannan, S., Montano, S. P., Gu, J., and Georgiadis, M. M. (2000). Crystal structures of an N-terminal fragment from moloney murine leukemia virus reverse transcriptase complexed with nucleic acid: functional implications for template-primer binding to the fingers domain 1 Edited by D. C. Rees. *Journal of Molecular Biology*, 296(2), 613–632.  
doi:10.1006/jmbi.1999.3477
183. Nolan, D., and Mallal, S. (2004). Complications associated with NRTI therapy: update on clinical features and possible pathogenic mechanisms. *Antiviral therapy*, 9(6), 849-863.
184. Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Crouch, R. J., and Yang, W. (2005). Crystal Structures of RNase H Bound to an RNA/DNA Hybrid: Substrate Specificity and Metal-Dependent Catalysis. *Cell*, 121(7), 1005–1016. doi:10.1016/j.cell.2005.04.024
185. Öberg, B. (1982). Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacology and Therapeutics*, 19(3), 387–415.  
doi:10.1016/0163-7258(82)90074-2
186. Oberthür, D., Achenbach, J., Gabdulkhakov, A., Buchner, K., Maasch, C., Falke, S., Rehders, D., Klussmann, S., and Betzel, C. (2015). Crystal structure of a mirror-image L-RNA aptamer (Spiegelmer) in complex with the natural L-protein target CCL2. *Nature communications*, 6, 6923. doi:10.1038/ncomms7923
187. Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G., and Steitz, T. A. (1985). Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature*, 313(6005), 762–766.  
doi:doi:10.1038/313762a0 DO
188. Oude Essink, B. B., Back, N. K., and Berkhout, B. (1997). Increased polymerase fidelity of the 3TC-resistant variants of HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic acids research*, 25(16), 3212–3217.  
doi:10.1093/nar/25.16.3212

189. Overby, L. R., Duff, R. G., and Mao, J. C.-H. (1977). ANTIVIRAL POTENTIAL OF PHOSPHONOACETIC ACID. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 284(1 Third Confere), 310–320. doi:10.1111/j.1749-6632.1977.tb21966.x
190. Palumbo, C. M., and Beal, P. A. (2019). Nucleoside analogs in the study of the epitranscriptome. *Methods*, 156, 46–52. doi:10.1016/j.ymeth.2018.10.014
191. Pandey, P. K., Kaushik, N., Talele, T. T., Yadav, P. N., and Pandey, V. N. (2001). Insertion of a peptide from MuLV RT into the connection subdomain of HIV-1 RT results in a functionally active chimeric enzyme in monomeric conformation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 225(1), 135-144.
192. Parisini, E., Metrangolo, P., Pilati, T., Resnati, G., and Terraneo, G. (2011). Halogen bonding in halocarbon–protein complexes: a structural survey. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2267. doi:10.1039/c0cs00177e
193. Parker, A. J., Stewart, J., Donald, K. J., and Parish, C. A. (2012). Halogen Bonding in DNA Base Pairs. *Journal of the American Chemical Society*, 134(11), 5165–5172. doi:10.1021/ja2105027
194. Patel, P. H., and Preston, B. D. (1994). Marked infidelity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase at RNA and DNA template ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2), 549–553. doi:10.1073/pnas.91.2.549
195. Patel, P. H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A., and Loeb, L. A. (2001). Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and “base flipping” mechanism for nucleotide selection. *Journal of Molecular Biology*, 308(5), 823–837. doi:10.1006/jmbi.2001.4619
196. Pech, A., Achenbach, J., Jahnz, M., Schülzchen, S., Jarosch, F., Bordusa, F., and Klussmann, S. (2017). A thermostable d-polymerase for mirror-image PCR. *Nucleic acids research*, 45(7), 3997–4005. doi:10.1093/nar/gkx079
197. Pelletier, H., Sawaya, M., Kumar, A., Wilson, S., and Kraut, J. (1994). Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, 264(5167), 1891–1903. doi:10.1126/science.7516580
198. Perach, M., and Hizi, A. (1999). Catalytic Features of the Recombinant Reverse Transcriptase of Bovine Leukemia Virus Expressed in Bacteria. *Virology*, 259(1), 176–189. doi:10.1006/viro.1999.9761

