



УДК 577.152.314'145

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ И МОДИФИКАЦИИ *EcoRII* С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ ДНК

IX. РАСЩЕПЛЕНИЕ СУБСТРАТОВ С ТОЧЕЧНЫМИ МОДИФИКАЦИЯМИ В УЧАСТКЕ УЗНАВАНИЯ И ПРИЛЕГАЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ

*Виноградова М. И., Громова Е. С., Грязноза О. И.,
Исагулянц М. Г., Кузнецова С. А., Косых В. Г.*,
Шабарова З. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет;*

** Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Академии наук СССР,
Пушино Московской обл.*

Изучена способность эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* расщеплять 14-звенные ДНК-дуплексы, в том числе и с нуклеотидными заменами в участке узнавания (ССА/ТGG) или прилегающей к нему нуклеотидной паре. Модификации, приводящие к локальному изменению вторичной структуры субстрата (остаток rU в участке узнавания и вне него, AA- и AC-пары во фланкирующей последовательности), вызывают уменьшение скорости гидролиза, причем эффект наибольший, когда модифицирующая нуклеотидная пара находится вне участка узнавания. При замене в участке узнавания второго с 5'-конца остатка dC в одной или обеих цепях на остаток dm⁵C ферментативный гидролиз полностью блокируется, а замена остатка dT на dH³U влечет за собой резкое снижение скорости гидролиза. Определены K_m и k_{cat} для гидролиза 14-звенного субстрата. Показано, что скорость гидролиза dT-содержащей цепи в 1,5 раза больше, чем цепи, несущей в участке узнавания остаток dA. Подтверждена схема, согласно которой гидролиз обеих цепей субстрата эндонуклеазой *EcoRII* проходит в составе одного фермент-субстратного комплекса.

Для решения проблемы белково-нуклеинового узнавания необходимо выяснение природы высокоспецифического взаимодействия ферментов рестрикции второго рода с ДНК. Объектом наших исследований является эндонуклеаза рестрикции *EcoRII*, которая узнает и расщепляет ДНК по последовательности ССА/ТGG. Ранее было изучено взаимодействие этого фермента с синтетическими ДНК-дуплексами конкатемерного типа, содержащими природные и модифицированные участки узнавания этого фермента [1]. В настоящей работе в качестве субстратов эндонуклеазы *EcoRII* использовались два 14-звенных синтетических ДНК-дуплекса с одним участком узнавания и их аналоги, содержащие нуклеотидные замены как в участке узнавания, так и в непосредственно прилегающей к нему (и к месту расщепления) нуклеотидной паре*:



(звездочками указаны нуклеотидные звенья, которые были заменены на остатки dm⁵C, dH³U, rU, dA или dC; соответствующие формулы модифицированных ДНК-дуплексов (III)–(X) приведены в таблице). Верхняя цепь обозначается далее как А-цепь, нижняя — как Т-цепь (в соответствии с центральным нуклеотидным звеном участка узнавания). Изучение

* Префикс d (дезоксн) при написании дезоксирибонуклеотидов здесь и далее опущен.

Расщепление ДНК-дуплексов эндонуклеазой *EcoRII* *

Номер дуплекса	ДНК-дуплекс	k_{II} с ⁻¹ ·М ⁻¹	$k_{II}^{эфф}$ с ⁻¹ (отн.)	Меченые продукты гидролиза
I	$\begin{array}{c} \text{A-C-C-A-C-C-A-G-G-T-A-G-G-T} \\ \text{T-G-G-T-G-G-T-C-C-A-T-C-C-A} \end{array}$	4150 6100	100 100	³² pACCA ³² pACCTA
II	$\begin{array}{c} \text{A-C-G-G-A-T-C-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	4880 9020	100 100	³² pACGGAT ³² pCACT
III	$\begin{array}{c} \text{A-C-G-G-A-rU-C-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	163 293	3 3	³² pACGGArU ³² pCACT
IV	$\begin{array}{c} \text{A-C-C-A-C-C-A-A-G-G-T-A-G-G-T} \\ \text{T-G-G-T-G-G-rU-C-C-A-T-C-C-A} \end{array}$	233 659	7 11	³² pACCA pCcrU ³² pGGTGGT
V	$\begin{array}{c} \text{A-C-G-G-A-A-C-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	439 1100	9 12	³² pACGGAA ³² pCACT
VI	$\begin{array}{c} \text{A-C-G-G-A-C-C-A-G-G-A-G-T-G-A-C} \\ \text{G-C-C-T-A-G-G-T-C-C-T-C-A-C} \end{array}$	81 142	1,5 1,5	³² pACGGAC ³² pCACT
VII	$\begin{array}{c} \text{A-C-C-A-C-m}^5\text{C-A-G-G-T-A-G-G-T} \\ \text{T-G-G-T-G-G-T-C-C-A-T-C-C-A} \end{array}$	0 0	0 0	—
VIII	$\begin{array}{c} \text{A-C-C-A-C-C-A-G-G-T-A-G-G-T} \\ \text{T-G-C-T-G-G-T-m}^5\text{C-C-A-T-C-C-A} \end{array}$	0 0	0 0	—
IX	$\begin{array}{c} \text{A-C-C-A-C-m}^5\text{C-A-G-G-T-A-G-G-T} \\ \text{T-G-C-T-G-G-T-m}^5\text{C-C-A-T-C-C-A} \end{array}$	0 0	0 0	—
X	$\begin{array}{c} \text{A-C-C-A-C-C-A-G-G-T-A-G-G-T} \\ \text{T-G-G-T-G-G-rU}^5\text{C-C-A-T-C-C-A} \end{array}$	488 317	12 5	³² pACCA ³² pACCTA

* Данные верхней и нижней строк относятся к А- и Т-цепям соответственно.

