



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

mom 13 * № 2 * 1987

УДК 577.152.314'14:547.963.3

ДНК-ДУПЛЕКСЫ С ФОСФОАМИДНОЙ СВЯЗЬЮ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ *EcoRII* И *Sso9II*

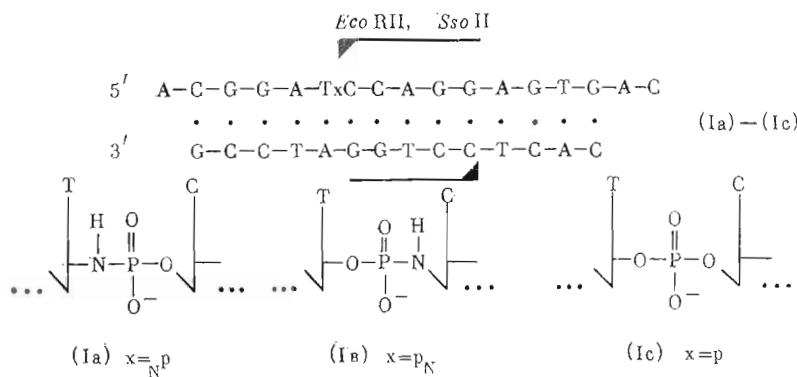
Громова Е.С., Виноградова М.Н., Упорова Т.М.,
Грязнова О.И., Исагулянц М.Г., Косых В.Г.**,
Никольская И.И.*, Шабарова З.А.*

Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

Институт медицинской энзимологии АМН СССР, Москва;*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР **,
г. Пущино, Московская обл.*

Модификация фосфодиэфирных связей, расщепляемых эндонуклеазами рестрикций типа II, позволяет получить информацию о механизме действия этих ферментов, а также выявить возможность получения пегидролизуемых аналогов их субстратов [1–4]. Рестриктазы *EcoRII* и *SsoII* узнают и расщепляют в ДНК последовательности 5'↓CCA/TGG [5] и 5'↓CCNGG [6] соответственно. В настоящей работе изучено расщепление этими ферментами ДНК-дуплексов (I), содержащих в одном из расщепляемых узлов фосфоамидные связи с различной локализацией атома азота (Ia, Ib), а также субстрата с фосфодиэфирной связью (Ic).



Изучение гидролиза субстратов (I) показало, что фосфоамидные связи как $3'N \rightarrow 5'P$, так и $3'P \rightarrow 5'N$ не расщепляются ферментами *EcoRII* и *SsOII*, но и не препятствуют разрезанию немодифицированной цепи (рис. 1). Отсутствие расщепления связи $3'N \rightarrow 5'P$ ферментом *EcoRII* наблюдалось нами ранее для субстратов с повторяющимися участками узнавания *EcoRII* [2]. Таким образом, независимо от положения фосфоамидной связи в расщепляемом узле блокируется гидролиз субстратов ферментами *EcoRII* и *SsOII*. По-видимому, это является результатом большей занятости d-орбит атома фосфора свободной парой электронов атома азота, чем парой электронов атома кислорода, в результате чего в случае фосфоамидной связи затрудняется нуклеофильная атака по атому фосфора. Кроме того, алкиламиногруппа имеет меньший отрицательный индуктивный эффект, чем алкоксигруппа. В случае эндопууклеазы *EcoRII* наличие фосфоамидных связей в одной из цепей участка узнавания субстратов (Ia, b) приводит к уменьшению скорости гидролиза противоположной цепи (таблица). Влияние связи $3'P \rightarrow 5'N$ на фермент-субстратное взаимо-

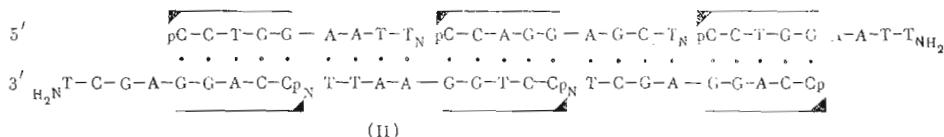
Расщепление ДНК-дуплексов эндонуклеазами рестрикции
*Eco*RII и *Sso*II*

ДНК-дуплекс	<i>Eco</i> RII		<i>Sso</i> II	
	v_0 , нМ/с	$v_0^{\text{от}}$	v_0 , нМ/с	$v_0^{\text{от}}$
Ia	0,422	30	0,193	68
Ib	0,195	14	0,289	102
Ic	1,398	100	0,283	100

* Приведены значения для немодифицированной цепи ДНК-дуплекса. v_0 — начальная скорость, $v_0^{\text{от}}$ — относительная начальная скорость.

