



УДК 577.152.3.1\*214' (142 + 145)

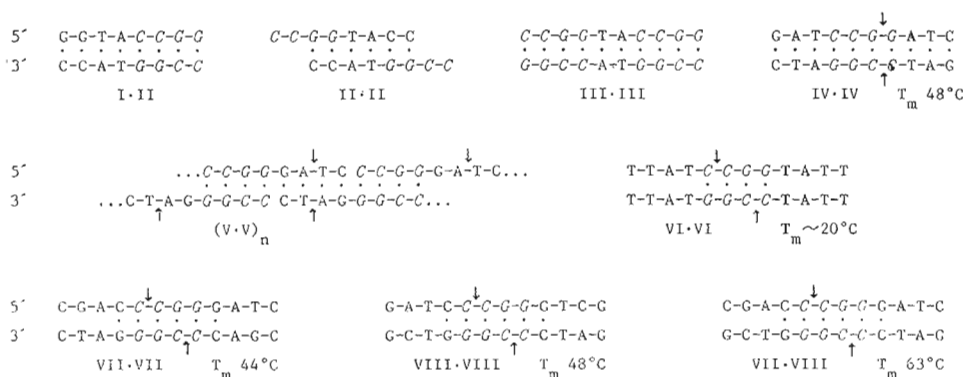
## СИНТЕТИЧЕСКИЕ ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДЫ В ИЗУЧЕНИИ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *MspI*\*

Борсков Ю. Г., Титеева Г. Р., Берлин Ю. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Изучено действие рестриктазы *MspI* на ряд олигодезоксинуклеотидов, различающихся устойчивостью образуемых дуплексов и положением сайта узнавания относительно концов последовательности. Сделан вывод о двухцепочечной структуре истинного субстрата *MspI* и о необходимости фланкирования участка узнавания с обеих сторон. Установлено, что раздельное расщепление комплементарных олигонуклеотидов CGACCCGGGATC и GATCCCGGGTTCG ингибируется как продуктами их расщепления, так и гексануклеотидами GGТАСС и GGATCC (в 10-кратном избытке), но не гексануклеотидом CGGCGC. Показано, что полиэтиленгликоль в низких концентрациях (1—3%) стимулирует, а в более высоких (7—14%) ингибирует расщепление олигонуклеотидов *MspI*. Предложена схема функционирования этого фермента, включающая поэтапное узнавание рестриктового сайта ферментом и его неспецифическое взаимодействие с фланкирующими участками ДНК, существенное для образования продуктивного комплекса.

Эндонуклеазы рестрикции служат важным инструментом структурно-функционального изучения нуклеиновых кислот. Ранее, исследуя взаимодействие некоторых рестриктаз, в частности *MspI*, с комплексами ДНК—олигонуклеотид, мы получили данные, свидетельствующие о двухцепочечности субстрата этой эндонуклеазы [1] (ср. также [2]). Дальнейшее изучение ее свойств мы проводили с использованием серии синтетических олигонуклеотидов (I—VIII) (схема), содержащих *MspI*-сайт CCGG в различном структурном окружении. Оказалось, что олигонуклеотиды (I, II и III) и дуплекс (I·II) устойчивы к *MspI*, тогда как самокомплементарный декануклеотид (IV), а также олигонуклеотиды (VI—VIII), в составе которых рестриктный сайт фланкирован с обеих сторон, расщепляются в ожидаемом месте (см., например, рис. 1). Следовательно, для расщепления *MspI*, как и многими другими рестриктазами [3—5], необходимо двусто-



Все олигонуклеотиды 5'-<sup>32</sup>P-фосфорилированы; дуплекс (III·III), полученный двойкой дуплекса (II·II) с помощью ДНК-полимеразы I и [α-<sup>32</sup>P]dGTP и содержащий свободные 5'-гидроксилы и межнуклеозидный <sup>32</sup>P в соответствующих позициях, не отличался по субстратным свойствам от своего 5'-фосфорилированного аналога. Курсивом выделены *MspI*-сайты; стрелками отмечены положения фосфодиэфирных связей, расщепляемых этой рестриктазой. Величина  $T_m$  дуплекса (VI·VI) оценена по аналогии с данными работы [6]

\* Префикс d (дезокс) всюду опущен.