** Данные для ДНК-дуплексов (IV) и (VII) — (X) приведены относительно скорости гидролиза соответствующей цепи дуплекса (I), а для дуплексов (III), (V) и (VI) — относительно соответствующей цепи (II).

расщепления субстратов (I) — (X) ферментом *EcoRII* преследовало следующие цели. Во-первых, определение влияния локальных изменений вторичной структуры участка узнавания *EcoRII* и прилегающей к нему нуклеотидной пары на взаимодействие рестриктазы с субстратом. Возможно, существует определенный мотив вторичной структуры ДНК, способствующий специфическому белково-нуклеиновому взаимодействию. В настоящее время появились данные об отклонении структуры участков ДНК, узнаваемых ферментами рестрикции, от канонической В-формы [2, 3], а также об искажении двойной спирали ДНК вблизи расщепляемого эндонуклеазой *EcoRI* узла при образовании фермент-субстратного комплекса [4]. Во-вторых, для понимания механизма действия фермента необходимо было выяснить, происходит ли диссоциация фермент-субст-

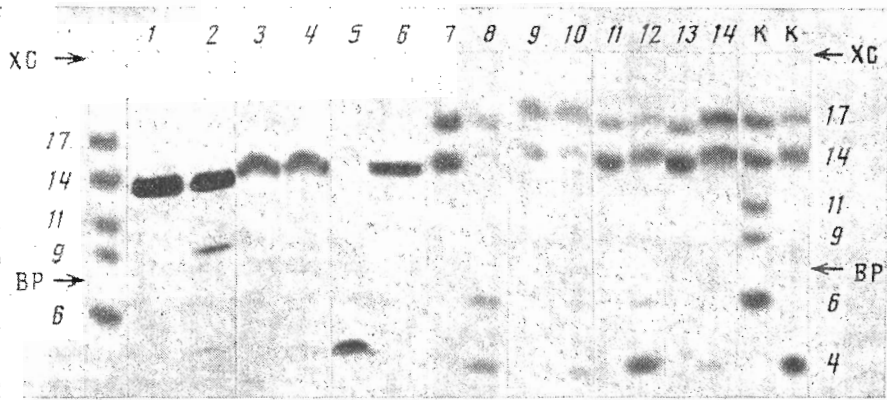


Рис. 1. Радиоавтограмма продуктов гидролиза эндонуклеазой *EcoRII* (7 ед. акт./мкл) [^{32}P]ДНК-дуплексов (IV), (X), (I), (II), (VI), (V), (III) (2, 4, 5, 8, 10, 12, 14 соответственно). Условия гидролиза: 37°C , 1 ч, $[\text{S}]_0=0,39$ мкМ. 1, 3, 6, 7, 9, 11 и 13 — исходные ДНК-дуплексы (IV), (X), (I), (II), (VI), (V) и (III) соответственно. ^{32}P -метка вводилась в обе цепи дуплексов. К — реперные олигонуклеотиды, содержащие 4, 6, 9, 11, 14 и 17 нуклеотидных звеньев. ВР и ХС — положение маркеров бромфенолового синего и ксилцицианола

ратного комплекса после разрыва одной из цепей субстрата, или же обе цепи расщепляются в составе одного фермент-субстратного комплекса. Кроме того, была получена информация о влиянии некоторых нуклеотидных аналогов (dm^3C и dfI^3U) в участке узнавания на функционирование фермента. Ранее, при изучении ферментов рестрикции, замену остатка dT в ДНК на dfI^3U не проводили. Наличие атома фтора в узнаваемой ферментом последовательности открывает возможность использования ^{19}F -ЯМР-спектроскопии для изучения структуры белково-нуклеинового комплекса.

Дуплексы (I)–(VI) и (X) специфически расщепляются эндонуклеазой *EcoRII*. Длину продуктов гидролиза определяли по подвижности в ПААГ с использованием реперных олигонуклеотидов (рис. 1, таблица).

ДНК-дуплексы с природным участком узнавания, фланкированным различными нуклеотидными последовательностями

Анализ кинетики гидролиза эндонуклеазой *EcoRII* субстратов (I) и (II), имеющих одинаковую длину двуспиральных участков (14 п.о.), показал, что дуплекс (I) гидролизуется немного медленнее дуплекса (II) (рис. 2). Этот результат — следствие различного нуклеотидного окружения участка узнавания *EcoRII* в дуплексах (I) и (II). Известно, что участки узнавания одного и того же фермента рестрикции, находящиеся в различном нуклеотидном окружении, расщепляются с различной скоростью [5–9]. Нами получены кинетические параметры гидролиза эндонуклеазой *EcoRII* дуплекса (II). Изученная реакция подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен: зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза от концентрации субстрата и фермента в обратных координатах является линейной (рис. 3, 4). K_m в случае расщепления рестриктазой *EcoRII* дуплекса (II) равняется $1,6 \cdot 10^{-5}$ М, число оборотов (k_{cat}) фермента составляет $0,11 \text{ с}^{-1}$. Высокое значение K_m , вероятно, свидетельствует о том, что длина ДНК-дуплекса недостаточна для образования полноценного фермент-субстратного комплекса.

