



УДК 577.113.4 : 577.152.314'14

© 1990 г.

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

ОСОБЕННОСТИ РАСЩЕПЛЕНИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗАМИ РЕСТРИКЦИИ *MvaI* И *EcoRII* СУБСТРАТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПО АМИНОГРУППАМ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ

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

Сконструированы 14-звенные ДНК-дуплексы, содержащие в одной из цепей участка узнавания эндонуклеаз рестрикции *EcoRII* и *MvaI* (CC^A/TGG) модифицированные нуклеозидные звенья*: 4-N-метилдезоксцитидин (m⁴C), 6-N-метилдеоксиаденозин (m⁶A) или дезоксиинозин (I). Установлено, что эндонуклеазы *EcoRII* и *MvaI* образуют контакты (или сближены) с экспонированными в большую бороздку ДНК экзоциклическими аминогруппами внешних остатков С и центрального остатка А участка узнавания. Показаны принципиальные различия в механизме расщепления субстратов этими эндонуклеазами-изоизомерами. Обнаружена способность эндонуклеазы *MvaI* эффективно гидролизовать только немодифицированную цепь метилированных дуплексов, что открывает новый путь направленного расщепления одной из цепей ДНК. Удаление 2-NH₂-группы, расположенной в малой бороздке ДНК, путем замены G на I не оказывает существенного влияния на гидролитическую активность эндонуклеаз *EcoRII* и *MvaI*.

Изучение влияния направленной модификации нуклеотидных последовательностей, узнаваемых эндонуклеазами рестрикции типа II, на функционирование этих ферментов позволяет выявить группы атомов в гетероциклических основаниях, важные для специфического белково-нуклеинового взаимодействия [1, 2]. В настоящей работе исследовано расщепление эндонуклеазами рестрикции *EcoRII* и *MvaI* синтетических ДНК-дуплексов, содержащих природный или модифицированный участок узнавания этих ферментов (таблица).

В одной из цепей ДНК-дуплексов (II)–(IV) были метилированы экспонированные в большую бороздку двойной спирали экзоциклические аминогруппы 5'-концевых дезоксицитидинов или центрального дезоксиаденозина участка узнавания. В дуплексе (V) дезоксигуанозин, соседний с центральным тимидином участка узнавания, был заменен на дезоксиинозин (I) с удалением таким образом экзоциклической аминогруппы, экспонированной в малую бороздку двойной спирали ДНК. С помощью этих субстратов решались вопросы о роли экзоциклических NH₂-групп отдельных нуклеотидных звеньев в сайт-специфическом узнавании и возможности их контакта с ферментом не только в большой, но и в малой бороздке двойной спирали ДНК. Важно, что модификации подвергали лишь одну из цепей субстрата, что позволило вскрыть ряд необычных свойств фермента *MvaI*.

Синтез 14-звенных субстратов осуществляли в амидофосфитном варианте по методике [3]. 6-N-Метил-2'-деоксиаденозин (m⁶A) получали согласно [4]. Хроматографическое разделение метилированного продукта и исходного дезоксиаденозина проводили в виде 5'-O-монометокситрильных производных. Тритилированные дезоксирибонуклеозиды I и

* Префикс «d» (дезоксн) при обозначении дезоксирибонуклеозидов и олигодезоксирибонуклеотидов опущен.

Расщепление ДНК-дуплексов, содержащих m⁴C, m⁶A и I, эндонуклеазами рестрикции *MvaI* и *EcoRII*

Чертой отмечен участок узнавания, заштрихованными и незаштрихованными треугольниками — места расщепления эндонуклеазами рестрикции *EcoRII* и *MvaI* соответственно

Номер соединения	ДНК-дуплекс	Относительная начальная скорость гидролиза *	
		<i>MvaI</i>	<i>EcoRII</i>
(I)	5' ACCTACCTGGTGGT 3' TGGATGGACCACCA	100 100	100 100
(II)	5' ACCTAm ⁴ CCTGGTGGT 3' TGGAT -GGACCACCA	0 110	0 0
(III)	5' ACCTACCTGG - TGGT 3' TGGATGGACCm ⁴ ACCA	89 0	0 0
(IV)	5' ACCTACC - TGGTGGT 3' TGGATGG m ⁶ ACCACCA	99** 0	1 3
(V)	5' ACCTACCTIGTGCT 3' TGGATGGACCACCA	90** 39	31 30

* Данные верхней и нижней строк соответствуют расщеплению «верхней» и «нижней» цепей субстрата.

