

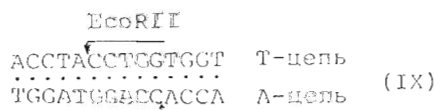
Расщепление 30-звенных ДНК-дуплексов эндонуклеазой рестрикции *EcoRII*

Номер	ДНК-дуплекс *	Начальная скорость гидролиза, $v \cdot 10^9$, М·мин ⁻¹		Относительная начальная скорость гидролиза **	
		цепь Т	цепь А	цепь Т	цепь А
(I)	<pre> ...C-A-A-C-C-T-G-G... ...G-T-T-G-G-A-C-C... </pre>	43	28	100	100
(II)	<pre> ...C-A-A-C-C-T-G-G... ...C-T-T-G-G-Ap C-C... </pre>	1,3	0,01	3,0	0,04
(III)	<pre> ...C-A-A-C-C-T-G-G... ...G-T-T-G-G-A C-C... </pre>	1,2	<0,01	2,8	<0,04
(IV)	<pre> ...C A-A-C-C-T-G-G... G-T-T-G-G-A-C-C... </pre>	0,8	1,6	1,9	5,7
(V)	<pre> ...C-A-A-C-C G-G... G-T-T-G-G-A-C-C... </pre>	0	0	0	0
(VI)	<pre> ...C-A-A-C-C-T-G-G... G-T-T-G-G C-C... </pre>	0	0	0	0
(VII)	<pre> ...C-A-A-C-C-G-G... ...G-T-T-G-G-A-C-C... </pre>	0	0	0	0
(VIII)	<pre> ...C-A-A-C-C^T-G-G... ...G-T-T-G-G-C-C... </pre>	0	0	0	0

* Изображены только модифицируемые фрагменты молекул, остальные их части идентичны (см. формулу субстрата (I)).

** Данные для ДНК-дуплексов (II) — (VIII) приведены относительно скорости гидролиза соответствующей цепи дуплекса (I).

удаление отдельных структурных элементов ДНК из участка узнавания фермента рестрикции позволяет оценить их роль в специфическом белково-нуклеиновом взаимодействии. Выбор в качестве субстратов фермента *EcoRII* достаточно протяженных ДНК-дуплексов обусловлен тем, что, по предварительным данным, длина ДНК-дуплекса, необходимая для образования полноценного фермент-субстратного комплекса, должна составлять примерно 20–30 нуклеотидных пар [3]. Кроме того, значительная длина позволяет уменьшить дестабилизацию дуплексов, неизбежно возникающую при модификациях такого рода. Для сравнения изучено взаимодействие рестриктазы *EcoRII* с более коротким ДНК-дуплексом:



Изучение расщепления ДНК-дуплексов (I)–(IX) эндонуклеазой рестрикции *EcoRII* проводили, вводя 5'-концевую ³²P-метку поочередно

Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза ДНК-дуплекса (I) от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера - Берка

Рис. 2. Расщепление ^{32}P -дуплексов эндонуклеазой рестрикции *EcoRII*: 1 - (I), цепь T; 2 - (I), цепь A; 4 - (II), цепь T; 5 - (III), цепь T; 6 - (IV), цепь T; 3 - (IV), цепь A, $[S]_0 = 3,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

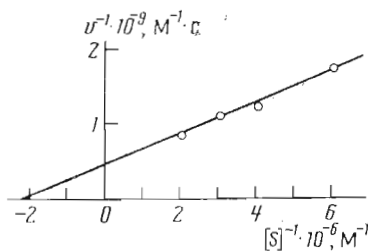


Рис. 1

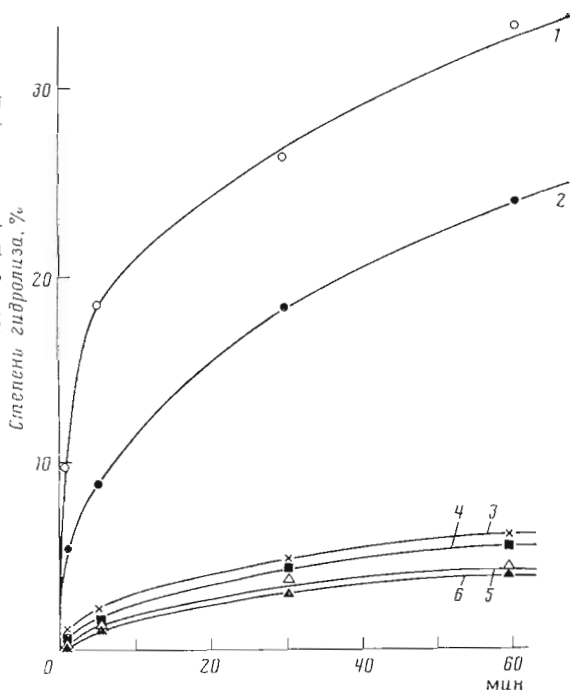
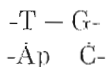


Рис. 2

в оба тяга рассматриваемого субстрата, что позволило определить начальные скорости расщепления отдельных цепей.

