



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.4:577.152.314'14

© 1992 г. Е. А. Кубарева, О. В. Пятраускене,
А. С. Карягина *, И. И. Никольская *, Е. С. Громова

**ИЗМЕНЕНИЕ МЕСТА РАСЩЕПЛЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ
СУБСТРАТОВ ЭНДОНУКЛЕАЗОЙ РЕСТРИКЦИИ *Sso*II
ПРИ ВВЕДЕНИИ НЕНУКЛЕОТИДНЫХ ВСТАВОК В УЧАСТОК
УЗНАВАНИЯ**

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

** Институт биологической и медицинской химии РАМН, Москва*

Эндонуклеаза рестрикции типа II *Sso*II узнает и гидролизует в обеих цепях ДНК последовательность (5')-¹CCNGG- (стрелкой отмечено каноническое место расщепления) [1], вырожденную по центральной нуклеотидной паре. Для выяснения участия отдельных гетероциклических оснований и углеводофосфатного остова участка узнавания в специфическом ДНК-белковом взаимодействии нами изучено расщепление *Sso* II аналогов субстратов (II)–(VII), в которых один из нуклеозидных остатков в $CC \frac{A}{T} GG$ -последовательности заменен на остаток 1,3-пропандиола, 1,2-

дидезокси-*D*-рибофуранозы (ddR) или 9-[1'-гидроксигидрокси-2'-(гидроксиметил)-этокси]метилгуанина (glG) (таблица). В дуплексах (II)–(VI) частично или полностью сохранен углеводофосфатный остов, но удалено гетероциклическое основание. В субстрате (VII), напротив, нарушен углеводный фрагмент, но сохранено основание. Аналоги субстратов (II)–(IV) без гетероциклических оснований в центре участка узнавания представляют особый интерес в связи с определением тех структурных элементов, которые узнаются эндонуклеазой *Sso*II в вырожденной нуклеотидной паре.

Соединения (I)–(VII) синтезированы как описано ранее [2–4]. Введение ненуклеотидных вставок вызывает дестабилизацию ДНК-дуплексов с изменением температуры плавления на 14–19°С, однако данные КД свидетельствуют об отсутствии существенных конформационных изменений двойной спирали [4]. Расщепление соединений (I)–(VII), несущих на 5'-конце ³²P-метку поочередно в «верхней» и «нижней» цепи, проводили *Sso*II (10 ед. акт.) в 10 мкл 10 мМ трис-HCl-буфера, pH 7,5, содержащего 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиозэритрит при 10°С. Реакционные смеси анализировали электрофорезом в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины.

Эндонуклеаза *Sso*II расщепляет все модифицированные ДНК-дуплексы (II)–(VII) (таблица). Замена одного из нуклеозидов центральной пары участка узнавания на пропиленовый «мостик» или ddR приводит к значительному повышению эффективности расщепления обеих цепей ДНК-дуплексов (II)–(IV). Кроме того, в случае каждого из субстратов

Расщепление ДНК-дуплексов с ненуклеотидными вставками эндонуклеазой рестрикции *Sso* II