** Приведены относительные степени гидролиза за 60 мин.

m⁶A фосфитилировали бис(N,N-диизопропиламино)метилфосфитом для получения стандартных амидофосфитных синтонов. Поскольку 5'-O-защитные производные m⁶A и I нерастворимы в хлористом метиле, фосфитилирование проводили в ацетонитриле (выход 90%).

Первичную структуру синтезированных олигонуклеотидов подтверждали анализом по методу Максама — Гилберта в твердофазном варианте [5]. В случае m⁶A-содержащего олигонуклеотида проводили также его исчерпывающий гидролиз смесью фосфоэстеразы и фосфодиэстеразы змеиного яда до нуклеозидов.

Изучение термической устойчивости ДНК-дуплексов (III) и (IV) показало, что замена остатка C на m⁴C или замена A на m⁶A вызывает понижение температуры плавления модифицированных субстратов на 2—4° C по сравнению с дуплексом (I) (рис. 1). При введении остатка I в участок узнавания (дуплекс V) вместо G·C-пары образуется I·C-пара, что приводит к понижению температуры плавления на 10° C (рис. 1). Полученные результаты согласуются с литературными данными по дестабилизации дуплексов, содержащих аналогичные модификации, но имеющих другой нуклеотидный состав и длину [6—10]. Спектры КД ДНК-дуплексов (III)—(V) напоминают спектр КД дуплекса (I) (рис. 2). Отличия сводятся

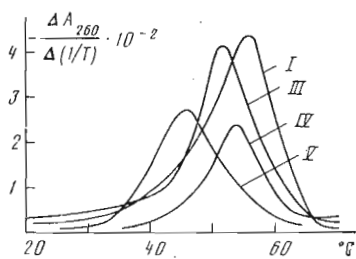


Рис. 1

Рис. 1. Кривые плавления (в дифференциальной форме) ДНК-дуплексов (I), (III)—(V) в 0,04 М трис-НСl, рН 7,6, содержащем 0,05 М NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0,07 М дитиотреитол. Концентрация субстратов в расчете на нуклеотидное звено (C_N) составляет (3,4—3,8)·10⁻⁵ М

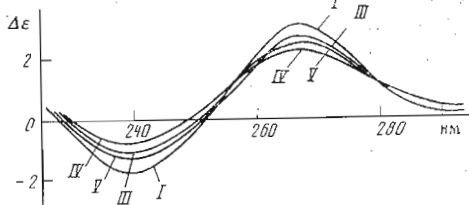


Рис. 2

Рис. 2. Спектры КД ДНК-дуплексов (I), (III)—(V); 0,015 М цитрат натрия, рН 7,25, 0,15 М NaCl; C_N (4—5)·10⁻³ М

в основном к небольшим изменениям амплитуды Коттон-эффектов. При введении остатка I мы не наблюдали изменения числа положительных полос КД в отличие от данных Оно и Уеды [10]. По-видимому, не происходит существенных изменений конформации ДНК, индуцированных указанными выше модификациями. Это согласуется с результатами изучения метилированных олигонуклеотидных дуплексов методами ЯМР [11, 12] и рентгеноструктурного анализа [13]. Вместе с тем удаление 2-NH₂-группы гуанина из малой бороздки ДНК может приводить к искривлению оси двойной спирали [14].

Наличие «внешнего» остатка m⁴C в «верхней» (субстрат II) или «нижней» (субстрат III) цепи участка узнавания приводит к блокированию гидролиза модифицированной цепи ферментом *MvaI*. При этом расщепление противоположной немодифицированной цепи ДНК-дуплексов (II) и (III) протекает так же эффективно, как и в случае дуплекса (I) с каноническим участком узнавания эндонуклеазы *MvaI*. Аналогичным образом ингибируется гидролиз только модифицированной цепи m⁶A-содержащего субстрата (IV). Иная картина наблюдается при взаимодействии с субстратами (II)—(IV) эндонуклеазы *EcoRII*. Метилирование NH₂-группы цитозинового (дуплексы II и III) и аденинового (дуплекс IV) оснований в одной из цепей участка узнавания блокирует расщепление обеих цепей этих дуплексов ферментом *EcoRII*.

