



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 13 * № 9 * 1987

УДК 577.152.314'14

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

Х*. ГИДРОЛИЗ СУБСТРАТОВ СО СТРУКТУРНЫМИ АНОМАЛИЯМИ

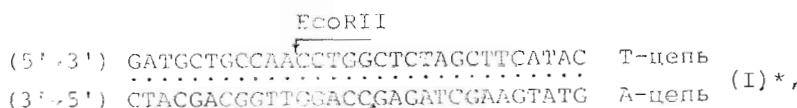
*Кубарева Е. А., Громова Е. С., Орецкая Т. С.,
Шабарова З. А.*

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

Изучено взаимодействие эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* с набором 30-звенных субстратов со структурными аномалиями в участке узнавания (¹CCA/TGG) и прилегающих к нему нуклеотидных последовательностях. При наличии разрыва в цепи фосфодиэфирных связей в центре участка узнавания между остатками dC и dA наблюдается замедление гидролиза немодифицированной цепи, а модифицированная цепь практически не расщепляется. Удаление в этом субстрате из места разрыва фосфатной группы не приводит к изменению скорости его расщепления. Отсутствие одной из фосфатных групп во фланкирующей последовательности «на расстоянии» двух нуклеотидных пар от участка узнавания вызывает замедление ферментативного гидролиза. Удаление остатка dA или dT из участка узнавания *EcoRII* полностью блокирует ферментативную реакцию. Фермент *EcoRII*, по-видимому, не взаимодействует с фосфатной группой, расположенной между остатками dC и dA в участке узнавания. Высказаны предположения о возможных контактах эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* с dA- и dT-остатками участка узнавания и с углеводфосфатным остовом фланкирующих нуклеотидных последовательностей.

В настоящее время во многом расширились представления о конформационных возможностях ДНК: обнаружены новые формы двойной спирали и ее конформационная неоднородность, флуктуации углеводфосфатного остова и др. Вместе с тем крайне мало известно о взаимосвязи между конформацией ДНК и функционированием ферментов, узнающих в ней определенные последовательности, в частности эндонуклеаз рестрикции. Для того чтобы восполнить этот пробел, в нашей лаборатории начато изучение узнавания и расщепления эндонуклеазой рестрикции *EcoRII* синтетических субстратов со структурными аномалиями в участке узнавания этого фермента и в прилегающих последовательностях.

В данном сообщении рассматривается взаимодействие рестриктазы *EcoRII* с 30-звенным ДНК-дуплексом (I), содержащим ее участок узнавания (¹CCA/TGG):



а также с набором сконструированных на базе дуплекса (I) модифицированных субстратов (II)–(VIII) (таблица). В ДНК-дуплексах (II)–(IV) нарушена целостность углеводфосфатного остова внутри и вне участка узнавания *EcoRII* и тем самым увеличена конформационная подвижность химических группировок, примыкающих к месту разрыва. В ряду субстратов (II), (III), (V), (VI), (VII) и (VIII) последовательно «усиlena» модификация в центре участка узнавания: разрыв в цепи фосфодиэфирных связей, удаление фосфатной группы, удаление нуклеотидного звена (dA или dT), в том числе с сохранением ковалентной неизменности фосфодиэфирных связей. По данным Зиновьева и соавт. [2],

* Сообщение IX см. [1].

* Здесь и далее префикс d (дезокси) опущен, направление связей во всех дуплексах такое же, как в дуплексе (I).

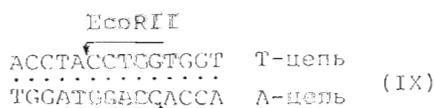
Расщепление 30-звенных ДНК-дуплексов эндонуклеазой рестрикции *Eco*RII

| Номер | ДНК-дуплекс * | Начальная скорость гидролиза, $v \cdot 10^9$, $M \cdot \text{мин}^{-1}$ | | Относительная начальная скорость гидролиза ** | |
|--------|---|--|--------|---|--------|
| | | цепь Т | цепь А | цепь Т | цепь А |
| (I) | ...C-A-A-C-C-T-G-G... ...G-T-T-G-G-A-C-C... | 43 | 28 | 100 | 100 |
| (II) | ...C-A-A-C-C-T-G-G... ...G-T-T-G-G-Ap C-C... | 1,3 | 0,01 | 3,0 | 0,04 |
| (III) | ...C-A-A-C-C-T-G-G... ...G-T-T-G-G-A-C-C... | 1,2 | <0,01 | 2,8 | <0,04 |
| (IV) | ...C-A-A-C-C-T-G-G... ...G-T-T-G-G-A-C-C... | 0,8 | 1,6 | 4,9 | 5,7 |
| (V) | ...C-A-A-C-C-G-G... ...G-T-T-G-G-A-C-C... | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (VI) | ...C-A-A-C-C-T-G-G... ...G-T-T-G-G-C-C... | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (VII) | ...C-A-A-C-C-G-G... ...G-T-T-G-G-A-C-C... | 0 | 0 | 0 | 0 |
| (VIII) | ...C-A-A-C-C-G-G... ...G-T-T-G-G-C-C... | 0 | 0 | 0 | 0 |