Для субстратов (I) и (II) обнаружено различие в скорости расщепления каждой из цепей дуплекса: гидролиз цепи Т идет быстрее, чем цепи А — в 1,5 раза в случае дуплекса (I) и в 1,8 раза в случае (II) (рис. 5, таблица). Эффект предпочтительного расщепления одной из цепей не может быть объяснен исключительно влиянием нуклеотидных последовательностей в дуплексах (I) и (II), примыкающих к участку узнавания *EcoRII*, как это объяснялось в случае эндонуклеаз рестрикции

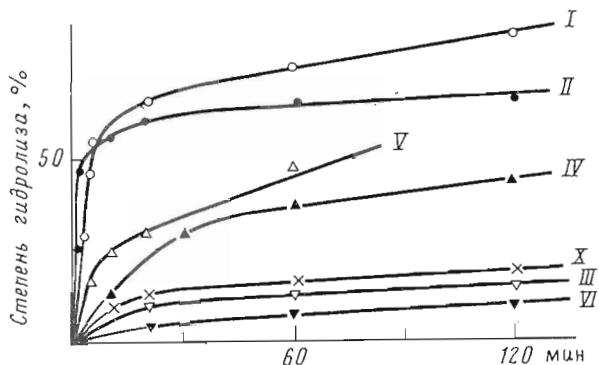


Рис. 2. Кинетические кривые гидролиза при 37° С эндонуклеазой *EcoRII* (7 ед. акт./мкл) [³²P]ДНК-дуплексов (I)–(VI) и (X). [S]₀=0,39 мкМ

EcoRI, *HpaII*, *MspI*, *PstI* и *HinfI* [5–9]. Действительно, Т-цепи обоих субстратов гидролизуются эффективнее, чем любая из А-цепей, независимо от длины фрагмента ДНК, фланкирующего с 5'-конца участок узнавания. Так, в дуплексе (I) перед участком узнавания в Т-цепи находятся пять нуклеотидных остатков, а в А-цепи — четыре; в дуплексе (II) соотношение обратное, но гидролиз Т-цепи проходит быстрее (рис. 5, таблица). Сравнение величин $k_{II}^{эфф}$ (таблица) показывает, что большая скорость расщепления Т-цепи наблюдается как при одинаковом соотношении АТ- и GC-пар во фланкирующей последовательности (II(T) > I(A)), так и при преобладании АТ-пар (I(T) > II(A); II(T) > II(A); I(T) > I(A)). Таким образом, не только первичная структура фрагмента, фланкирующего участок узнавания, оказывает влияние на гидролиз субстрата. Несимметричность в разрезании субстрата эндонуклеазой *EcoRII* связана также с несимметричностью первичной структуры участка узнавания. По-видимому, фермент, состоящий из двух одинаковых субъединиц [10], дискриминирует А- и Т-цепи субстрата.

Изменение вторичной структуры участка узнавания и прилегающей последовательности

Вторичная структура ДНК играет, по-видимому, важную роль в узнавании рестриктазами своего субстрата. Исследование коротких ДНК-дуплексов, содержащих участки узнавания ряда рестриктаз, методами ЯМР высокого разрешения [2, 3] и рентгеноструктурного анализа [11, 12] показали, что им свойственна микротетерогенность структуры, а именно: конформационные параметры отдельных нуклеотидных звеньев варьируют от значений, характерных для В-формы, до значений, присущих А-форме двойной спирали. Известны некоторые факты о взаимодействии ферментов рестрикции с ДНК в различных формах. Так, показано, что ферменты *BssHII* и *VamHI* не расщепляют субстраты в Z-форме [13]. Изменение конформации углеводного остатка в одном из нуклеотидных звеньев сайта *EcoRI* приводит либо к ускорению, либо к замедлению ферментативной реакции [14]. По данным Фредерика и соавт. [4], в комплексе фермента *EcoRI* с синтетическим субстратом наблюдается искажение двойной спирали ДНК, причем фрагменты, фланкирующие участок узнавания, имеют А-подобную форму, элементы которой присутствуют в субстрате изначально и усиливаются при взаимодействии с ферментом.

Рассмотрим, как влияет изменение вторичной структуры субстрата на его взаимодействие с эндонуклеазой *EcoRII*. Информация о вторичной структуре сайта *EcoRII* отсутствует. Однако в дуплекс (II) введен участок узнавания *VamHI* — фрагмент в 6 п.о. GGATCC, частично перекрывающий участок узнавания *EcoRII*, структура которого установлена методом