Следует добавить, что ДНК, модифицированная метилазой *MvaI* по атому азота N₄ обоих «внутренних» остатков С участка узнавания, не расщепляется как эндонуклеазой *MvaI*, так и эндонуклеазой *EcoRII* [15]. (В отличие от метилазы *MvaI*, фермент модификации *EcoRII* метилирует внутренние остатки С по 5-му положению гетероциклического основания [16]). Из этих данных следует, что, во-первых, оба фермента образуют контакт или сближены с расположенными по центру большой бороздки двойной спирали экзоциклическими NH₂-группами, принадлежащими разным остаткам участка узнавания. Во-вторых, очевидно, что имеются принципиальные различия в механизме действия этих двух рестриктаз-изоизомеров. Влияние любой модификации в одной цепи субстрата на расщепление другой цепи ферментом *EcoRII* наблюдалось и ранее [2, 17]. Можно полагать, что этот фермент взаимодействует с обеими цепями ДНК-дуплекса и расщепляет их за один акт связывания. Отсутствие влияния метилирования одной цепи субстрата на расщепление другой (таблица) подтверждает предложенный для эндонуклеазы *MvaI* двухстадийный механизм гидролиза ДНК [18]. Уникальная способность этого фермента эффективно гидролизовать только немодифицированную цепь субстрата (см. также [19]) открывает новые пути направленного расщепления одной из цепей ДНК.

По косвенным данным, полученным Буткусом и соавт. [15], ДНК, метилированная в одной из цепей по атому N₄ «внутренних» остатков С

участка узнавания, не расщепляется ферментом *MvaI*. Таким образом, один и тот же тип метилирования, но затрагивающий разные основания в участке узнавания, ведет к разным последствиям для фермента *MvaI*. Полученная в данной работе и ранее [2, 15, 17] информация о взаимодействии эндонуклеаз рестрикции *MvaI* и *EcoRII* с субстратами, содержащими метильную группу в 4-м или 5-м положении остатка С или в 6-м положении А, может быть использована для создания новых вариантов специфического фрагментирования ДНК, основанного на совместном действии рестриктаз и метилаз из разных бактериальных штаммов, исследования характера метилирования клеточной ДНК, картирования метилированных ДНК и решения ряда других прикладных и теоретических задач.

Введение остатка I в одну из цепей участка узнавания вызывает небольшое одинаковое замедление расщепления обеих цепей субстрата (дуплекс V, таблица) ферментом *EcoRII*. В случае эндонуклеазы *MvaI* отмечено незначительное замедление скорости гидролиза только немодифицированной цепи этого субстрата. Полученные экспериментальные факты указывают на то, что взаимодействие ферментов *MvaI* и *EcoRII* с экспонированной в малую бороздку двойной спирали 2-NH₂-группой внутреннего остатка G участка узнавания маловероятно. Небольшое изменение функциональной активности изучаемых ферментов при элиминировании этой аминогруппы, возможно, связано с конформационным искажением ДНК, индуцированным данной модификацией, а именно с предполагаемым искривлением оси двойной спирали [14]. Для эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* при анализе кристаллической структуры комплекса с синтетическим ДНК-дуплексом убедительно показано, что все белково-нуклеиновые контакты осуществляются в большой бороздке двойной спирали [20]. Тем не менее константа специфичности, характеризующая взаимодействие этого фермента с субстратом, содержащим остаток I, на порядок меньше по сравнению с немодифицированным дуплексом [1]. Заслуживает внимания факт «перекрестного» влияния замены остатка G на I на расщепление отдельных цепей дуплекса (V) ферментом рестрикции *MvaI* (таблица). Аналогичный эффект наблюдался нами ранее при замене в участке узнавания эндонуклеазы *MvaI* центрального дезокситимидина или внутреннего дезоксицитидина на остаток уридина или 5-метилдезокситидина соответственно [19]. Таким образом, в отличие от фермента *EcoRII*, когда любая модификация в участке узнавания приводила к одинаковому ингибированию расщепления обеих цепей субстрата, в случае эндонуклеазы *MvaI* модификация в одной цепи может сказываться только на расщеплении одной цепи — модифицированной или интактной (таблица, [2, 17, 19]).