действие сильнее, чем связи $3'N \rightarrow 5'P$. Это может быть связано с различием конформации модифицированных фрагментов углеводофосфатного остова (Ia) и (Ib). Эндонуклеаза *Sso*II расщепляет немодифицированную цепь дуплекса (Ib) с той же скоростью, что и в природном субстрате (Ic), а гидролиз (Ia) лишь немного замедлен (таблица). Этот фермент проявляет меньшую чувствительность к структурным изменениям цепи ДНК, чем эндонуклеаза *Eco*RII.

Ионы Mg^{2+} являются единственным кофактором эндонуклеаз рестрикции типа II. Использование пегидролизуемых аналогов субстрата эндонуклеазы *Eco*RII дало возможность изучить процесс образования фермент-субстратного комплекса в присутствии ионов Mg^{2+} . В качестве объекта исследования выбран ДНК-дуплекс (II), содержащий в местах разрезания в обеих цепях негидролизуемые связи $3'N \rightarrow 5'P$:



Равновесная константа ассоциации (K_a) комплекса фермента *Eco*RII с дуплексом II составляет $9,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, а константа скорости диссоциации (k_d) этого комплекса — $4,6 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$. В присутствии 5 мМ $MgCl_2$ K_a уменьшается в 3 раза, а k_d — увеличивается в 1,5 раза (рис. 2а, б). В рамках теории ферментативного катализа такой эффект можно интерпретировать как способствующее катализу сближение энергетических

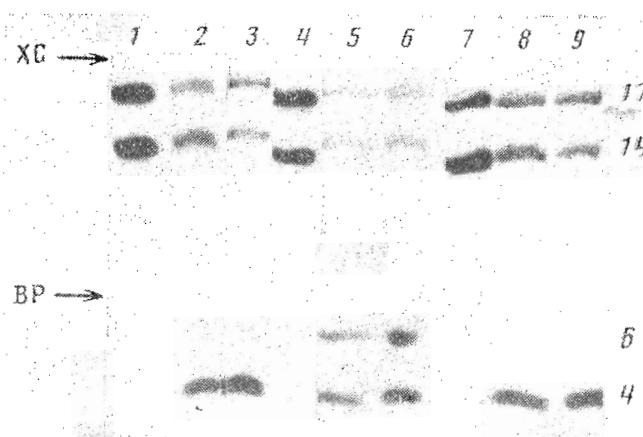


Рис. 1. Радиоавтограмма продуктов гидролиза эндонуклеазой *Eco*RII [^{32}P]ДНК-дуплексов Ia (8), Ib (2), Ic (5) и эндонуклеазой *Sso*II Ia (9), Ib (3), Ic (6) при 37° С в течение 1 ч; 7, 1, 4 — исходные ДНК-дуплексы Ia, Ib и Ic соответственно. Цифры слева обозначают длину исходных олигонуклеотидов и продуктов гидролиза. BP и XG — положение маркеров бромфенолового синего и ксиленцианола.

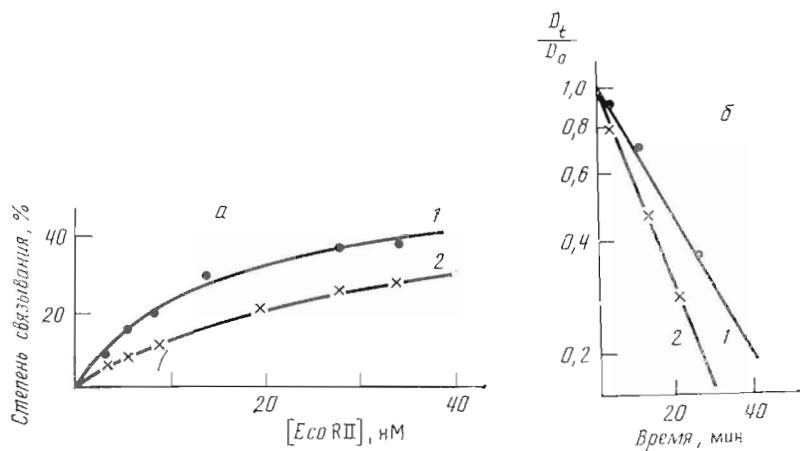


Рис. 2. Кривые связывания [³²P]ДНК-дуплекса (II) с эндонуклеазой EcoRII (а) и кривые диссоциации белково-нуклеинового комплекса (б) в отсутствие (1) и в присутствии (2) 5 mM MgCl₂ при 37° С. Концентрация (II) составляет 5,2 нМ. D₀ — исходное количество комплексов, D_t — количество комплексов в момент времени t

барьеров комплексов фермента с субстратом и фермента с продуктом в присутствии кофактора [7].

