



УДК 577.152.314'14:547.963.3

ДНК-ДУПЛЕКСЫ С ФОСФОАМИДНОЙ СВЯЗЬЮ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ *Eco*RII И *Sso*II

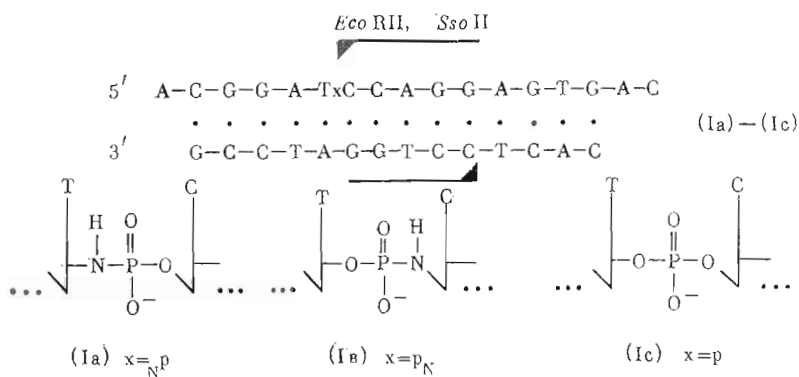
Громова Е.С., Виноградова М.Н., Упорова Т.М.*,
Грязнова О.И., Исагуляну М.Г., Косых В.Г.**,
Никольская И.И.*, Шабарова З.А.

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

Институт медицинской энзимологии АМН СССР*, Москва;

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

Модификация фосфодиэфирных связей, расщепляемых эндонуклеазами рестрикции типа II, позволит получить информацию о механизме действия этих ферментов, а также выявить возможность получения пегидролизуемых аналогов их субстратов [1-4]. Рестриктазы *Eco*RII и *Sso*II узнают и расщепляют в ДНК последовательности 5'↓CCATGG [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→5'P, так и 3'P→5'N не расщепляются ферментами *Eco*RII и *Sso*II, но и не препятствуют разрезанию немодифицированной цепи (рис. 1). Отсутствие расщепления связи 3'N→5'P ферментом *Eco*RII наблюдалось нами ранее для субстратов с повторяющимися участками узнавания *Eco*RII [2]. Таким образом, независимо от положения фосфоамидной связи в расщепляемом узле блокируется гидролиз субстратов ферментами *Eco*RII и *Sso*II. 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 эндонуклеазы *Eco*RII наличие фосфоамидных связей в одной из цепей участка узнавания субстратов (Ia, b) приводит к уменьшению скорости гидролиза противоположной цепи (таблица). Влияние связи 3'P→5'N на фермент-субстратное взаимодей-

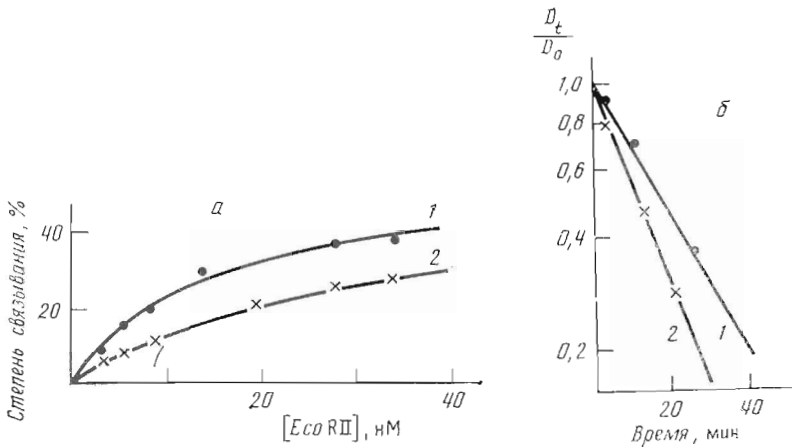


Рис. 2. Кривые связывания [^{32}P]ДНК-дуплекса (II) с эндонуклеазой *EcoRII* (а) и кривые диссоциации белково-нуклеинового комплекса (б) в отсутствие (1) и в присутствии (2) 5 мМ MgCl_2 при 37° С. Концентрация (II) составляет 5,2 нМ. D_0 — исходное количество комплексов, D_t — количество комплексов в 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]. [^{32}P]-концевую метку вводили фосфорилированием олигонуклеотидов [γ - ^{32}P]АТР с помощью Т4-полинуклеотидкиназы. Эндонуклеазы *EcoRII* и *SsoII* выделяли по методикам, изложенным в работах [5] и [6]. Гидролиз субстратов эндонуклеазой *EcoRII* (70 ед. акт.) проводили как описано нами в работе [2], эндонуклеазой *SsoII* (1 ед. акт.) — в 10 мкл буфера 100 мМ трис-НСl, рН 7,4, содержащего 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ 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., Кравец А. Н., Чернов Б. К., Скрыбин К. Г., Баев А. А. Молекуляр. биология, 1985, т. 19, № 1, с. 278–284.
2. Громова Е. С., Елов А. А., Кубарева Е. А., Метелев 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., Друца В. Л., Метелев В. Г., Холодков О. А., Бурьянов Я. И., Шабарова З. А., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1984, т. 276, № 4, с. 992–995.
5. Косых В. Г., Пунтежис С. А., Бурьянов Я. И., Баев А. А. Биохимия, 1982, т. 47, № 4, с. 619–625.
6. Никольская И. И., Карпец Л. З., Карташова И. М., Лопатина П. Г., Скрипкин Е. А., Сучнов 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. Долинная П. Г., Грязнова О. И., Соколова Н. П., Шабарова З. А. Биоорган. химия, 1986, т. 12, № 6, с. 755–763.
9. Yalov A. A., Vinogradova M. N., Gromova E. S., Rosenthal A., Cech D., Veiko V. P., Meteleev 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
*Eco*RII AND *Sso*II 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 *Eco*RII and *Sso*II restriction endonucleases with synthetic DNA duplexes, containing 3'N→5'P and 3'P→5'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 *Eco*RII and to have no influence in case of *Sso*II. Properties of the *Eco*RII endonuclease complex with its substrate, containing non-cleavable 3'N→5'P internucleotide bonds in each cleavage point, were examined. In the presence of Mg²⁺ 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.