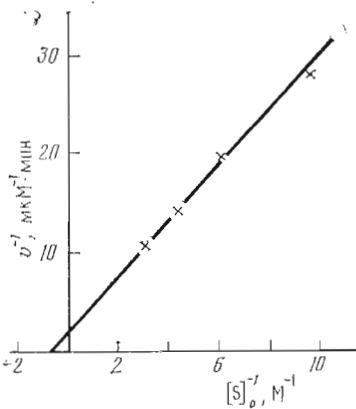


Рис. 3

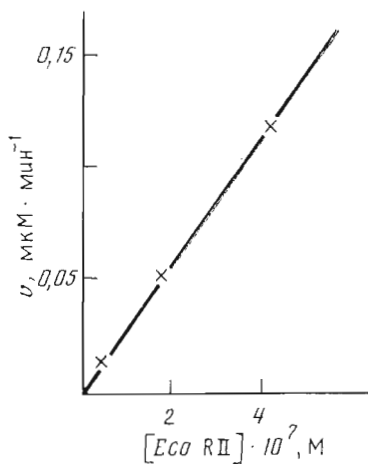


Рис. 4

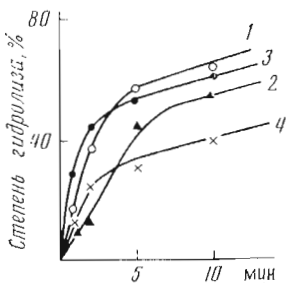


Рис. 5

Рис. 3. Зависимость начальной скорости гидролиза при 37° С дуплекса (II) эндонуклеазой *EcoRII* (0,7 ед. акт./мкл) от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера — Берка

Рис. 4. Зависимость начальной скорости гидролиза дуплекса (II) (0,39 мкМ) эндонуклеазой *EcoRII* при 37° С от концентрации фермента

Рис. 5. Кинетические кривые расщепления эндонуклеазой *EcoRII* (7 ед. акт./мкл) ³²P-дуплексов (I) (1 — Г-цепь, 2 — А-цепь) и (II) (3 — Т-цепь, 4 — А-цепь). [S]₀ = 0,39 мкМ

ЯМР. Показано, что углеводные остатки в dT^A и dC^S находятся в C2'-эндо-конформации, соответствующей В-форме двойной спирали, а для остатков 1—3 и 6 данные противоречивы (допускается и C3'-эндо-конформация фуранозного цикла) [2, 3]. При включении этой последовательности в более протяженную структуру (дуплекс (II)) конформационная ситуация, вероятно, сохраняется. Таким образом, по косвенным данным, для фуранозного цикла остатка dT, примыкающего к участку узнавания *EcoRII* (дуплекс (II)), предпочтительна C2'-эндо-конформация. Нами была осуществлена замена этого остатка (субстрат (III)), а также остатка dT внутри сайта узнавания (субстрат (IV)) на rU, что должно было привести к изменению типа конформации фуранозы в этих нуклеотидных звеньях с C2'-эндо- на C3'-эндо- и появлению локальных доменов с конформацией, подобной А-форме. Известно, что при введении рибозвеньев в последовательность ДНК они сохраняют 3'-эндо-конформацию рибозного кольца, соответствующую А-форме спирали [15]. Кроме того, во фланкирующую последовательность были введены AA- (субстрат (V)) и AC-пары (субстрат (VI)), существенно искажающие структуру ДНК в этом участке, особенно в случае последней модификации [16].

Изучение расщепления дуплексов (III) и (IV) позволило сравнить влияние одной и той же модификации внутри и вне участка узнавания на функционирование фермента. Гидролиз субстратов (III) и (IV) происходит со значительно меньшей скоростью, чем гидролиз соответствующих немодифицированных дуплексов (II) и (I) (рис. 2, таблица). Эти данные нельзя объяснить отсутствием 5-метильной группы у остатка rU в субстратах (III) и (IV), поскольку при замене dT на dU скорость реакции уменьшалась только в 2 раза [1]. Таким образом, ингибирование гидролиза дуплексов (III) и (IV) в 30 и 10 раз (таблица) соответственно связано с локальным изменением геометрии двойной спирали у этих ДНК-дуплексов. Из полученных результатов следует, что фермент *EcoRII* узнает и расщепляет, хотя и с меньшей эффективностью, субстрат, содержащий в узнаваемой последовательности участок с элемента-

ми А-формы двойной спирали. Аналогичная модификация во фланкирующей последовательности рядом с расщепляемой связью приводит к гораздо более существенному замедлению ферментативной реакции. По-видимому, в отличие от эндонуклеазы *EcoRI* [4] в случае комплекса фермента *EcoRII* с субстратом мало вероятно присутствие во фланкирующей последовательности элементов А-формы двойной спирали. Следует, однако, учесть возможность ингибирования расщепления дуплекса (III) по сравнению с дуплексом (II) из-за вмешательства 2'-гидроксильной группы остатка rU в гидролитический акт. Отметим, что наличие рибозена в участке узнавания *EcoRII* оказывает значительно меньшее влияние на скорость ферментативной реакции, чем в случае аналогичной ситуации для эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* [14].