ДНК-дуплексы (I) синтезировали как описано в работе [8], (II) — как в работе [2]. [³²P]-концевую метку вводили фосфорилированием олигонуклеотидов [γ -³²P]АТР с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Эндонуклеазы EcoRII и SsoII выделяли по методикам, изложенным в работах [5] и [6]. Гидролиз субстратов эндопукилазой EcoRII (70 ед. акт.) проводили как описано нами в работе [2], эндонуклеазой SsoII (1 ед. акт.) — в 10 мкг буфера 100 mM трис-HCl, pH 7,4, содержащего 10 mM MgCl₂, 1 mM β-меркаптоэтанол, 4% глицерина. Концентрация ДНК-дуплексов в расчете на молекулу составляла 0,39 мкМ. Анализ продуктов гидролиза проводили в 20% полиакриламидном денатурирующем геле. Изучение комплексообразования дуплекса (II) и эндонуклеазы EcoRII и кинетики диссоциации фермент-субстратного комплекса проводили методом связывания на нитроцеллюлозных фильтрах как описано в работе [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Краев А. С., Крауец А. Н., Чернов Б. К., Скрябин К. Г., Баев А. А. Молекуляр. биология, 1985, т. 19, № 1, с. 278–284.
2. Громова Е. С., Елов А. А., Кубарева Е. А., Мегелев В. Г., Шабарова З. А. Молекуляр. биология, 1986, т. 20, № 1, с. 29–40.
3. Vosberg H.-P., Eckstein F. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 11, p. 6595–6599.
4. Пурмаль А. А., Виноградова М. Н., Елов А. А., Громова Е. С., Друга В. Л., Мегелев В. Г., Холодков О. А., Бурянов Я. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1984, т. 276, № 4, с. 992–995.
5. Косых В. Г., Пунтижис С. А., Бурянов Я. И., Баев А. А. Биохимия, 1982, т. 47, № 4, с. 619–625.
6. Никольская И. И., Карпец Л. З., Карташова И. М., Лопатина И. 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.
7. Halford S. E. Trends Biochem. Sci., 1983, v. 8, № 12, p. 455–460.
8. Долинина И. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. П., Шабарова З. А. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 6, с. 755–763.
9. Yolov A. A., Vinogradova M. N., Gromova E. S., Rosenthal A., Cech D., Veiko V. P., Metelov V. G., Kosykh V. G., Buryanov Ya. I., Baev A. A., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1985, v. 13, № 24, p. 8983–8998.

Поступило в редакцию
6.VIII.1986

DNA DUPLEXES WITH PHOSPHOAMIDE BONDS: THE INTERACTION WITH
EcoRII AND *SsoII* RESTRICTION ENDONUCLEASES

GROMOVA E. S., VINOGRADOVA M. N., UPOROVA T. M.*[,], GRYAZNOVA O. I.,
ISAGULYANTS M. G., KOSYKH V. G.**, NIKOLSKAYA I. I.*[,], SHABAROVA Z. A.

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

We studied the interaction of *EcoRII* and *SsoII* restriction endonucleases with synthetic DNA duplexes, containing $3'N\rightarrow5'P$ and $3'P\rightarrow5'N$ phosphoamide internucleotide bonds in one of the cleavage points. Enzymatic hydrolysis of the modified strand of the duplexes is blocked in all cases. The presence of phosphoamide bonds was found to reduce the rate of cleavage of the natural strand by *EcoRII* and to have no influence in case of *SsoII*. Properties of the *EcoRII* endonuclease complex with its substrate, containing non-cleavable $3'N\rightarrow5'P$ internucleotide bonds in each cleavage point, were examined. In the presence of Mg^{2+} ions the equilibrium association constant of the enzyme-substrate complex is 3-fold reduced, and the dissociation rate constant of the complex is increased by 1,5 times.