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

** Данные для ДИК-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 *Eco*RII 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 рестриктизы *Eco*RII с более коротким ДНК-дуплексом:



Изучение расщепления ДНК-дуплексов (I)–(IX) эндопукиназой рестрикции *EcoRI* проводили, вводя 5'-концевую ^{32}P -метку поочередно

Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза ДНК-дуплекса (I) от концентрации субстрата в координатах Лайнкувера — 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, $[S]_0 = 3,3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

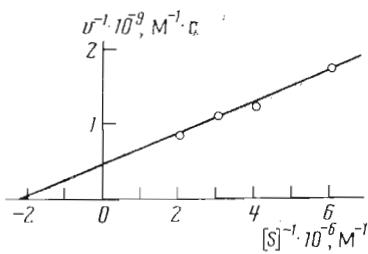


Рис. 1

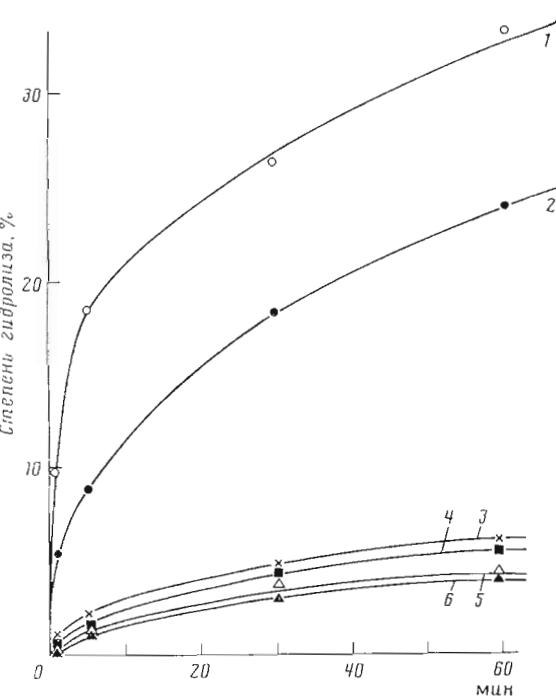
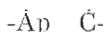


Рис. 2

в оба тяжа 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 $2,2 \cdot 10^{-9} \text{ M} \cdot \text{с}^{-1}$ (рис. 1). Начальная скорость расщепления Т-цепи (цепи названы по центральным звеньям участка узнавания) в среднем в 1,5 раза выше, чем А-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_nA/TGG), которая является изоизомером фермента *EcoRII*, обнаружено, что начальная скорость гидролиза А-цепи выше, чем Т-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 Т-цепи (в 35 раз по сравнению с соответствующей цепью ДНК-дуплекса (I)) и практическое полное блокирование гидролиза модифицированной цепи А (рис. 2, 4, таблица). Таким образом, локальное искашение 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-

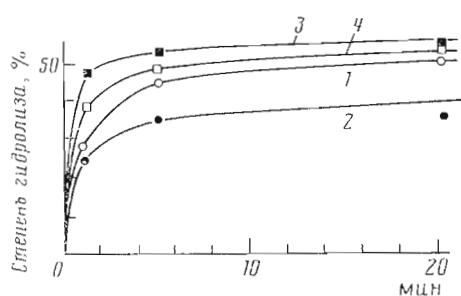


Рис. 3. Расщепление ^{32}P -дуплексов эндонуклеазой рестрикции *EcoRII*: 1 — (I), цепь T; 2 — (I), цепь A; 3 — (IX), цепь T; 4 — (IX), цепь A. $[S]_0 = 4,2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$