Ранее нами было изучено расщепление конкатемерных дуплексов, содержащих АА-пары в центре участка узнавания. Замена комплементарной АТ-пары на АА-пару приводит к сильному (в 50 раз) замедлению расщепления субстрата эндонуклеазой и снижению прочности фермент-субстратного комплекса [17, 18]. В настоящей работе некомплементарные АА- и АС-пары были введены во фланкирующую последовательность (субстраты (V) и (VI)). Скорость гидролиза эндонуклеазой *EcoRII* обеих цепей дуплекса (V) приблизительно в 10 раз ниже скорости расщепления дуплекса (II). В условиях ферментативной реакции эти ДНК-дуплексы термодинамически устойчивы. При включении АА-пары вместо комплементарной АТ-пары в ДНК-дуплекс происходит его дестабилизация ($T_{пл}$ дуплексов (V) и (II) составляют 55 и 62°С соответственно*). Тибаниендой и соавт. [16] методом ЯМР была изучена структура коротких ДНК-дуплексов, содержащих АА-пару. Было показано, что некомплементарная пара находится внутри двойной спирали, хотя стэкинг-взаимодействие этой пары с соседними частично нарушено; геометрия сахарофосфатного остова также претерпевает небольшие изменения. Остатки гетероциклических оснований некомплементарной пары находятся в *анти*-ориентации относительно дезоксирибозных циклов; кроме того, они имеют обычную таутомерную форму [16]. Нарушение структуры двойной спирали аналогично при нахождении АА-пары внутри участка узнавания и вне его, но степень влияния такой модификации на фермент-субстратное взаимодействие гораздо больше в первом случае. Наличие АА-пары в участке узнавания исключает гидрофобный контакт фермента с CH_3 -группой центрального остатка dT и другие возможные контакты. Отсутствие такого взаимодействия в последовательности, фланкирующей участок узнавания, не существенно для деятельности фермента, так как в этом месте может располагаться любой из четырех нуклеотидов. Таким образом, ингибирование расщепления субстрата (V) вызвано преимущественно конформационным фактором.

Замена комплементарной АТ-пары перед участком узнавания в дуплексе (II) на АС-пару (комплекс (VI)) приводит к резкому (в 60 раз) замедлению ферментативного гидролиза обеих цепей дуплекса (рис. 2, таблица). Некомплементарная АС-пара вносит в ДНК более существенные структурные искажения, чем АА-пара: хотя гетероциклические основания пары имеют обычную конформацию и таутомерные формы, одно или оба основания АС-пары, возможно, выходят за пределы двойной спирали [16]. ДНК-дуплекс (VI) сильнее дестабилизирован по сравнению с дуплексом (II) ($T_{пл}$ (VI) и (II) составляют 52 и 62°С соответственно). Таким образом, большее нарушение структуры ДНК (АС>АА) рядом с участком узнавания *EcoRII* соответствует более сильному замедлению расщепления субстрата эндонуклеазой *EcoRII*, так что для эффективной работы фермента необходимо наличие правильной структуры нуклеотидной пары, примыкающей к месту разрезания. Фермент *EcoRII* проявляет высокую чувствительность к структурным аномалиям во фланкирующей последовательности, причем наблюдаемый эффект может

* Данные по температурам плавления ДНК-дуплексов (I)–(X) получены нами ранее с участием Н. Г. Долишпой (см. также [20]).

быть следствием как изменения структуры самой этой последовательности, так и передачи структурного изменения на участок узнавания. Для рестриктазы *EcoRI* введение даже двух АС-пар рядом с участком узнавания не приводит к столь сильному замедлению расщепления — скорость гидролиза уменьшается только в 3 раза [5].

Введение нуклеотидных аналогов в участок узнавания *EcoRII*

Направленная модификация гетероциклических оснований в ДНК позволяет выявить участие отдельных химических групп оснований во взаимодействии ферментов рестрикции с узнаваемой ими последовательностью в ДНК, а также изучить механизм фермент-субстратного взаимодействия. В настоящей работе изучено взаимодействие эндонуклеазы *EcoRII* с субстратами, содержащими в участке узнавания dm^5C и dfl^5U (таблица, (VII)–(X)).

Известно, что модификация метилазой *EcoRII* второго с 5'-конца участка узнавания остатка dC в обеих цепях участка узнавания полностью блокирует действие эндонуклеазы [10]. Нас интересовала возможность одноцепочечного разрыва при реакции рестриктазы *EcoRII* с субстратами, содержащими в этом положении остаток dm^5C в одной из цепей участка узнавания. С этой целью изучено взаимодействие рестриктазы *EcoRII* с дуплексами (VII)–(IX). Обнаружено, что ни один из этих субстратов не гидролизуется ферментом (таблица), при этом полностью заблокировано расщепление не только модифицированной цепи, но и противоположной, нативной. Блокирование гидролиза может происходить по ряду причин: а) из-за изменений структуры ДНК, вносимых CH_3 -группой; б) вследствие образования непродуктивного комплекса; в) из-за стерических препятствий, обусловленных различием в размерах атомов водорода и метильной группы.

Точечные замены в ДНК-дуплексах остатка dC на dm^5C в условиях высокой ионной силы и при высокой концентрации нуклеотидного материала могут приводить к стабилизации, например, Z-формы ДНК [19]. В условиях нашего эксперимента (ионная сила 0,1 М, концентрация ДНК-дуплексов 0,3–3,3 мкМ) субстраты (VII)–(IX) находятся в B-форме [19]. По данным, полученным с помощью метода КД, при введении остатка dm^5C не происходит изменения структуры дуплекса (I) в целом [20]. Устойчивость ДНК-дуплексов (I) и (IX) одинакова — T_m обоих дуплексов составляет 56°С. Таким образом, блокирование ферментативного гидролиза нельзя объяснить изменением структуры ДНК.