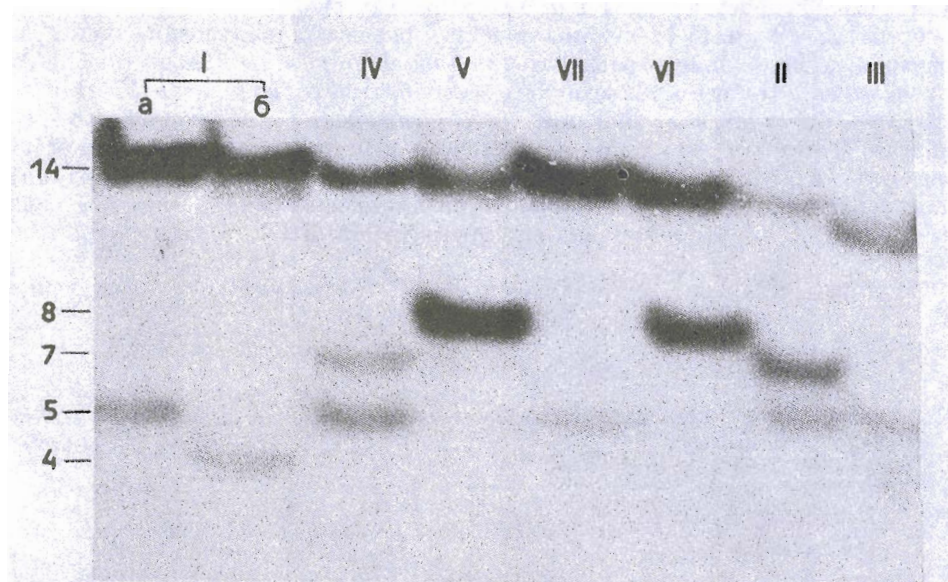
Номер дуплекса	ДНК-дуплекс *	Относительная степень гидролиза, % ** за 120 мин
(I)	$ \begin{array}{c} 5' \text{ ACCTA-} \overline{\text{CCTGG}} \text{-TGGT } 3' \\ 3' \text{ TCGAT-} \overline{\text{GGAAC}} \text{-ACCA } 5' \end{array} $	100 100
(II)	$ \begin{array}{c} \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow \\ \dots \text{C-CpO(CH}_2\text{)}_3\text{OpG-G} \dots \\ \dots \text{G-G} \text{--- A ---} \text{C-C} \dots \end{array} $	220 *** 118
(III)	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ \dots \text{C-C} \text{--- T ---} \text{G-G} \dots \\ \dots \text{G-GpO(CH}_2\text{)}_3\text{OpC-C} \dots \end{array} $	211 136 ***
(IV)	$ \begin{array}{c} \downarrow \quad \downarrow \\ \dots \text{C-C-ddR-G-G} \dots \\ \dots \text{G-G} \text{--- A-C-C} \dots \end{array} $	237 *** 158
(V)	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ \dots \text{C-C-T-ddR-G} \dots \\ \dots \text{G-G-A-C-C} \dots \end{array} $	195 *** 68
(VI)	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ \dots \text{C-C-T-G-G} \dots \\ \dots \text{ddR-G-A-C-G} \dots \end{array} $	33 163 ***
(VII)	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ \dots \text{C-C-T-gIG-G} \dots \\ \dots \text{G-G-A-C-C} \dots \end{array} $	37 86

* Здесь и далее индекс «d» («дезокс») опущен; направление связей как в дуплексе (I). В дуплексах (II) — (VII) приведены только модифицированные по отношению к субстрату (I) (отчеркнутые участки цепей) фрагменты молекул.

** Отношение степени гидролиза индивидуальных цепей модифицированных ДНК-дуплексов (II) — (VII) к степени гидролиза соответствующих цепей исходного соединения (I) в тех же условиях. Данные верхних и нижних строк соответствуют расщеплению «верхней» и «нижней» цепей субстратов.

*** В случаях дуплексов (II)–(IV) приведена суммарная относительная степень гидролиза субстрата как в каноническом (:) так и в неканоническом (:) положении. Для дуплексов (V) и (VI) цифры соответствуют степени гидролиза субстрата в неканоническом положении участка узнавания.

(II)–(IV) наряду с каноническими разрывами (†) появляется одно новое место их расщепления $SsoII$ (‡) (рисунок, таблица). Оно примыкает с 5'-конца к нуклеотидному фрагменту в участке узнавания ДНК-дуплекса. Введение ddR вместо одного из dG участка узнавания вызывает изменение места расщепления $SsoII$ модифицированных цепей субстратов (V) и (VI). При этом эффективность расщепления модифициро-



Радиоавтограф гель-электрофореза продуктов расщепления «верхней» (а) и «нижней» (б) цепей дуплекса (I) и модифицированных цепей дуплексов (II)–(VII) эндонуклеазой *SsoII*. Время реакции 120 мин. Концентрация субстратов в расчете на дуплекс $3,5 \cdot 10^{-7}$ М. Цифры слева указывают длину олигонуклеотидов

ванной цепи возрастает, а немодифицированная цепь расщепляется *SsoII* в каноническом положении, но с меньшей эффективностью (рисунок, таблица). Как и для дуплексов (II)–(IV), «новое» место разрезания — гидролизуемая фосфодиэфирная связь субстратов (V) и (VI) — находится непосредственно рядом с введенной модификацией с 5'-конца. В случае эндонуклеазы *EcoRI* аналогичная модификация — замена любого из нуклеозидных остатков участка узнавания на остаток 1,3-бутандиола — приводила лишь к блокированию действия этого фермента [5].

Таким образом, впервые для эндонуклеаз рестрикции типа II обнаружено направленное изменение гидролитического действия при расщеплении синтетических субстратов. Ранее наблюдалось только частичное понижение специфичности узнавания эндонуклеазами рестрикции определенных нуклеотидных последовательностей в ДНК (релаксированная специфичность) при изменении условий проведения ферментативной реакции [6].