Реакция гидролиза дуплекса (I) подчиняется кинетике Михаэлиса - Ментен, K_m равняется $4,6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, V_{max} составляет $2,2 \cdot 10^{-9} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$ (рис. 1). Начальная скорость расщепления T-цепи (цепи названы по центральным звеньям участка узнавания) в среднем в 1,5 раза выше, чем A-цепи (рис. 2, таблица). Эта закономерность наблюдается и для более коротких субстратов с другим нуклеотидным окружением участка узнавания *EcoRII* (рис. 3) [1]. При расщеплении ДНК-дуплекса (I) эндонуклеазой рестрикции *MvaI* (CC+A/TGG), которая является изоизомером фермента *EcoRII*, обнаружено, что начальная скорость гидролиза A-цепи выше, чем T-цепи. Способность ферментов *EcoRII* и *MvaI* гидролизовать с разной скоростью различные цепи субстрата может быть обусловлена как различиями в структуре фланкирующих последовательностей, так и нарушением полной симметрии участка узнавания из-за вырожденности по центральной нуклеотидной паре.

При взаимодействии фермента *EcoRII* с ДНК-дуплексом (II), содержащим разрыв в цепи фосфодиэфирных связей в участке узнавания *EcoRII*, наблюдается замедление скорости гидролиза немодифицированной T-цепи (в 35 раз по сравнению с соответствующей цепью ДНК-дуплекса (I)) и практически полное блокирование гидролиза модифицированной цепи A (рис. 2, 4, таблица). Таким образом, локальное искажение вторичной структуры участка узнавания *EcoRII* за счет увеличения конформационной подвижности групп атомов, находящихся вблизи разрыва, вызывает очень сильное ингибирование действия фермента. Можно предположить, что дефект структуры в узле



приводит к нарушению специфиче-

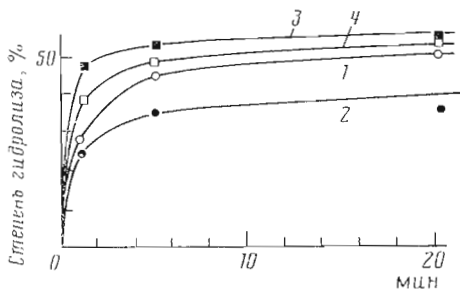


Рис. 3. Расщепление ^{32}P -дуплексов эндонуклеазой рестрикции *EcoRII*: 1 - (I), цепь T; 2 - (I), цепь A; 3 - (IX), цепь T; 4 - (IX), цепь A. $[S]_0 = 4,2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

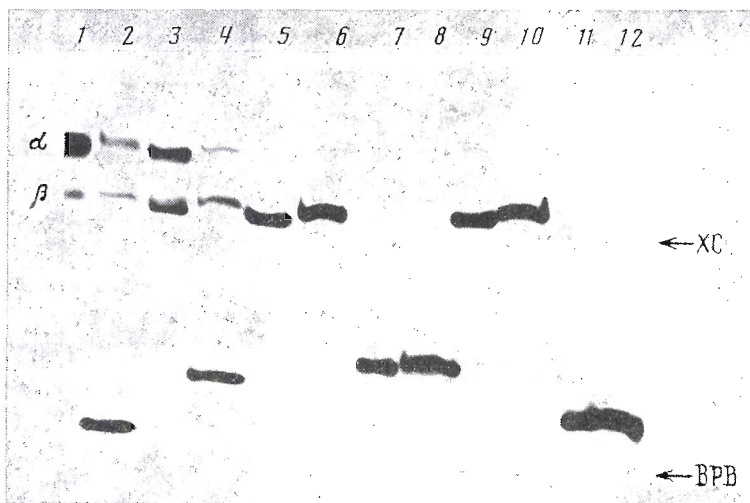


Рис. 5. Радиоавтограф геля-электрофореза продуктов расщепления ДНК-дуплексов (I), (V) и (VI) эндонуклеазой рестрикции *EcoRII*. ^{32}P -метка в Т-цепи: 1, 5, 11 — исходные субстраты (I), (VI), (V) (в случае субстрата (V) ^{32}P -метка находится в 13-звенном фрагменте «е» (Т-цепь)); 2, 6, 12 — продукты расщепления ДНК-дуплексов (I), (VI), (V). ^{32}P -метка в А-цепи: 3, 7, 9 — исходные субстраты (I), (VI), (V) (в случае субстрата (VI) ^{32}P -метка находится в 16-звенном фрагменте «г» (А-цепь)); 4, 8, 10 — продукты расщепления ДНК-дуплексов (I), (VI), (V). Время реакции 120 мин