Экспериментальная часть

В работе использованы 2'-дезоксинуклеозиды отечественного производства и 2'-деоксиинозин (Calbiochem, США). Эндонуклеазы рестрикции *MvaI* и *EcoRII* — коммерческие препараты производства НПО «Фермент» и Олайнского завода химреактивов. Препарат эндонуклеазы *MvaI* имел активность 20 000 ед./мл, препарат *EcoRII* — 400 ед./мл*.

Синтез 5'-О-монометокситритил-3'-(N,N-диизопропиламидо)метилфосфита 2'-деоксиинозина. Смесь 590 мг (1 ммоль) 5'-О-монометокситритилдеоксиинозина и 85 мг диизопропиламмонийтетразолида высушивали 12 ч в вакууме, растворяли в 5 мл абсолютного ацетонитрила и прибавляли 300 мкл бис(N,N-диизопропиламидо)метилфосфита. Через 1 ч реакционную смесь обрабатывали по стандартной методике [21]. Выход 75%.

5'-О-Монометокситритил-6-N-метил-3'-(N,N-диизопропиламидо)метилфосфит 2'-деоксиаденозина получали как описано выше.

Олигонуклеотиды ACCTACCTGGTGGT, ACCACCAGGTAGGT, ACCACcm⁶AGGTAGGT и ACCTACCTIGTGGT синтезировали амидофос-

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

фитным методом на автомате-синтезаторе «Виктория-4М» на полимерном носителе, полученном согласно методике [22]. Олигонуклеотиды АССТAm⁴ССТGGTGGT и АССAm⁴ССAGGTAGGT любезно предоставлены В. В. Буткусом (ВНИИ прикладной энзимологии, Вильнюс).

Анализ продуктов гидролиза m⁶A-содержащего олигонуклеотида смесью фосфомоноэстеразы и фосфолиэстеразы змеиного яда проводили методом ВЭЖХ на колонке Zorbax C-8 в 0,01 М буферном растворе ацетата аммония (рН 5,5) в градиенте концентрации метанола от 0 до 40%.

Концентрацию нуклеотидного материала определяли спектрофотометрически. Молярные коэффициенты поглощения (ϵ_{260}) олигонуклеотидов принимали равными сумме ϵ_{260} составляющих их мононуклеотидов. ϵ_{260} для 5'-фосфорилированных m⁶A и m⁴C принимали равными 15 400 и 7 300 М⁻¹·см⁻¹ соответственно, для pI — 6 700 М⁻¹·см⁻¹ [23].

Дуплексы (I)–(V) были получены совместным отжигом соответствующих олигонуклеотидов. Температурную зависимость УФ-поглощения ДНК-дуплексов изучали на двулучевом спектрофотометре Cary-219 (Varian, США) при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,5° С/мин. Результаты представлены на рис. 1 в дифференциальной форме. Спектры кругового дихроизма (КД) ДНК-дуплексов снимали на дихрографе Jovan III (Франция) при комнатной температуре.

5'-Фосфорилирование и введение 5'-³²P-метки в олигонуклеотиды осуществляли с помощью T4-полинуклеотидкиназы. 5'-Концевую ³²P-метку вводили поочередно в оба тяжа ДНК-дуплексов (I)–(V). Препараты 5'-фосфорилированных субстратов с известной удельной радиоактивностью получали добавлением к определенному количеству дуплекса соответствующего ³²P-меченого олигонуклеотида, затем проводили отжиг. ³²P-Меченый субстрат (концентрация в расчете на молекулу — 3,5·10⁻⁷ М) инкубировали при 20° С в течение 1–60 мин с 0,4 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции EcoRII или с 1–20 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции MvaI в 10 мкл буферного раствора [19, 24]. Реакции останавливали прогреванием в течение 2–4 мин при 95° С. Состав реакционной смеси анализировали методом электрофореза как описано в работе [24]. Начальные скорости гидролиза (v_0) ДНК-дуплексов (I)–(V) эндонуклеазами рестрикции рассчитывали по методу наименьших квадратов на ЭВМ ДЗ-28 [25] или графически как угловой коэффициент (тангенс угла наклона) начального прямолинейного участка кинетической кривой. Расчет проводили для 4–5 значений времени реакции. Относительные v_0 определяли как отношение начальных скоростей гидролиза отдельных цепей модифицированных ДНК-дуплексов к v_0 соответствующей цепи базового субстрата (I), умноженное на 100.