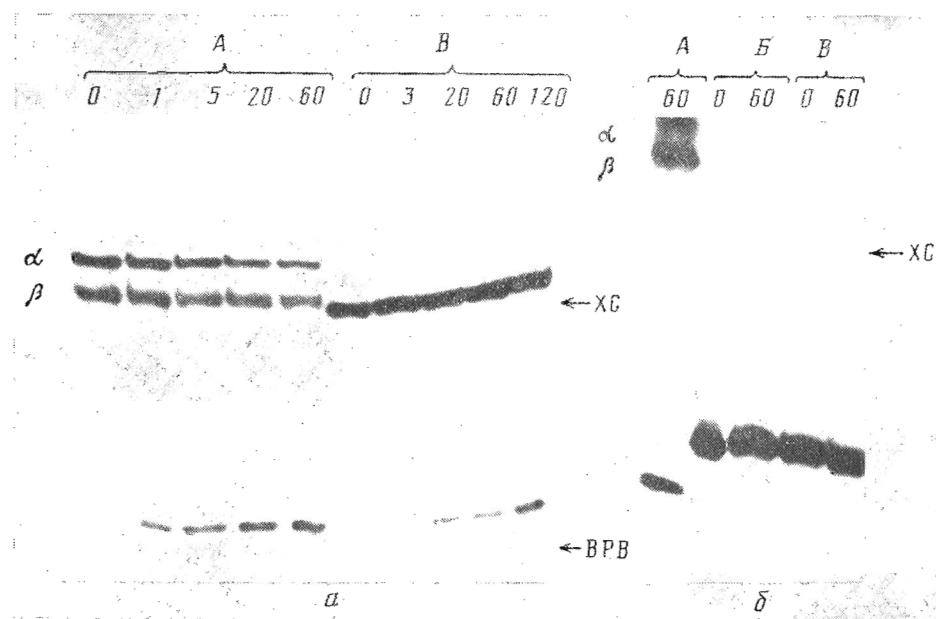


Рис. 4. Радиоавтограф гель-электрофореза продуктов расщепления ДНК-дуплексов (I) (A), (II) (B), (III) (B) эндонуклеазой рестрикции *Eco*RII: а – 5'-³²P-метка находится в Т-цепи дуплексов (I) и (III); б – 5'-³²P-метка находится в А-цепи дуплексов (I) – (III) (в случае субстратов (II) и (III) – в 18-звенном фрагменте «г» (А-цепь)). Время реакции (мин) указано над колонками геля. Здесь и на рис. 5 буквы слева: а – недиссоциированный дуплекс (I), β – 30-звенная цепь, образовавшаяся в результате диссоциации дуплекса (I). XC и ВРВ – положения красителей-маркеров ксиленцианоцена и бромфенолового синего

ских белково-нуклеиновых контактов, необходимых для узнавания субстрата ферментом *Eco*RII, причем в первую очередь нарушаются контакты с А-цепью. Наблюдаемое влияние модификации в цепи А на расщепление цепи Т находится в соответствии с выводом о взаимодействии эндонуклеазы рестрикции *Eco*RII с обеими цепями субстрата [4, 5].

По данным ряда работ, во взаимодействие эндонуклеаз рестрикции с субстратами вовлечены фосфатные группы полинуклеотидных цепей, локализованные как в пределах участка узнавания, так и вне его [6–8]. Для рестриктазы *Eco*RII известно только то, что она взаимодействует с 5'-фосфатной группой, примыкающей к месту расщепления [4]. С целью получения информации о роли фосфатной группы, расположенной у центральной А·Т-пары участка узнавания, было проведено сравнение кинетики гидролиза ферментом *Eco*RII субстрата (II) и субстрата (III), в котором из места разрыва удалена фосфатная группа. Оказалось, что картина расщепления этих двух субстратов очень близка (рис. 2, 4, таблица). Это позволяет сделать предварительный вывод об отсутствии контакта эндонуклеазы рестрикции *Eco*RII с указанной фосфатной группой. В отличие от рестриктазы *Eco*RII эндонуклеаза рестрикции *Bam*HI достаточно эффективно гидролизует ДНК-дуплекс без фосфатной группы в участке узнавания, причем при расщеплении модифицированного тяжа этого субстрата наблюдается потеря специфичности действия фермента [2].

Отсутствие фосфатной группы, расположенной «на расстоянии» двух нуклеотидных пар от участка узнавания *Eco*RII (субстрат IV), приводит к замедлению действия фермента, причем начальная скорость расщепления немодифицированной цепи в 18, а модифицированной в 55 раз ниже, чем для дуплекса (I) (таблица, рис. 2). Из этого следует, что взаимодействие эндонуклеазы *Eco*RII с двойной спиралью ДНК распространяется за пределы участка узнавания. Вероятен контакт фермента с фосфатной группой, подвергавшейся удалению; возможны контакты и с другими расположеннымными вблизи места модификации фрагментами углеводфос-