199. Perez-Caballero, D., Zang, T., Ebrahimi, A., McNatt, M. W., Gregory, D. A., Johnson, M. C., and Bieniasz, P. D. (2009). Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell*, 139(3), 499–511. doi:10.1016/j.cell.2009.08.039
200. Pinheiro, V. B., and Holliger, P. (2014). Towards XNA nanotechnology: new materials from synthetic genetic polymers. *Trends in biotechnology*, 32(6), 321–328. doi:10.1016/j.tibtech.2014.03.010
201. Polesky, A. H., Dahlberg, M. E., Benkovic, S. J., Grindley, N. D., and Joyce, C. M. (1992). Side chains involved in catalysis of the polymerase reaction of DNA polymerase I from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 267(12), 8417-8428.
202. Polesky, A. H., Steitz, T. A., Grindley, N. D., and Joyce, C. M. (1990). Identification of residues critical for the polymerase activity of the Klenow fragment of DNA polymerase I from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 265(24), 14579-14591.
203. Pontikis, R., Dollé, V., Guillaumel, J., Dechaux, E., Note, R., Nguyen, C. H., Legraverend, M., Bisagni, E., Aubertin, A. M., Grierson, D. S., and Monneret, C. (2000). Synthesis and Evaluation of “AZT-HEPT”, “AZT-Pyridinone”, and “ddC-HEPT” Conjugates as Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(10), 1927–1939. doi:10.1021/jm9911251
204. Prakash, S., and Prakash, L. (2002). Translesion DNA synthesis in eukaryotes: A one- or two-polymerase affair. *Genes and Development*, 16(15), 1872–1883. doi:10.1101/gad.1009802
205. Price, A. J., Jacques, D. A., McEwan, W. A., Fletcher, A. J., Essig, S., Chin, J. W., Halambage, U. D., Aiken, C., and James, L. C. (2014). Host cofactors and pharmacologic ligands share an essential interface in HIV-1 capsid that is lost upon disassembly. *PLoS pathogens*, 10(10), e1004459. doi:10.1371/journal.ppat.1004459
206. Prizan-Ravid, A., Elis, E., Laham-Karam, N., Selig, S., Ehrlich, M., and Bacharach, E. (2010). The Gag cleavage product, p12, is a functional constituent of the murine leukemia virus pre-integration complex. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001183. doi:10.1371/journal.ppat.1001183
207. Puglia, J., Wang, T., Smith-Snyder, C., Cote, M., Scher, M., Pelletier, J. N., John, S., Jonsson, C. B., and Roth, M. J. (2006). Revealing domain structure through linker-scanning analysis of the murine leukemia virus (MuLV) RNase H and MuLV and human