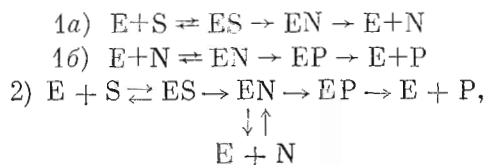
По полученным нами ранее данным [1], гидролиз эндонуклеазой *EcoRII* ДНК-дуплекса, содержащего dm^5C в 5'-концевом положении одной из цепей участка узнавания *EcoRII*, практически не происходит: введение более гидрофобной метильной группы настолько упрочняет белково-нуклеиновый комплекс, что он становится непродуктивным. Вообще, эндонуклеаза *EcoRII* отличается повышенной чувствительностью к изменению гидрофобных свойств участка узнавания. Например, при метилировании аминогруппы при атоме С-4 3'-концевого остатка dC участка узнавания *EcoRII* также наблюдается полное ингибирование гидролиза модифицированного субстрата [21]. В нашем случае образование непродуктивного комплекса мало вероятно, так как это противоречит функции ферментов рестрикции в клетке — существование такого комплекса вывело бы значительную часть фермента из сферы реакции. По-видимому, 100% ингибирование реакции фермента метилированными производными объясняется исключительно стерическим фактором. Ковалентный радиус метильной группы в 2 раза превышает радиус водорода, а ван-дер-ваальсов радиус — в 1,7 раза, что является достаточным препятствием для фермент-субстратного взаимодействия.

Ранее было установлено наличие контакта рестриктазы *EcoRII* с 5- CH_3 -группой остатка dT участка узнавания [1]. Было показано, что замена CH_3 -группы на атом Н приводит к уменьшению скорости гидролиза конкатемерных ДНК-дуплексов, а при замене этой группы на атом

брома, имеющий примерно одинаковый с CH_3 -группой ван-дер-ваальсов радиус [22], гидролиз ускоряется [1]. В настоящей работе впервые в случае эндонуклеаз рестрикции использован субстрат (X), в котором остаток dT участка узнавания заменен на остаток dI⁵U. Оказалось, что скорость гидролиза как модифицированной, так и немодифицированной цепи фторсодержащего субстрата сильно снижена по сравнению с дуплексом (I) (рис. 2, таблица). Для объяснения этого факта рассмотрим, как влияет введение атома фтора вместо метильной группы на свойства субстрата. Дестабилизации ДНК-дуплекса в этом случае не происходит — $T_{\text{пл}}$ дуплексов (I) и (X) составляют 56 и 55°С соответственно. Наличие атома фтора в гетероцикле не оказывает заметного влияния на величину торсионного угла между сахарным остатком и основанием [23]. Кроме того, из данных КД следует, что дуплексы (I) и (X) имеют сходную геометрию двойной спирали в целом [20]. Ковалентный радиус атома фтора близок к аналогичному параметру метильной группы, а ван-дер-ваальсов радиус существенно меньше [22, 24, 25]. Фтор — самый электроотрицательный элемент, индуктивные эффекты F- и CH_3 -групп имеют противоположные знаки. Кроме того, атом фтора характеризуется очень низкой по сравнению с метильной группой гидрофобностью [26]. По-видимому, фермент вступает в контакт с атомом фтора, но этот контакт совершенно отличен от контакта с метильной группой. Вследствие этого наличие атома фтора в субстрате приводит к неблагоприятным изменениям характера взаимодействия субстрата с ферментом.

О механизме расщепления субстрата

В литературе обсуждаются два возможных механизма гидролиза ДНК эндонуклеазами рестрикции [27, 28]: последовательное расщепление цепей ДНК с диссоциацией фермент-субстратного комплекса на стадии одноцепочечного разрыва (схема 1, а и б) и расщепление обеих цепей ДНК в составе одного фермент-субстратного комплекса (схема 2):



где S — исходный субстрат, E — фермент, N — интермедат, имеющий одноцепочечный разрыв, P — конечный продукт.

Наши данные позволяют заключить, что эндонуклеазе *EcoRII* присущ механизм, представленный схемой 2. При включении нуклеотидных аналогов в любую из цепей участка узнавания *EcoRII* происходит одинаковое замедление расщепления обеих цепей субстрата. Эта закономерность наблюдается как для субстратов с одним участком узнавания ((IV), (VII), (VIII) и (X), таблица), так и для изученных ранее субстратов *EcoRII* конкатемерного типа с повторяющимися модифицированными участками узнавания [1]. Это существенный довод в пользу того, что гидролиз обеих цепей ДНК эндонуклеазой *EcoRII* происходит в составе одного фермент-субстратного комплекса [1].

Однако замедление гидролиза немодифицированной цепи можно объяснить и в рамках механизма 1, предположив, что влияние модификации на структуру субстрата в целом сохраняется и после разрыва одной цепи и последующей диссоциации фермент-субстратного комплекса. Установленный в данной работе факт синхронного замедления гидролиза обеих цепей субстратов с модификациями вне участка узнавания (дуплексы (III), (V) и (VI), таблица) позволяет однозначно заключить, что оба разрыва происходят без промежуточной диссоциации белково-нуклеинового комплекса. Ранее нами было показано, что кривые плавления ДНК-дуплексов (III)–(VI), имеющих разрыв фосфодиэфирных связей

в «верхней цепи» (таблица) в месте расщепления рестриктазой *EcoRII*, носят бифазный характер [29]. Гексануклеотидный сегмент отделяется при 18–22° С. Таким образом, в условиях реакции (37° С) после диссоциации комплекса EN (схема 1, а) произошло бы избирательное отделение одноцепочечного гексануклеотидного фрагмента, что привело бы к устранению влияния модификаций на структуру противоположной цепи. Существование комплекса EN (схема 2) подтверждается тем, что А- и Т-цепи субстратов расщепляются с разной скоростью (таблица), т. е. гидролиз двух цепей ДНК происходит последовательно, что укладывается в реакционную схему 2. Принципиальная возможность осуществления ферментом *EcoRII* одноцепочечного разрыва была продемонстрирована ранее [30]. Таким образом, показана последовательность превращений по схеме 2.