фатного остова. Не исключено также, что наблюдаемое замедление гидролиза связано с конформационным искажением дуплекса (IV), возникающим за счет разрыва межнуклеотидной связи. Полученный результат согласуется с выводом о том, что фланкирование участка узнавания *EcoRII* двумя нуклеотидными парами недостаточно для протекания ферментативного гидролиза [9]. С другой стороны, 14-звенный субстрат (IX) расщепляется эндонуклеазой *EcoRII* так же эффективно, как и дуплексе (I) (рис. 3). Следовательно, для протекания ферментативного гидролиза достаточно, чтобы фланкирующие последовательности составляли четыре-пять нуклеотидных пар с обеих сторон участка узнавания *EcoRII*.

Интересно, что при нарушении целостности углсводфосфатного остова, хотя и наблюдается влияние изменения структуры одной цепи на расщепление другой, скорости расщепления ферментом *EcoRII* модифицированной и немодифицированной цепей существенно различаются (таблица). Модификации другого рода (неканонические пары, расположенные рядом с участком узнавания, аналоги нуклеотидов в участке узнавания) приводили к одинаковому ингибированию расщепления обеих цепей [1].

Оценивая результаты взаимодействия ДНК-дуплексов (II) и (III) с *EcoRII*, трудно ожидать, что субстраты (V) и (VI) будут расщепляться этим ферментом. Проведенные исследования показали полное блокирование гидролиза обеих цепей дуплексов (V) и (VI) (рис. 5, таблица). Модификация участка узнавания *EcoRII*, состоящая в исключении dA- или dT-звена без разрыва в цепи фосфодиэфирных связей (субстраты (VII) и (VIII)), также приводит к полному ингибированию ферментативной реакции (таблица).

Таким образом, наличие центрального нуклеотидного звена в каждой из цепей участка узнавания *EcoRII* необходимо для эффективного взаимодействия фермента *EcoRII* с субстратом. По-видимому, имеются контакты белка не только с CH_3 -группой остатка dT, как было показано ранее [5], но и с группами атомов в остатке dA.

Экспериментальная часть

Олигонуклеотиды GATGCTGCC (а), AACCTGGCTCT (б), AGCTTCATAC (в), GTATGAAAGCTAGAGCC (г), AGGTTGGCAGCATC (д), GATGCTGCCAACC (е), GGCTCTAGCTTCATAC (ж), GCTTGGCAGCATC (з), ACCTACCTGCTGGT (и),

ACCACCAGGTAGGT (к), TAGAGCCGGTTGGC (н), GCCAACC GGCTCTA (м), необходимые для получения дуплексов (I)–(IX), синтезировали трифитриным методом в растворе [10] и на целлюлозных дисках на автомате-синтезаторе «Виктория-2» [11]. Затем получали отдельные тьяги дуплексов (I)–(VIII): GATGCTGCCAACC GGCTCTAGCTTCATAC (п), GTATGAAGCTAGAGCCAGGTTGGCAGCATC (о), AACCTGGCTTAGCTTCATAC (и), GATGCTGCCAACC GGCTCTAGCTTCATAC (р) и GTATGAAGCTAGAGCCGGTTGGCAGCATC (с). Синтез и выделение олигонуклеотидов (н–с) осуществляли как описано в работе [10]. Субстраты (I)–(VIII) были получены совместным отжигом следующих олигонуклеотидов: (н)+(о) (I), (н)+(г)+(5'-фосфорилированный д) (II), (н)+(г)+(д) (III), (а)+(п)+(о) (IV), (е)+(ж)+(о) (V), (н)+(г)+(з) (VI), (р)+(о) (VII), (н)+(с) (VIII), (и)+(к) (IX). 5'-Фосфорилирование и 5'-³²P-мечение нуклеотидного материала осуществляли T4-полнаниуклеотидкиназой. Препараты 5'-фосфорилированных субстратов с известной удельной радиоактивностью получали добавлением к определенному количеству дуплекса соответствующего ³²P-меченого олигонуклеотида, затем проводили отжиг.