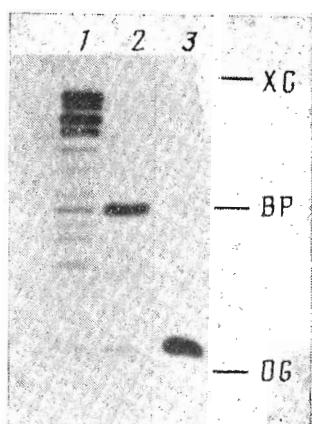


Рис. 1. Локализация места расщепления 5'-<sup>32</sup>P-додекануклеотида (VII) рестриктазой *MspI*: 1, 3 — частичный и полный гидролиз фосфодиэстеразой. зменного яда, 2 — расщепление рестриктазой *MspI*. Анализ электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ (ТБ-буфер, содержащий 7 М мочевины). Указано положение маркерных красителей — оранжевого G (OG), бромфенолового синего (BP) и ксилонцианола (XC)

роннее фланкирование участка узнавания, т. е. *MspI* взаимодействует не только с самим сайтом, но и с его окружением. Не все структурные элементы этого окружения одинаково важны для узнавания рестриктазой. Так, октануклеотид (V), состоящий из двух самокомплементарных четырехзвенных участков и в принципе способный образовывать регулярную двойную цепь с одноцепочечными разрывами рядом с *MspI*-сайтами (см. схему), под действием *MspI* частично расщепляется, но в стороне от узнаваемой последовательности. Таким образом, для правильного расщепления важно не только само наличие нуклеотидных пар рядом с рестриктным сайтом, но и целостность сахарофосфатного остова. Напротив, дуплексная структура фланкирующих областей, по-видимому, не обязательна: например, додекануклеотид (VI), самокомплементарный лишь по расположенному в середине цепи сайту *MspI*, расщепляется по этому сайту в обычном месте.

Для ряда субстратов *MspI* с различной устойчивостью вторичной структуры (см. кривые плавления на рис. 2) была определена температурная зависимость предельной степени эндонуклеазного расщепления ( $\alpha_{\infty}$ ). Приведенные данные (рис. 3) демонстрируют склонность к снижению степени расщепления олигонуклеотидов с уменьшением стабильности дуплексов, что свидетельствует о термолабильности большинства использовавшихся субстратов в изученном температурном интервале и о специфичнос-

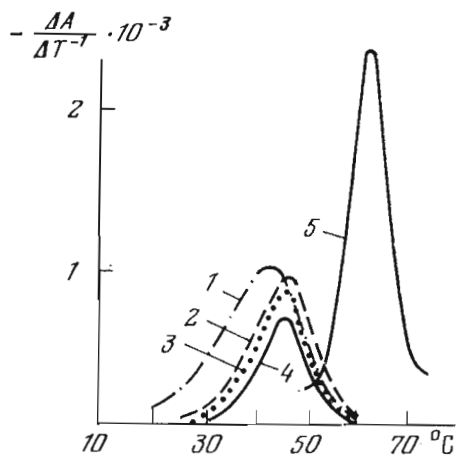


Рис. 2

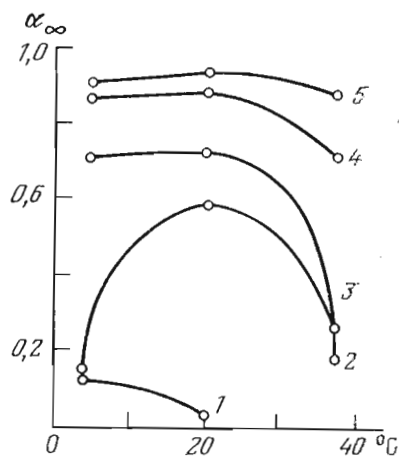


Рис. 3

Рис. 2. Дифференциальные кривые плавления олигонуклеотидных дуплексов в отсутствие полиэтиленгликоля (1 — VII·VII, 2 — VIII·VIII, 3 — IV·IV, 5 — VII·VIII) и в присутствии 3% полиэтиленгликоля (4 — IV·IV)

Рис. 3. Температурная зависимость предельной степени расщепления  $\alpha_{\infty}$  олигонуклеотидных комплексов: 1 — VI·VI, 2 — VIII·VIII, 3 — IV·IV, 4 — VII·VII, 5 — VII·VIII. Начальная концентрация олигонуклеотидов 0,2—0,5 мкМ, соотношение фермент — субстрат 5 ед. акт./пмоль (для IV·IV — 2 ед. акт./пмоль)