- immunodeficiency virus type 1 integrase proteins. *Journal of virology*, 80(19), 9497–9510. doi:10.1128/JVI.00856-06
208. Rachofsky, E., Ross, J. B., and Osman, R. (2001). Conformation and Dynamics of Normal and Damaged DNA. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 4(8), 675–706. doi:10.2174/1386207013330706
209. Raia, P., Delarue, M., and Sauguet, L. (2019). An updated structural classification of replicative DNA polymerases. *Biochemical Society Transactions*, 47(1), 239–249. doi:10.1042/BST20180579
210. Ramzaeva, N., Eickmeier, H., and Rosemeyer, H. (2014). Extraordinary Thermal Stability of an Oligodeoxynucleotide Octamer Constructed from Alternating 7-Deaza-7-iodo guanine and 5-Iodocytosine Base Pairs - DNA Duplex Stabilization by Halogen Bonds? *Chemistry & Biodiversity*, 11(4), 532–541. doi:10.1002/cbdv.201300300
211. Raper, A. T., Reed, A. J., and Suo, Z. (2018). Kinetic Mechanism of DNA Polymerases: Contributions of Conformational Dynamics and a Third Divalent Metal Ion. *Chemical Reviews*, 118(12), 6000–6025. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00685
212. Rausch, J. (2004). ‘Binding, bending and bonding’: polypurine tract-primed initiation of plus-strand DNA synthesis in human immunodeficiency virus. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(9), 1752–1766. doi:10.1016/j.biocel.2004.02.016
213. Ravoitytė B. (2014). Fosfono rūgščių darinių sąlygotas ŽIV atvirkštinės transkriptazės slopinimas in vitro: bakalauro darbas. Vilniaus Universitetas, Vilnius.
214. Ray, A. S., Vela, J. E., Booramra, C. G., Zhang, L., Hui, H., Callebaut, C., Stray, K., Lin, K. Y., Gao, Y., Mackman, R. L., and Cihlar, T. (2007). Intracellular metabolism of the nucleotide prodrug GS-9131, a potent anti-human immunodeficiency virus agent. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(2), 648–654. doi:10.1128/AAC.01209-07
215. Ren, J., Esnouf, R., Garman, E., Somers, D., Ross, C., Kirby, I., Keeling, J., Darby, G., Jones, Y., Stuart, D., and Stammers, D. (1995). High resolution structures of HIV-1 RT from four RT–inhibitor complexes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2(4), 293–302. doi:10.1038/nsb0495-293
216. Renoud-Grappin, M., Fossey, C., Fontaine, G., Ladurée, D., Aubertin, A., and Kirn, A. (1998). Imidazo[1,5-b]Pyridazine-D4T

- Conjugates: Synthesis and Anti-Human Immunodeficiency Virus Evaluation. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 9(3), 205–223. doi:10.1177/095632029800900302
217. Resetar, A., and Spector, T. (1989). Glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine: Human and rat enzyme specificity. *Biochemical Pharmacology*, 38(9), 1389–1393. doi:10.1016/0006-2952(89)90177-9
218. Restle, T., Müller, B., and Goody, R. S. (1990). Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention. *The Journal of biological chemistry*, 265(16), 8986–8988.
219. Rezende, L. F., and Prasad, V. R. (2004). Nucleoside-analog resistance mutations in HIV-1 reverse transcriptase and their influence on polymerase fidelity and viral mutation rates. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(9), 1716–1734. doi:10.1016/j.biocel.2004.02.025
220. Ricchetti, M., and Buc, H. (1993). E. coli DNA polymerase I as a reverse transcriptase. *The EMBO journal*, 12(2), 387–396.
221. Rigourd, M., Lanchy, J. M., Le Grice, S. F., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Marquet, R. (2000). Inhibition of the initiation of HIV-1 reverse transcription by AZT : Comparison with elongation. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M003262200
222. Rittinger, K., Divita, G., and Goody, R. S. (1995). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), 8046–8049. doi:10.1073/pnas.92.17.8046
223. Rodgers, D. W., Gamblin, S. J., Harris, B. A., Ray, S., Culp, J. S., Hellmig, B., Woolf, D. J., Debouck, C., and Harrison, S. C. (1995). The structure of unliganded reverse transcriptase from the human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), 1222–1226. doi:10.1073/pnas.92.4.1222
224. Rodriguez, A. C., Park, H.-W., Mao, C., and Beese, L. S. (2000). Crystal structure of a pol  $\alpha$  family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp . 9<sup>o</sup>N-7 1 Edited by D. Rees. *Journal of Molecular Biology*, 299(2), 447–462. doi:10.1006/jmbi.2000.3728