Экспериментальная часть

Олигонуклеотиды, входящие в состав дуплексов (I)–(X), синтезировали как описано в работах [31, 32]. 5'-концевую ³²P-метку вводили фосфорилированием этих олигонуклеотидов [γ -³²P]АТФ с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Меченые продукты выделяли в 20% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). ДНК-дуплексы (I)–(III) и (V)–(X) формировали путем отжига соответствующих меченых олигонуклеотидов с немеченым нуклеотидным материалом. Для получения ДНК-дуплекса (IV) использовали олигонуклеотиды АССТАССГ_U, ³²pGGTG_{GT} и АССАССАГGТAГGТ (XI). Синтез проводили в меченом варианте с помощью Т4-ДНК-лигазы, при этом ³²P-метка включалась в середину одной олигонуклеотидной цепи. Для введения ³²P-метки в противоположную цепь субстрата (IV) выделенный в 20% ПААГ дуплекс отжигали с олигонуклеотидом (XI), содержащим 5'-концевую ³²P-фосфатную группу. Олигонуклеотид pGGTG_{GT} был любезно предоставлен А. В. Цытович (МГУ). Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически в расчете на молекулу ДНК-дуплекса. Молярные коэффициенты погашения (I) и (II) при 260 нм принимали равными 237 760 и 258 230 соответственно.

Эндоуклеазу *EcoRII* выделяли по методу [10]. Препарат имел активность 70 тыс. ед./мл* и концентрацию 360 мкг/мл.

Расщепление субстратов (I)–(X) эндоуклеазой *EcoRII* проводили при 37° С в 10 мкл 40 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,6, содержащего 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 7 мМ β-меркаптоэтанол, 4% глицерина (по объему). Концентрация субстрата [S]₀ составляла 0,39 мкМ, время гидролиза 1–120 мин. Для гидролиза использовали 70 ед. акт. фермента. Реакцию останавливали выдерживанием инкубационной смеси при 100° С в течение 2 мин. Продукты гидролиза анализировали в 20% ПААГ. После проведения автордиографии определяли по Черенкову количество радиоактивности в вырезанных из геля зонах, соответствующих исходному материалу и продуктам гидролиза.

Степень гидролиза субстратов определяли либо отдельно для каждой цепи как отношение радиоактивности продукта гидролиза к суммарной радиоактивности продукта и исходного олигонуклеотида (метка вводилась в одну из цепей дуплексов (I), (IV) и (VII)–(X) или в обе цепи дуплексов (II), (III), (V) и (VI) (рис. 5 и таблица)), либо как отношение суммарной радиоактивности продуктов расщепления обеих цепей дуплекса к общей радиоактивности в пробе (метка вводилась в обе цепи дуплексов) (рис. 2–4).

Для всех субстратов (таблица) вычисляли эффективную кинетическую константу второго порядка

$$k_{II}^{эфф} = v/[E]_0 [S]_0,$$

где v – начальная скорость гидролиза, $[E]_0$ – концентрация фермента (значения $[E]_0$ и $[S]_0$ постоянны для всех субстратов). В случае дуплекса (II) определяли значения K_m и k_{cat} по графику зависимости начальной скорости гидролиза от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера–Берка. Для этого получали кинетические кривые гидролиза дуплекса (II), используя 7 ед. акт. *EcoRII* (0,041 мкМ) и варьируя $[S]_0$ в пределах 0,3–3,3 мкМ. Гидролиз проводили в течение 1–5 мин.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. О. М. Полтораку, А. А. Елову и В. Н. Ташличкому за помощь при обсуждении результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yolov A. A., Vinogradova M. N., Gromova E. S., Rosenthal A., Cech D., Veiko V. P., Meteleev V. G., Kosykh V. G., Buryanov A. A., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 24. P. 8983–8998.

* За единицу активности *EcoRII* принимали количество фермента, необходимое для полного гидролиза 1 мкг ДНК плазмиды pBR322 при 37° С в течение 1 ч.