ти фермента к их вторичной структуре. Таким образом, истинный субстрат *MspI* является двухцепочечным, а несамокомплементарные олигонуклеотиды, как видно из снижения степени их расщепления с ростом температуры выше определенного уровня (рис. 3), взаимодействуют с этим ферментом в виде несовершенного дуплекса по участку узнавания. В то же время комплементарные додекануклеотиды (VII) и (VIII), по отдельности дающие одинаковой длины дуплексы (VII·VII) и (VIII·VIII) по самокомплементарному участку CCCGGG, сильно различаются между собой по степени превращения (рис. 3, кривые 4 и 2), которая не коррелирует с их термической устойчивостью. Подобное явление было отмечено ранее: степень расщепления додекануклеотида GAACCGGAGA под действием *MspI* оказалась на порядок выше, чем у комплементарного ему нонануклеотида TCTCCGGTT, что было приписано отрицательному влиянию на активность фермента пиримидинового окружения рестриктоного сайта [2]. Возможно, меньшая степень расщепления олигонуклеотида (VIII) по сравнению с (VII) также связана с преимущественно пиримидиновым окружением *MspI*-сайта. В самом деле, четыре нуклеотидных звена, фланкирующих этот сайт (по два звена с каждой стороны), содержат три пиримидиновых остатка в олигонуклеотиде (VIII), но лишь один в олигонуклеотиде (VII). Вместе с тем нельзя исключить и влияния некомплементарных участков: выступающие концы могут вносить существенный вклад в стабилизацию дуплекса (например, в рибо-ряду при переходе от рGGCC к рGGCCU в 1 M NaCl  $T_m$  повышается с 38 до 55° C [6]), так что, возможно, в случае дуплексов (VII·VII) и (VIII·VIII) взаимодействие выступающих концов по-разному влияет на субстратные свойства олигонуклеотидов.

Изучение действия *MspI* по отдельности на олигонуклеотиды (IV) и (VII) показало, что расщепление сопровождается ингибированием продуктами реакции. Так, степень расщепления додекамера (VII) в результате добавления к нему эквимольного количества продуктов этой реакции (пента- и гептануклеотида) снижается на 18%. Еще сильнее добавление продуктов *MspI*-гидролиза сказывается на степени расщепления додекамера (VIII) (снижение на 75%). Оказалось также, что при этом возможно и гетерологичное ингибирование: в реакции каждого из додекануклеотидов (VII) и (VIII) с *MspI* в присутствии продуктов *MspI*-фрагментации соответственно додекануклеотидов (VIII) и (VII) наблюдается, как и в случае обычного гомологичного ингибирования, снижение степени расщепления (на 18 и 44%).

Ингибирующее действие этих соединений, по-видимому, основано на способности эндонуклеаз рестрикции связываться с олигонуклеотидами, лишенными интактного сайта [7, 8]. Чтобы определить, насколько специфично такое связывание, мы исследовали влияние ряда гексануклеотидов, не содержащих *MspI*-сайта — GGTACC (IX), GGATCC (X) и CGGCGC (XI), на расщепление этой рестриктазой додекануклеотида (VII). По степени расщепления в стандартных условиях этот олигонуклеотид занимает промежуточное положение среди изучавшихся нами субстратов, поэтому именно на нем влияние дополнительных факторов могло проявиться наиболее четко. Оказалось, что в эквимольном соотношении с субстратом ни один из перечисленных гексануклеотидов (в отличие от упоминавшихся выше 5- и 7-звенных продуктов расщепления додекануклеотидов) не тормозит реакцию, тогда как при 10-кратном избытке эти вещества снижают предельную степень расщепления на 61, 33 и 4% соответственно, что свидетельствует о довольно высокой специфичности их действия.

Структурным сходством с субстратом, предположительно лежащим в основе ингибирования продуктами реакции, нельзя объяснить ингибирующий эффект гексануклеотидов (IX—XI), поскольку у них нет явных общих структурных характеристик с последовательностью CCGG. Причина ингибирования не может заключаться и в образовании гетеродуплексов типа (VIII·гексануклеотид), так как гексануклеотид (XI), практически не ингибирующий реакцию, обладает не меньшей степенью комплементарности к соединению (VIII), чем ингибирующие гексануклеотиды (IX) и (X) (рис. 4).