225. Roy, N., Pacini, G., Berlioz-Torrent, C., and Janvier, K. (2014). Mechanisms underlying HIV-1 Vpu-mediated viral egress. *Frontiers in microbiology*, 5, 177. doi:10.3389/fmicb.2014.00177
226. Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Jr, Das, K., Tuske, S., Birktoft, J. J., Ilankumaran, P., Ramesha, A. R., Sayer, J. M., Jerina, D. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2002). Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA. *The EMBO journal*, 21(23), 6614–6624. doi:10.1093/emboj/cdf637
227. Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Tuske, S., Squire, C. J., Das, K., Sheng, D., Ilankumaran, P., Ramesha, A. R., Kroth, H., Sayer, J. M., Jerina, D. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2003). Trapping HIV-1 Reverse Transcriptase Before and After Translocation on DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 16280–16288. doi:10.1074/jbc.M212911200
228. Sarafianos, S. G., Das, K., Tantillo, C., Clark, A. D., Jr, Ding, J., Whitcomb, J. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2001). Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA. *The EMBO journal*, 20(6), 1449–1461. doi:10.1093/emboj/20.6.1449
229. Sarafianos, S. G., Marchand, B., Das, K., Himmel, D. M., Parniak, M. A., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2008). Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *Journal of molecular biology*, 385(3), 693–713. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.071
230. Sawaya, M. R., Prasad, R., Wilson, S. H., Kraut, J., and Pelletier, H. (1997). Crystal Structures of Human DNA Polymerase  $\beta$  Complexed with Gapped and Nicked DNA: Evidence for an Induced Fit Mechanism. *Biochemistry*, 36(37), 11205–11215. doi:10.1021/bi9703812
231. Schauer, G. D., Huber, K. D., Leuba, S. H., and Sluis-Cremer, N. (2014). Mechanism of allosteric inhibition of HIV-1 reverse transcriptase revealed by single-molecule and ensemble fluorescence. *Nucleic acids research*, 42(18), 11687–11696. doi:10.1093/nar/gku819
232. Schinazi, R. F., Hernandez-Santiago, B. I., and Hurwitz, S. J. (2006). Pharmacology of current and promising nucleosides for the treatment of human immunodeficiency viruses. *Antiviral Research*, 71(2–3), 322–334. doi:10.1016/j.antiviral.2006.03.012

233. Schmidt, M. (2010). Xenobiology: a new form of life as the ultimate biosafety tool. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 32(4), 322–331. doi:10.1002/bies.200900147
234. Schubert, U., Ferrer-Montiel, A. V., Oblatt-Montal, M., Henklein, P., Strebel, K., and Montal, M. (1996). Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Letters*, 398(1), 12–18. doi:10.1016/S0014-5793(96)01146-5
235. Schuetz, J. D., Connelly, M. C., Sun, D., Paibir, S. G., Flynn, P. M., Srinivas, R. V., Kumar, A., and Fridland, A. (1999). MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nature Medicine*, 5(9), 1048–1051. doi:10.1038/12487
236. Schultz, S. J., and Champoux, J. J. (2008). RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus research*, 134(1-2), 86–103. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.007
237. Sefah, K., Yang, Z., Bradley, K. M., Hoshika, S., Jimenez, E., Zhang, L., Zhu, G., Shanker, S., Yu, F., Turek, D., Tan, W., and Benner, S. A. (2013). In vitro selection with artificial expanded genetic information systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 1449–1454. doi:10.1073/pnas.1311778111
238. Sefah, K., Yang, Z., Bradley, K. M., Hoshika, S., Jiménez, E., Zhang, L., Zhu, G., Shanker, S., Yu, F., Turek, D., Tan, W., and Benner, S. A. (2013). In vitro selection with artificial expanded genetic information systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1449–1454. doi:10.1073/pnas.1311778111
239. Segura-Morales, C., Pescia, C., Chatellard-Causse, C., Sadoul, R., Bertrand, E., and Basyuk, E. (2005). Tsg101 and Alix Interact with Murine Leukemia Virus Gag and Cooperate with Nedd4 Ubiquitin Ligases during Budding. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 27004–27012. doi:10.1074/jbc.M413735200
240. Sexton, D. J., Berdis, A. J., and Benkovic, S. J. (1997). Assembly and disassembly of DNA polymerase holoenzyme. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1(3), 316–322. doi:10.1016/S1367-5931(97)80068-3
241. Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (1998). Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the