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* (Олайнский завод химреактивов) и *MvaI* (НПО «Фермент», г. Вильнюс). Препарат *EcoRII* после дополнительной очистки имел активность 100 ед./мл* и концентрацию 190 мкг/мл. Гидролиз рестриктазой *EcoRII* проводили при 37°С в течение 1–120 мин в 10 мкл 40 мМ буфера трис-НСl, рН 7,6, содержащего 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 4% (по объему) глицерина и 0,1 ед. акт. фермента. Концентрация субстратов в расчете на молекулу [S]₀ составляла 3,27·10⁻⁷ М (дуплексы (I)–(VIII)) или 4,2·10⁻⁷ М (дуплексы (I) и (IX)). Гидролиз ферментом *MvaI* проводили 1–60 мин при 20°С в 10 мкл 40 мМ буфера трис-НСl, рН 8,5, содержащего 15 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 100 мкг/мл альбумина, 5% (по объему) глицерина и ~24 ед. акт. фермента, [S]₀ 1,64·10⁻⁷ М. Реакции останавливали добавлением EDTA или прогреванием в течение 2–4 мин при 95°С.

Анализ продуктов гидролиза проводили методом электрофореза в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины [5]. После проведения авторадиграфии из геля вырезали зоны, соответствующие исходному материалу и продуктам гидролиза. Их радиоактивность измеряли по Черенкову на счетчике Delta-300 (Трасог, Нидерланды). Степень гидролиза субстратов определяли отдельно для каждой цепи как отношение радиоактивности продукта гидролиза к суммарной радиоактивности продукта и нерасщепленного субстрата и строили кинетические кривые.

Авторы выражают благодарность Т. М. Упоровой за дополнительную очистку фермента *EcoRII*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова М. Н., Громова Е. С., Грязнова О. И., Исагуляну М. Г., Кузнецова С. А., Косых В. Г., Шабарова З. А. // Биорган. химия. 1987. Т. 13, № 9. С. 1194–1204.
2. Zinoviev V. V., Gorbunov I. A., Baclanov M. M., Popov S. G., Malygin E. G. // FEBS Lett. 1983. V. 154. № 2. P. 282–284.
3. Yolov A. A., Gromova E. S., Shabarova Z. A. // Mol. Biol. Rep. 1985. V. 40. № 3. P. 173–176.
4. 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.
5. Yolov A. A., Vinogradova M. N., Gromova E. S., Rosental A., Cech D., Veiko V. P., Metelev V. G., Kosykh V. G., Buryanov Ya. I., Baev A. A., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 24. P. 8983–8998.
6. Lu A.-L., Jack W. E., Modrich Y. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 24. P. 13200–13206.
7. Frederick C. A., Grable J., Melia M., Samudsi C., Jen-Jacobson L., Wang B.-C., Greene P., Boyer H. W., Rosenberg J. M. // Nature. 1984. V. 309. № 5966. P. 327–331.
8. Duyer-Hallquis P., Kezdy F., Agarwal K. L. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 19. P. 4693–4700.
9. Yolov A. A., Gromova E. S., Kubareva E. A., Potapov V. K., Shabarova Z. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 24. P. 8969–8981.
10. 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 клетка. 1987. Т. 3. № 6. С. 304–308.
11. Орецкая Т. С., Кубарева Е. А., Ломакин А. И., Грязнов С. М., Потанов В. К. // Химия природы. соедин. 1987. № 1. С. 153–155.

Поступила в редакцию
12.XI.1986
После доработки
8.1.1987

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

INTERACTION OF *Eco*RII RESTRICTION AND MODIFICATION ENZYMES
WITH SYNTHETIC DNA FRAGMENTS. X. HYDROLYSIS OF SUBSTRATES
WITH STRUCTURAL ANOMALIES

KUBAREVA E. A., GROMOVA E. S., ORETSKAYA T. S., SHABAROVA Z. A.

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Interaction of the *Eco*RII restriction endonuclease with a set of 30-membered substrates having structural anomalies in the recognition site (¹CCT/AGG) and in adjacent sequences has been studied. A nick in the centre of the *Eco*RII recognition site between dC and dA residues slows down hydrolysis of the nonmodified strand, whereas the modified one is not cleaved. Removal of the phosphate group from the nick in this substrate does not alter the rate of the cleavage. The absence of one of the phosphate groups in the flanking sequence at a twobase-pair «distance» from the recognition site slows down the enzymatic hydrolysis. Removal of dA or dT out of the *Eco*RII recognition site blocks the enzymatic reaction. It appears that *Eco*RII does not interact with the phosphate group between dC and dA residues in the recognition site. Suggestions are made concerning possible contacts of the *Eco*RII restriction endonuclease with dA- and dT-residues of the recognition site and with the sugar – phosphate backbone of the adjacent nucleotide sequences.