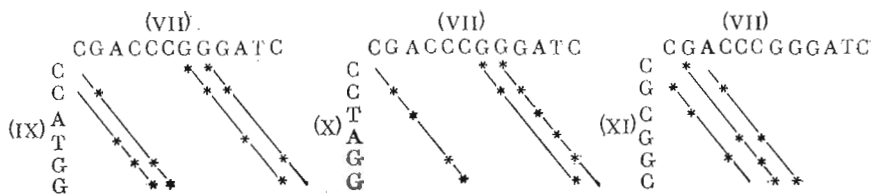


Рис. 4. Матрицы комплементарности гексануклеотидов (IX—XI) додекануклеотиду (VII) (отмечены комбинации, содержащие не менее трех комплементарных звеньев)

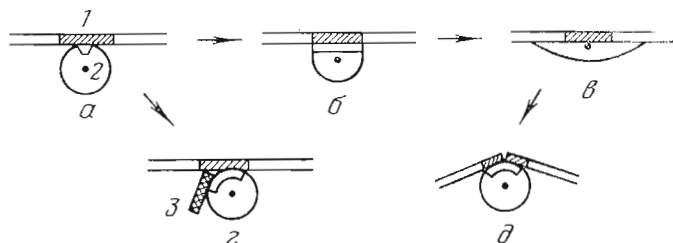


Рис. 5. Гипотетическая схема взаимодействия рестриктазы *MspI* с нуклеотидной последовательностью: а — нативный фермент на начальном этапе взаимодействует с соответствующей частью узнаваемой последовательности (1); на этом этапе фермент обладает сниженным уровнем специфичности; б — возникновение комплекса сопровождается конформационной перестройкой фермента, в ходе которой он узнает весь рестриктный сайт; в — далее становится возможным неспецифическое взаимодействие фермента с участками ДНК, фланкирующими рестриктный сайт, что сопровождается приближением гидролитического центра (2) с местом будущего разрыва цепи ДНК; г — олигонуклеотиды (3), способные связываться с формирующимся активным центром, могут ингибировать фермент; д — разрыв соответствующей фосфодиэфирной связи в рестриктном сайте

Скорее всего это явление связано с характером взаимодействия фермента с узнаваемой последовательностью. Такое взаимодействие предположительно протекает в несколько этапов. Сначала фермент узнает лишь часть (вероятно, динуклеотидную) рестриктного сайта. В том случае, если за ней не оказывается продолжения узнаваемой последовательности, процесс узнавания прерывается. Если же дальнейшая последовательность отвечает структуре участка узнавания, то образуется реакционноспособный фермент-субстратный комплекс (рис. 5а, б). Такой механизм с постепенным уточнением сайта, сопровождающимся непрерывной структурной перестройкой фермента, обеспечивает быстроту и надежность работы рестриктаз, но делает их уязвимыми для пекоторых олигонуклеотидов, которые способны связываться со свободной частью активного центра на одной из стадий его формирования, когда он, по-видимому, еще обладает другим, не окончательным характером специфичности. Образование такого комплекса, возможно, усиленного взаимодействием с неспецифическими участками, фланкирующими активный центр, затрудняет формирование реакционноспособной конформации и тем самым ингибирует фермент (рис. 5г). Предположение о сниженном на начальных этапах уровне специфичности эндонуклеазы рестрикции согласуется с данными об ингибировании рестриктазы *BamHI* динуклеотидами, входящими в участок узнавания этого фермента (GGATCC) [8]: оказалось, что по величине константы ингибирования один из этих динуклеотидов (GG) резко отличается от остальных четырех, превосходя их в 6—40 раз.

Неспецифическое связывание с рестриктазами таких сильно заряженных субстратов, как олиго- и полинуклеотиды, в значительной степени должно определяться электростатическими взаимодействиями. В связи с этим мы посмотрели, как влияет на действие *MspI* полиэтиленгликоль, обладающий значительно более низкой диэлектрической проницаемостью, чем вода, и, следовательно, способный усиливать электростатические взаимодействия. Оказалось, что в концентрациях 1—3% он стимулирует расщепление исследованных олигонуклеотидов примерно на 30%, а в более

высоких концентрациях (7—14%) ингибирует эту реакцию (рис. 6). При этом, судя по кривым плавления дуплекса (IV·IV) (рис. 2), полиэтиленгликоль в низких концентрациях не влияет на стабильность вторичной структуры олигонуклеотидов. В то же время не выявлено статистически достоверных различий в степени расщепления отдельных *MspI*-сайтов в составе *Sall*-рестрикта плазмиды pBR322 в присутствии 0, 3 и 15% полиэтиленгликоля. Можно предположить, что это вещество, усиливая связывание фермента с олигонуклеотидами, в малых концентрациях стимулирует их расщепление, компенсируя малую протяженность олигонуклеотидов, тогда как при более высоких концентрациях взаимодействие настолько усиливается, что начинает затруднять распад комплекса фермента с продуктами расщепления и таким образом тормозит реакцию. Отсутствие последнего эффекта при действии рестриктазы на ДНК можно объяснить тем, что в силу молекулярно-кинетических причин высокомолекулярные продукты легче высвобождаются из активного центра.