- optimal path. *Protein Engineering Design and Selection*, 11(9), 739–747. doi:10.1093/protein/11.9.739
242. Showalter, A. K., and Tsai, M.-D. (2002). A Reexamination of the Nucleotide Incorporation Fidelity of DNA Polymerases. *Biochemistry*, 41(34), 10571–10576. doi:10.1021/bi026021i
243. Sluis-Cremer, N., Arion, D., Abram, M. E., and Parniak, M. A. (2004). Proteolytic processing of an HIV-1 pol polyprotein precursor: insights into the mechanism of reverse transcriptase p66/p51 heterodimer formation. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(9), 1836–1847. doi:10.1016/j.biocel.2004.02.020
244. Smith, R. A., Loeb, L. A., and Preston, B. D. (2005). Lethal mutagenesis of HIV. *Virus Research*, 107(2), 215–228. doi:10.1016/j.virusres.2004.11.011
245. Sohl, C. D., Singh, K., Kasiviswanathan, R., Copeland, W. C., Mitsuya, H., Sarafianos, S. G., and Anderson, K. S. (2012). Mechanism of interaction of human mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  with the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine indicates a low potential for host toxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(3), 1630–1634. doi:10.1128/AAC.05729-11
246. Steitz, T. A. (1993). DNA- and RNA-dependent DNA polymerases. *Current Opinion in Structural Biology*, 3(1), 31–38. doi:10.1016/0959-440X(93)90198-T
247. Stoeckler, J. D., Cambor, C., and Parks, R. E. (1980). Human erythrocytic purine nucleoside phosphorylase: reaction with sugar-modified nucleoside substrates. *Biochemistry*, 19(1), 102–107. doi:10.1021/bi00542a016
248. Sucato, C. A., Upton, T. G., Kashemirov, B. A., Batra, V. K., Martínek, V., Xiang, Y., Beard, W. A., Pedersen, L. C., Wilson, S. H., McKenna, C. E., Florián, J., Warshel, A., and Goodman, M. F. (2007). Modifying the  $\beta,\gamma$  Leaving-Group Bridging Oxygen Alters Nucleotide Incorporation Efficiency, Fidelity, and the Catalytic Mechanism of DNA Polymerase  $\beta$ . *Biochemistry*, 46(2), 461–471. doi:10.1021/bi061517b
249. Tachedjian, G., Hooker, D. J., Gurusinghe, A. D., Bazmi, H., Deacon, N. J., Mellors, J., Birch, C., and Mills, J. (1995). Characterisation of Foscarnet-Resistant Strains of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Virology*, 212(1), 58–68. doi:10.1006/viro.1995.1453