2. Kumar M. R., Hosur R. V., Roy K. B., Miles H. T., Govil G. // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 26. P. 7703–7711.
3. Sarma M. H., Dhingra M. M., Gupta G., Sarma R. H. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1985. V. 131. № 1. P. 269–276.
4. Frederick C. A., Grable J., Melia M., Samudzi C., Jen-Jacobson L., Wang B.-C., Greene P., Boyer H. W., Rosenberg J. M. // *Nature*. 1984. V. 309. № 5967. P. 327–331.
5. Alves J., Pingoud A., Haupt W., Langowski J., Peters F., Maass G., Wolff C. // *Eur. J. Biochem.* 1984. V. 140. № 1. P. 83–92.
6. Baumstark B. R., Roberts R. J., RajBhandary U. L. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 18. P. 8943–8950.
7. Yoo O. J., Agarwal K. L. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 22. P. 10559–10562.
8. Armstrong K. A., Bauer W. R. // *Nucl. Acids Res.* 1982. V. 10. № 3. P. 993–1007.
9. Armstrong K. A., Bauer W. R. // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 12. P. 4109–4126.
10. Косых В. Г., Пунтежис С. А., Бурьянов Я. И., Баев А. А. // *Биохимия*. 1982. Т. 47. № 4. С. 619–625.
11. Dickerson R. E., Drew H. R. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 149. № 4. P. 761–786.
12. Wang A. H.-J., Fujii S., van Boom J. H., Rich A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. № 13. P. 3968–3972.
13. Azorin F., Hahn R., Rich A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 18. P. 5714–5718.
14. Ohtsuka E., Ishino J., Ibaraki K., Ikehara M. // *Eur. J. Biochem.* 1984. V. 139. № 3. P. 447–450.
15. Wang A. H.-J., Fujii S., van Boom J. H., van der Marel G. A., van Bocckl S. A. A., Rich A. // *Nature*. 1982. V. 299. № 14. P. 601–604.
16. Tibanyenda N., Debruin S. H., Haasnoot C. A. G., van der Marel G. A., van Boom J. H., Hilbers C. W. // *Eur. J. Biochem.* 1984. V. 139. № 1. P. 19–27.
17. Yolov A. A., Gromova E. S., Romanova E. A., Oretskaya T. S., Oganov A. A., Buryanov Ya. I., Shabarova Z. A. // *FEBS Lett.* 1984. V. 167. № 1. P. 147–150.
18. Виноградова М. Н., Громова Е. С., Пурмаль А. А., Косых В. Г., Шабарова З. А. // *Молекулярн. биология*. 1986. Т. 20. № 5. С. 1329–1336.
19. Taboury J. A., Adam S., Taillandier E., Neumann J.-M., Tran-Dinh S., Huynh-Dinh T., Langlois d'Estaintot B., Conti M., Igoien J. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 15. P. 6291–6305.
20. Кузнецова С. А., Кубарева Е. А., Орецкая Т. С., Долинная Н. Г., Крынецкая Н. Ф., Громова Е. С., Шабарова З. А., Цех Д. // *Биополимеры и клетки*. 1987. Т. 3. № 6. С. 301–308.
21. Butkus V., Klimašauskas S., Keršulyte D., Vaitkevičius D., Lebionka A., Janulaitis A. // *Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. № 16. P. 5727–5746.
22. Petruska J., Horn D. // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 8. P. 2495–2510.
23. Alderfer J. L., Loomis R. E., Zielinski T. J. // *Biochemistry*. 1982. V. 24. № 6. P. 1418–1424.
24. Матъе Ж., Панико Р. Курс теоретических основ органической химии. М.: Мир, 1975. С. 131–133.
25. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. С. 96–97.
26. Rekker R. F. The hydrophobic fragmental constant. Amsterdam – Oxford – New York: Elsevier scientific publishing company, 1977. P. 256, 312.
27. Terry V. J., Jack W. E., Modrich P. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 24. P. 13130–13137.
28. Halford S. E. // *Trends. Biol. Sci.* 1983. V. 8. № 2. P. 455–460.
29. Грязнова О. И., Долинная Н. Г., Исагулянц М. Г., Метелев В. Г., Орецкая Т. С., Удалов Н. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // *Биооргани. химия*. 1986. Т. 12. № 1. С. 124–131.
30. Yolov A. A., Gromova E. S., Shabarova Z. A. // *Molec. Biol. Rep.* 1985. V. 10. № 3. P. 173–176.
31. Долинная Н. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. И., Шабарова З. А. // *Биооргани. химия*. 1986. Т. 12. № 7. С. 921–928.
32. Rosenthal A., Schubert F., Cech D., Orezkaja T. S., Kusnezova S. A., Shabarova Z. A. // *Biomed. biochim. acta*. 1985. V. 44. № 10. P. 75–83.

Поступила в редакцию
24.X.1986

После доработки
19.XII.1986

INTERACTION OF *Eco*RII RESTRICTION AND MODIFICATION ENZYMES
WITH SYNTHETIC DNA FRAGMENTS. IX. CLEAVAGE OF SUBSTRATES
WITH POINT MODIFICATIONS IN THE RECOGNITION SITE
AND FLANKING SEQUENCES

VINOGRADOVA M. N., GROMOVA E. S., GRYAZNOVA O. I., ISAGULYANTS M. G.,
KUZNETSOVA S. A., KOSYCH V. G.*, SHABAROVA Z. A.

*Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; * Institute
of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino, Moscow Region*

Ability of the *Eco*RII restriction endonuclease to cleave 14-base-pair DNA duplexes with nucleotide substitutions in the recognition site CCA/TGG and in the adjacent base pair has been studied. Modifications leading to a local change in the substrate conformation (rU residue in and outside the recognition site, A·A- or A·C-pairs in the flanking sequence) reduce the rate of hydrolysis, the effect being maximal when the modified base pair is outside the recognition site. No digestion occurs when the internal dC-residue of the recognition site is 5-methylated in one or both strands. Replacement of dT residue in the *Eco*RII recognition site by dI⁵U residue results in a dramatic inhibition of hydrolysis. K_m and k_{cat} for the cleavage of 14-base-pair DNA duplex have been determined. The cleavage rate of the dT-containing strand of the recognition site is 1.5 fold higher comparing with the dA-containing strand. The cleavage of both strands of the substrate by *Eco*RII endonuclease is confirmed to proceed in one enzyme-substrate complex.