Способность *SsoII* эффективно расщеплять ДНК-дуплексы (II)–(IV) в каноническом положении указывает на то, что по крайней мере на стадии связывания контакты фермента *SsoII* с каждым из оснований вырожденной нуклеотидной пары участка узнавания отсутствуют. По-видимому, для функционирования эндонуклеазы *SsoII* не так важно и сохранение интактной углеводной части этих нуклеотидных остатков (см. гидролиз дуплексов (II) и (IV), таблица). Вместе с тем сопутствующее правильному неканоническому расщеплению модифицированных цепей дуплексов (II)–(IV) показывает, что на стадии катализа, вероятно, реализуются контакты *SsoII* с каждым из оснований центральной пары, которые и обеспечивают канонический гидролиз эндонуклеазой *SsoII*. Появление неканонического разрыва фосфодиэфирных связей в дуплексах (II)–(IV) рядом с местом модификации, на наш взгляд, стимулируется увеличением конформационной подвижности двукратнового участка

узнавания вследствие удаления гетероциклического основания. В случае субстратов (V) и (VI) неканонический разрыв локализован таким же образом, а правильного расщепления модифицированной цепи вообще не происходит. Это свидетельствует о необходимости контактов *SsoII* с остатками dG участка узнавания для обеспечения специфического гидролиза. Тот факт, что *SsoII* гидролизует субстрат (VII), в котором dG заменен на glG, только в каноническом положении (рисунок, таблица), доказывает определяющее значение внутреннего гуанина участка узнавания для «правильного» взаимодействия *SsoII* с ДНК.

Авторы выражают благодарность Е. М. Волкову, Е. А. Романовой и Т. С. Орецкой за синтез олигодезоксирибонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никольская И. И., Карпец Л. З., Каргашева И. М., Лопатина Н. Г., Скрипкин Е. А., Сучков С. А., Упорова Т. М., Грубер И. М., Дебов С. С. // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1983. Т. 12. № 1. С. 5–10.
2. Кузнецова С. А., Волков Е. М., Громова Е. С., Потанов В. К., Шабарова З. А. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1656–1662.
3. Волков Е. М., Кубарева Е. А., Сергеев В. Н., Орецкая Т. С. // Химия природн. соедин. 1990. № 3. С. 417–419.
4. Романова Е. А., Кузнецова Л. Г., Кубарева Е. А., Цытович А. В., Меренкова И. Н., Орецкая Т. С., Громова Е. С., Шабарова З. А. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 12. С. 1640–1648.
5. Wilk A., Koziolekiewicz M., Grajkowski A., Uznanski B., Stec W. J. // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 8. P. 2065–2068.
6. Malygin E. G., Zinoviev V. V. // Sov. Sci. Rev. D. Physiochem. Biol. 1989. V. 9. P. 87–142.

Поступило в редакцию
25.II.1992

E. A. KUBAREVA, O. V. PETRAUSKENE, A. S. KARYAGINA*, I. I. NIKOLSKAYA*,
E. S. GROMOVA

CHANGE OF CLEAVAGE SITE OF SYNTHETIC SUBSTRATES BY *SsoII* RESTRICTION ENDONUCLEASE DUE TO NON-NUCLEOTIDE INSERTS INTO THE RECOGNITION SEQUENCE

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow;
* Institute of Biological and Medical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences
Moscow

The cleavage of synthetic DNA duplexes containing 1,3-propanediol, 1,2-dideoxy-D-ribofuranose or 9-[1'-hydroxy-2'-(hydroxymethyl)ethoxy]methylguanine (glG) residues instead of one of dG residues or one of the nucleosides of the central base pair of the recognition site by *SsoII* restriction endonuclease (↓CCNGG) has been studied. It is found that the non-nucleotide insertions (except for glG) result in a change of the *SsoII* cleavage site and an increase of the efficiency of the cleavage. The novel noncanonical cleavage occurs at the phosphodiester bond adjoining the non-nucleotide insert from the 5'-end.

Технический редактор Н. Н. Беляева

Сдано в набор 20.05.92	Подписано к печати 18.06.92	Формат бумаги 70×100 ^{1/16}
Офсетная печать	Усл. печ. л. 10,4	Усл. кр.-отт. 7,2 тыс.
	Тираж 683 экз.	Уч.-изд. л. 12,5
	Зак. 2889	Бум. л. 4,0
	2 р. 60 к.	

Адрес редакции: 117831, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, корп. 32, комн. 306
Телефон: 330-60-38

2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6