250. Tachedjian, G., Mellors, J., Bazmi, H., Birch, C., and Mills, J. (1996). Zidovudine resistance is suppressed by mutations conferring resistance of human immunodeficiency virus type 1 to foscarnet. *Journal of virology*, 70(10), 7171–7181.
251. Takehisa, J., Kraus, M. H., Ayouba, A., Bailes, E., Van Heuverswyn, F., Decker, J. M., Li, Y., Rudicell, R. S., Learn, G. H., Neel, C., Ngole, E. M., Shaw, G. M., Peeters, M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (2008). Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *Journal of virology*, 83(4), 1635–1648. doi:10.1128/JVI.02311-08
252. Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R. G., Boyer, P. L., Hughes, S. H., ... Arnold, E. (1994). Locations of Anti-AIDS Drug Binding Sites and Resistance Mutations in the Three-dimensional Structure of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Journal of Molecular Biology*, 243(3), 369–387. doi:10.1006/jmbi.1994.1665
253. Taube, R., Loya, S., Avidan, O., Perach, M., and Hizi, A. (1998). Reverse transcriptase of mouse mammary tumour virus: expression in bacteria, purification and biochemical characterization. *The Biochemical journal*, 332 (Pt 3)(Pt 3), 807–808. doi:10.1042/bj3320807w
254. Tawarada, R., Seio, K., and Sekine, M. (2008). Synthesis and Properties of Oligonucleotides with Iodo-Substituted Aromatic Aglycons: Investigation of Possible Halogen Bonding Base Pairs. *The Journal of Organic Chemistry*, 73(2), 383–390. doi:10.1021/jo701634t
255. Tchesnokov, E. P., Gilbert, C., Boivin, G., and Götte, M. (2006). Role of helix P of the human cytomegalovirus DNA polymerase in resistance and hypersusceptibility to the antiviral drug foscarnet. *Journal of virology*, 80(3), 1440–1450. doi:10.1128/JVI.80.3.1440-1450.2006
256. Temin H. M., and Mizutani, S. (1970). Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus. *Nature*, 226(5252), 1211–1213. doi:10.1038/2261211a0
257. Thompson, E. H. Z., Bailey, M. F., van der Schans, E. J. C., Joyce, C. M., and Millar, D. P. (2002). Determinants of DNA Mismatch Recognition within the Polymerase Domain of the Klenow Fragment. *Biochemistry*, 41(3), 713–722. doi:10.1021/bi0114271
258. Tokarev, A., Suarez, M., Kwan, W., Fitzpatrick, K., Singh, R., and Guatelli, J. (2013). Stimulation of NF- $\kappa$ B activity by the HIV

- restriction factor BST2. *Journal of virology*, 87(4), 2046–2057.  
doi:10.1128/JVI.02272-12
259. Tu, X., Das, K., Han, Q., Bauman, J. D., Clark, A. D., Jr, Hou, X., Frenkel, Y. V., Gaffney, B. L., Jones, R. A., Boyer, P. L., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2010). Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision. *Nature structural and molecular biology*, 17(10), 1202–1209. doi:10.1038/nsmb.1908
260. Tuske, S., Sarafianos, S. G., Clark, A. D., Ding, J., Naeger, L. K., White, K. L., Miller, M. D., Gibbs, C. S., Boyer, P. L., Clark, P., Wang, G., Gaffney, B. L., Jones, R. A., Jerina, D. M., Hughes, S. H., and Arnold, E. (2004). Structures of HIV-1 RT–DNA complexes before and after incorporation of the anti-AIDS drug tenofovir. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(5), 469–474.  
doi:10.1038/nsmb760
261. UNAIDS. UNAIDS DATA 2017, Geneva, 2017. Retrieved May 13, 2019, from  
[http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/20170720\\_Data\\_book\\_2017\\_en.p](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf)
262. van Wamel, J. L. B., and Berkhout, B. (1998). The First Strand Transfer during HIV-1 Reverse Transcription Can Occur either Intramolecularly or Intermolecularly. *Virology*, 244(2), 245–251.  
doi:10.1006/viro.1998.9096
263. VandeWoude, S., and Apetrei, C. (2006). Going wild: lessons from naturally occurring T-lymphotropic lentiviruses. *Clinical microbiology reviews*, 19(4), 728–762. doi:10.1128/CMR.00009-06
264. Vashishtha, A. K., Wang, J., and Konigsberg, W. H. (2016). Different Divalent Cations Alter the Kinetics and Fidelity of DNA Polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 20869–20875. doi:10.1074/jbc.R116.742494
265. Velazquez, S., Alvarez, R., San-Felix, A., Jimeno, M. L., De Clercq, E., Balzarini, J., and Camarasa, M. J. (1995). Synthesis and Anti-HIV Activity of [AZT]-[TSAO-T] and [AZT]-[HEPT] Dimers as Potential Multifunctional Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(10), 1641–1649.  
doi:10.1021/jm00010a008
266. Vivet-Boudou, V., Isel, C., Sleiman, M., Smyth, R., Ben Gaied, N., Barhoum, P., Laumond, G., Bec, G., Götte, M., Mak, J., Aubertin, A. M., Burger, A., and Marquet, R. (2011). 8-Modified-2'-deoxyadenosine analogues induce delayed polymerization arrest