По-видимому, способность неспецифически связываться с заряженными субстратами объясняет также некоторые свойства других ферментов нуклеинового обмена, например ингибирование нуклеазы S1 продуктами реакции [9] и стимулирование ДНК-лигазы полиэтиленгликолем [10, 11]. Что касается рестриктаз, то неспецифическое связывание может играть важную роль на заключительных стадиях реакции, например вызывать сближение магнийсодержащего гидролитического центра с субстратом. Можно предположить, что в результате специфического взаимодействия фермента с узнаваемой последовательностью происходит неспецифическое связывание его с областями, фланкирующими рестриктный сайт, что приводит к образованию функционально активной конформации фермента, расщепляющей ДНК (рис. 5в). Такой подход способен объяснить необходимость фланкирования узнаваемой последовательности, а также некоторые случаи изменения специфичности рестриктаз. Так, вырождение сайта узнавания под влиянием органических растворителей (см., например, [12]) может происходить вследствие усиления электростатического связывания фермента с субстратом, вызванного снижением диэлектрической проницаемости, что компенсирует отсутствие специфического взаимодействия с неканоническими основаниями.

Авторы благодарны В. В. Буткусу и С. Й. Климашаускасу за синтез ряда олигонуклеотидов.

### Экспериментальная часть

В работе использовали трис, акриламид, метиленбисакриламид (Merck), бычий сывороточный альбумин (BSA),  $MgCl_2$ ,  $H_3BO_3$  (Sigma), дитиотреит, гАТР (Calbiochem), полиэтиленгликоль 40000 (Loba-Chemie), эндонуклеазу рестрикции *MspI*, Т4-полинуклеотидкиназу (НПО «Фермент», Вильнюс), фосфодиэстеразу змеиного яда (Worthington) и  $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{гАТР}$  (3000 Ки/ммоль, Amersham).

Олигонуклеотиды (I—XI), синтезированные фосфотриэфирным методом ([13]; см. также [4]),  $5'$ -фосфорилировали действием Т4-полинуклеотидкиназы (1 ед. акт.) и  $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{гАТР}$  (10 мкКи на 200 пмоль олигонуклеотида) в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСI (рН 8,8), 10 мМ дитиотреит и 10 мМ  $MgCl_2$ , в течение 30 мин при 37° С, до баеяли 2 мКи 0.1 мМ гАТР, повторяли инкубацию и продукт фосфорилирования выделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-50.

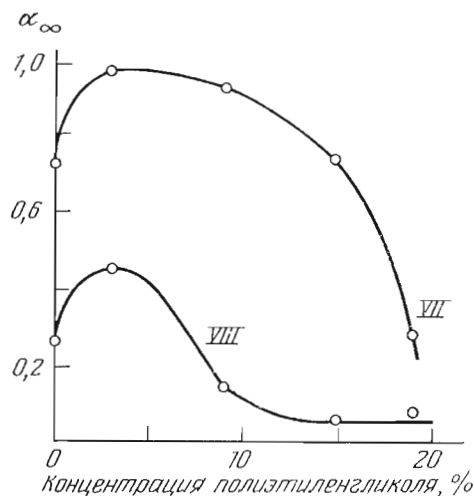


Рис. 6. Влияние полиэтиленгликоля на величину  $\alpha_\infty$  додекануклеотидов (VII) и (VIII)

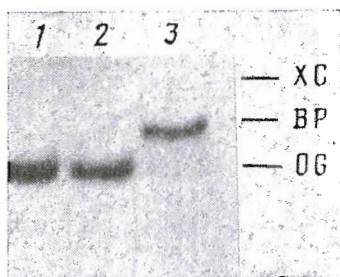


Рис. 7. Электрофорез 5'-<sup>32</sup>P-меченых олигонуклеотидов в 20% ПААГ: 1 — VII, 2 — VIII, 3 — смесь эквимольных количеств VII и VIII

Обработку рестриктазой (5 ед. акт. на 1 пмоль олигонуклеотида) проводили 1 ч при соответствующей температуре в 15 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 6 мМ KCl, 1 мМ дитиотреит и 10 мкг/мл BSA. Фосфодиэстеразой змеиного яда гидролизовали как описано в работе [14]. Реакционные смеси анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле в ТБ-буфере (50 мМ трис-борат (рН 8,3), 1 мМ EDTA) при 15–30 В/см. Участки геля, содержащие меченый продукт расщепления и непрореагировавший субстрат, вырезали и по соотношению их радиоактивности, измеренной в толуольном сцинтиллаторе, рассчитывали степень расщепления.