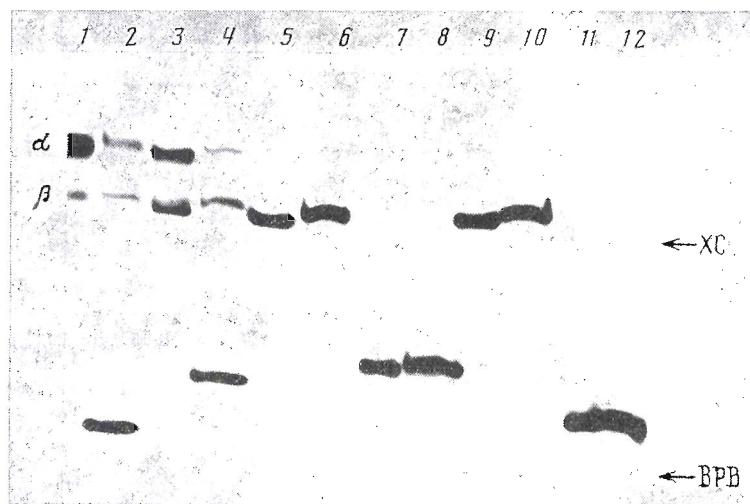


Рис. 5. Радиоавтограф гель-электрофореза продуктов расщепления ДНК-дуплексов (I), (V) и (VI) эндонуклеазой рестрикции *EcoRII*. ^{32}P -метка в Т-цепи: 1, 5, 11 – исходные субстраты (I), (VI), (V) (в случае субстрата (V) ^{32}P -метка находится в 13-звенном фрагменте «е» (Т-цепь); 2, 6, 12 – продукты 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 остава. 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 дуплекс (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 углеводфосфатного остава, 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 CH₃-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), GTATGAAGCTAGAGCC (г), AGGTTGGCAGCATC (д), GATGCTGCCAACCC (е), GGCTCTAGCTTCATAC (ж), GGTGGCAGCATC (з), ACCTACCTGGTGGT (и),

ACCACCCAGGTAGGT (к), TAGAGCCGGTTGGC (и), GCCAACCGGCTCTA (м), необходимые для получения дуплексов (I)–(IX), синтезировали триэфирным методом в растворе [10] и на цеплюозных дисках на автомате-синтезаторе «Виктория-2» [11]. Затем получали отдельные тяжи дуплексов (I)–(VIII): GATGCTGCCAACCTGGCTCTAGCTTCATAC (и), GTATGAAGCTAGACGCCAGCTTGGCAG-CATC (о), AACCTGGCTCTAGCTTCATAC (и), GATGCTGCCAACCGGCTCTAGCTTCATAC (р) и GTATGAAGCTAGACGCCAGCTTGGCAGCATC (е). Синтез и выделение олигонуклеотидов (н–с) осуществляли как описано в работе [10]. Субстраты (I)–(VIII) были получены совместным отжигом следующих олигонуклеотидов: (и)+(о) (I), (и)+(г)+(5'-фосфорилированный (д)) (II), (и)+(г)+(д) (III), (а)+(и)+(о) (IV), (е)+(ж)+(о) (V), (и)+(г)+(з) (VI), (р)+(о) (VII), (и)+(с) (VIII), (и)+(к) (IX). 5'-Фосфорилирование и 5'-³²P-мечение нуклеотидного материала осуществляли T4-полинуклеотидкиназой. Препараторы 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 (Олайский 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°C в течение 1–120 мин в 10 мкл 40 мМ буфера трис-HCl, pH 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°C в 10 мкл 10 мМ буфера трис-HCl, pH 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°C.

Анализ продуктов гидролиза проводили методом электрофореза в 20% поликариламидном геле, содержащем 7 М мочевину [5]. После проведения авторадиографии из геля вырезали зоны, соответствующие исходному материалу и продуктам гидролиза. Их радиоактивность измеряли по Черенкову на стетчике Delta-300 (Tracor, 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., Исагулянц М. Г., Кузнецова С. А., Косых В. Г., Шабарова З. А. // Биоорганс. 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. 10. № 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., Rosenthal 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 И. Г., Крынецкая Н. Ф., Громова Е. С., Шабарова З. А., Цех Д. // Биополимеры и клетка. 1987. Т. 3. № 6. С. 301–308.
11. Орецкая Т. С., Кубарева Е. А., Ломакин А. И., Грязнов С. М., Потапов В. К. // Химия природн. соедин. 1987. № 1. С. 153–155.

Поступила в редакцию
12.XI.1986
После доработки
8.I.1987

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

INTERACTION OF *EcoRII* 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 *EcoRII* restriction endonuclease with a set of 30-membered substrates having structural anomalies in the recognition site (¹⁴CCT/AGG) and in adjacent sequences has been studied. A nick in the centre of the *EcoRII* 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 two-base-pair «distance» from the recognition site slows down the enzymatic hydrolysis. Removal of dA or dT out of the *EcoRII* recognition site blocks the enzymatic reaction. It appears that *EcoRII* does not interact with the phosphate group between dC and dA residues in the recognition site. Suggestions are made concerning possible contacts of the *EcoRII* restriction endonuclease with dA- and dT-residues of the recognition site and with the sugar-phosphate backbone of the adjacent nucleotide sequences.