- during HIV-1 reverse transcription. *PloS one*, 6(11), e27456.  
doi:10.1371/journal.pone.0027456
267. Wang, Z., Xu, W., Liu, L., and Zhu, T. F. (2016). A synthetic molecular system capable of mirror-image genetic replication and transcription. *Nature Chemistry*, 8(7), 698–704.  
doi:10.1038/nchem.2517
268. Warren, R. A. J. (1980). Modified Bases in Bacteriophage DNAs. *Annual Review of Microbiology*, 34(1), 137–158.  
doi:10.1146/annurev.mi.34.100180.001033
269. Washington, M. T., Johnson, R. E., Prakash, S., and Prakash, L. (1999). Fidelity and Processivity of *Saccharomyces cerevisiae* DNA Polymerase  $\eta$ . *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 36835–36838. doi:10.1074/jbc.274.52.36835
270. Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953). Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, 171(4361), 964–967. doi:10.1038/171964b0
271. Weiss R. A. (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*, 3, 67. doi:10.1186/1742-4690-3-67
272. Welter, M., Verga, D., and Marx, A. (2016). Sequence-Specific Incorporation of Enzyme-Nucleotide Chimera by DNA Polymerases. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(34), 10131–10135. doi:10.1002/anie.201604641
273. Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *Journal of virology*, 66(12), 7193–7200.
274. Wong, I., Patel, S. S., and Johnson, K. A. (1991). An induced-fit kinetic mechanism for DNA replication fidelity: direct measurement by single-turnover kinetics. *Biochemistry*, 30(2), 526–537. doi:10.1021/bi00216a030
275. Wong, J. H., Fiala, K. A., Suo, Z., and Ling, H. (2008). Snapshots of a Y-Family DNA Polymerase in Replication: Substrate-induced Conformational Transitions and Implications for Fidelity of Dpo4. *Journal of Molecular Biology*, 379(2), 317–330. doi:10.1016/j.jmb.2008.03.038
276. Wu, P., Nossal, N., and Benkovic, S. J. (1998). Kinetic Characterization of a Bacteriophage T4 Antimutator DNA Polymerase $\dagger$ . *Biochemistry*, 37(42), 14748–14755. doi:10.1021/bi980835a
277. Yang, G., Franklin, M., Li, J., Lin, T.-C., and Konigsberg, W. (2002). Correlation of the Kinetics of Finger Domain Mutants in