Продукты расщепления олигонуклеотидов (VII) и (VIII) для последующих опытов по ингибированию получали из 200 пмоль соответствующего олигонуклеотида обработкой 40 ед. акт. *MspI* в течение 3 ч при 20° С, полноту реакции контролировали геле-электрофорезом 5'-<sup>32</sup>P-меченых аликутов.

Образование дуплекса (VII·VIII) при смешивании обоих комплементарных олигонуклеотидов подтверждено электрофоретически (рис. 7).

Температурную зависимость УФ-поглощения 3 мкМ растворов олигонуклеотидов в рестриктазном буфере измеряли на спектрофотометре Gilford 2400-2 при положительном градиенте температуры 0,5 град/мин. Результаты плавления олигонуклеотидных дуплексов обрабатывали на ПЭКВМ «Искра 226» и представляли в виде  $f(T) = dA_{260}/dT^{-1}$ . Производную вычисляли путем линейной аппроксимации каждых девяти экспериментальных точек методом наименьших квадратов. Величину  $T_m$  рассчитывали по формуле [15]

$$T_m = T_{1/2} (1 - T_{1/2} / |\Delta H|),$$

где  $\Delta H = -18,28 / (1/T_{1/2} - 1/T_{3/4})$ ,  $T_{1/2}$  и  $T_{3/4}$  — абсолютные температуры, соответствующие максимуму дифференциальной кривой и точке, в которой она опустилась на половину максимальной величины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тимеева Г. Т., Виноградов С. В., Берлин Ю. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 11. С. 1484–1491.
2. Yoo O. J., Agarwal K. L. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 22. P. 10559–10562.
3. Baumstark B. R., Roberts R. J., RajBhandary U. L. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 18. P. 8943–8950.
4. Берлин Ю. А., Буткус В. В. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 8. С. 1224–1232.
5. Берлин Ю. А., Звонок Н. М., Чувило С. А. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 10. С. 1522–1535.
6. Freier S. M., Alkema D., Sinclair A., Neilson T., Turner D. H. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 17. P. 4533–4539.
7. Langowski J., Pingoud A., Goppelt M., Maass G. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 20. P. 4727–4736.
8. Hirsch B., Mayer H., Kula M.-R. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 11. P. 2547–2559.
9. Голцберг Э. М. // Молекуляр. биология. 1979. Т. 13. № 5. С. 1064–1069.
10. Harrison B., Zimmerman S. B. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 21. P. 8235–8251.
11. Takanashi M., Uchida T. // J. Biochem. 1986. V. 100. № 1. P. 123–131.
12. Nasri M., Thomas D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 2. P. 814–821.
13. Narang S. A., Hsiung H. M., Brousseau R. // Meth. Enzymol. 1979. V. 68. P. 90–98.
14. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. // Nucl. Acids Res. 1974. V. 1. № 3. P. 331–353.
15. Tibanyenda N., de Bruin S. H., Haasnoot S. A., van der Marel G. A., van Boom J. H., Hilbers C. W. // Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. № 1. P. 19–27.

Поступила в редакцию  
27.V.1987

**SYNTHETIC OLIGODEOXYNUCLEOTIDES  
IN STUDYING *Msp*I RESTRICTION ENDONUCLEASE**

BORESKOV Yu. G., TITEEVA G. R., BERLIN Yu. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Interaction of *Msp*I restriction endonuclease with a series of oligodeoxynucleotides, varying in stability of secondary structure and in location of the restriction site, has been studied. It is shown that a functionally active *Msp*I-site must be double-stranded and flanked from both sides. Separate *Msp*I-cleavage of dodecanucleotides dCGACCCGGGATC and dGATCCCGGGTTCG is inhibited by the reaction products as well as by non-homological hexanucleotides dGGTACC and dGGATCC (but not by dCGGCGC). Polyethylene glycol in low concentrations (1—3%) promotes and in higher concentrations (7—14%) inhibits the cleavage. A scheme of *Msp*I functioning is suggested including enzyme's step-by-step recognition of the restriction site and its nonspecific interaction with flanking segments of DNA, which leads to formation of the productive complex.