- RB69 DNA Polymerase with Its Structure†. *Biochemistry*, 41(8), 2526–2534. doi:10.1021/bi0119924
278. Yang, Z., Sismour, A. M., Sheng, P., Puskar, N. L., and Benner, S. A. (2007). Enzymatic incorporation of a third nucleobase pair. *Nucleic acids research*, 35(13), 4238–4249. doi:10.1093/nar/gkm395
279. Yin, Y. W., and Steitz, T. A. (2004). The Structural Mechanism of Translocation and Helicase Activity in T7 RNA Polymerase. *Cell*, 116(3), 393–404. doi:10.1016/S0092-8674(04)00120-5
280. Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T. D., and Oroszlan, S. (1985). Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(6), 1618–1622. doi:10.1073/pnas.82.6.1618
281. Yu, H., and Goodman, M. F. (1992). Comparison of HIV-1 and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase fidelity on RNA and DNA templates. *The Journal of biological chemistry*, 267(15), 10888-10896.
282. Yu, H., Jetzt, A. E., Ron, Y., Preston, B. D., and Dougherty, J. P. (1998). The nature of human immunodeficiency virus type 1 strand transfers. *The Journal of biological chemistry*, 273(43), 28384-28391.
283. Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X. F. (2003). Induction of APOBEC3G Ubiquitination and Degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF Complex. *Science*, 302(5647), 1056–1060. doi:10.1126/science.1089591
284. Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 Genome Nuclear Import Is Mediated by a Central DNA Flap. *Cell*, 101(2), 173–185. doi:10.1016/S0092-8674(00)80828-4
285. Zhang, L., Yang, Z., Le Trinh, T., Teng, I. T., Wang, S., Bradley, K. M., Hoshika, S., Wu, Q., Cansiz, S., Rowold, D. J., McLendon, C., Kim, M. S., Wu, Y., Cui, C., Liu, Y., Hou, W., Stewart, K., Wan, S., Liu, C., Benner, S. A., and Tan, W. (2016). Aptamers against Cells Overexpressing Glypican 3 from Expanded Genetic Systems Combined with Cell Engineering and Laboratory Evolution. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 55(40), 12372–12375. doi:10.1002/anie.201605058
286. Zhang, L., Yang, Z., Sefah, K., Bradley, K. M., Hoshika, S., Kim, M. J., Kim, H. J., Zhu, G., Jiménez, E., Cansiz, S., Teng, I. T., Champanhac, C., McLendon, C., Liu, C., Zhang, W., Gerloff, D. L.,

- Huang, Z., Tan, W., and Benner, S. A. (2015). Evolution of functional six-nucleotide DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 137(21), 6734–6737. doi:10.1021/jacs.5b02251
287. Zhang, Y., Ptacin, J. L., Fischer, E. C., Aerni, H. R., Caffaro, C. E., San Jose, K., Feldman, A. W., Turner, C. R., and Romesberg, F. E. (2017). A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information. *Nature*, 551(7682), 644–647. doi:10.1038/nature24659
288. Zhang, Z., Walker, M., Xu, W., Shim, J. H., Girardet, J. L., Hamatake, R. K., and Hong, Z. (2006). Novel nonnucleoside inhibitors that select nucleoside inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(8), 2772–2781. doi:10.1128/AAC.00127-06



## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui dr. Sauliui Servai už pasitikėjimą ir pagalbą ruošiant šią disertaciją. Žinias apie metodus, naudingus patarimus atliekant analizę. Dėkoju visiems kolegoms iš laboratorijos už jų geranoriškus pasiūlymus bei malonų bendradarbiavimą.

Esu dėkingas dr. Daivai Tauraitei už susintetintus modifikuotus nukleozidus ir nukleotidus.

Esu dėkingas savo šeimai už palaikymą ir supratimą.

## CURRICULUM VITAE

**Vardas, Pavardė** Algirdas Mikalkėnas  
**Gimimo data** 1989-08-10  
**Darbo adresas** Vilniaus universiteto Biomokslų institutas,  
Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra,  
Saulėtekio al. 7, Vilnius, LT-10257, Lietuva  
**Telefonas** 862480863  
**E. pašto adresai** algirdas.mikalkenas@gf.vu.lt  
algirdas.mikalkenas@gmail.com

### Išsilavinimas ir dabartinės pareigos

2014-2018 Biochemijos doktorantūros studijos,  
Vilniaus universiteto Biomokslų institutas  
2014 Biochemijos magistras,  
Vilniaus universitetas  
2012 Biochemijos bakalauras,  
Vilniaus universitetas  
Nuo 2017 Vilniaus universiteto Biomokslų instituto  
specialistas

# UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt),  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 12 egz.