Авторы выражают благодарность Н. И. Соколовой и А. В. Морозовой за участие в синтезе m⁶A, И. И. Никольской и сотр. за дополнительную очистку эндонуклеазы рестрикции EcoRII, а также В. В. Буткусу и сотр. за предоставленные олигонуклеотиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brennan C. A., Van Cleve M. D., Gumpert R. J. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 16. P. 7270–7278.
2. Yolov 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.
3. Грязнов С. М., Потапов В. К., Метелев В. Г., Елов А. А., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 988–991.
4. Jones J. W., Robins R. K. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 1. P. 193–201.
5. Rosenthal A., Schubert F., Cech D., Oretskaja T. S., Kuznetsova S. A., Shabarova Z. A. // Biomed. biochim. acta. 1985. V. 44. № 10. P. 75–83.
6. Ono A., Ueda T. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 1. P. 219–232.
7. Seela F., Herdering W., Kehne A. // Helv. chim. acta. 1987. V. 70. № 6. P. 1649–1660.
8. Юраййтис А. П., Буткус В. В., Климашаускас С. Й., Янулайтис А. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 158–165.
9. McLaughlin L. W., Benseler F., Graeser E., Piel N., Scholtissek S. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 23. P. 7238–7245.

10. Ono A., Ueda T. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 7. P. 3059—3072.
11. Quignard E., Fazakerley G. V., Téoule R., Guy A., Guschlbauer W. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 152. № 1. P. 99—106.
12. Fazakerley G. V., Kraszewski A., Téoule R., Guschlbauer W. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 5. P. 2191—2201.
13. Frederick C. A., Quigley G. J., Van der Marel G. A., Van Boom J. H., Wang A. H.-J., Rich A. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 33. P. 17872—17879.
14. Diekmann S., McLaughlin L. W. // J. Mol. Biol. 1988. V. 202. № 4. P. 823—834.
15. Butkus V. V., Klimasauskas S. J., Kersulyte D. R., Vaitkevicius D. P., Lebionka A. A., Janulaitis A. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 16. P. 5727—5746.
16. Roberts R. J. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. Suppl. P. r189—r217.
17. Виноградова М. Н., Громова Е. С., Грязнова О. И., Исагулянц М. Г., Кузнецова С. А., Косых В. Г., Шабарова З. А. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1194—1203.
18. Громова Е. С., Кубарева Е. А., Пайн К.-Д., Орецкая Т. С., Шабарова З. А., Цех Д., Прокофьев М. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 6. С. 1493—1497.
19. Kubareva E. A., Pein C.-D., Gromova E. S., Kuznetsova S. A., Tashlitski V. N., Cech D., Shabarova Z. A. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 175. № 3. P. 615—618.
20. McClarin J. A., Frederick C. A., Wang B. C., Greene P., Boyer H. W., Grable J., Rosenberg J. M. // Science. 1986. V. 234. № 4783. P. 1526—1541.
21. Barone A. D., Tang I. Y., Caruthers M. H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 10. P. 4051—4061.
22. Волков Е. М., Романова Е. А., Круг А., Орецкая Т. С., Потапов В. К., Шабарова З. А. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1034—1039.
23. Калинин Ф. Л., Лобов В. П., Жидков В. А. / Справочник по биохимии. // Киев: Наукова думка, 1971. С. 154—269.
24. Кубарева Е. А., Громова Е. С., Орецкая Т. С., Шабарова З. А. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1205—1211.
25. Джонсон К. Численные методы в химии. М.: Мир, 1983. С. 248—257.

Поступила в редакцию
14.IV.1989

E. A. KUBAREVA, E. S. GROMOVA, E. A. ROMANOVA, T. S. ORETSKAYA, Z. A. SHABAROVA
**CLEAVAGE OF SUBSTRATES CONTAINING MODIFIED AMINO GROUPS
 IN HETEROCYCLIC BASES BY *Mva*I AND *Eco*RII RESTRICTION
 ENDONUCLEASES**

Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

14-membered DNA-duplexes containing modified nucleoside residues, viz 4-N-methyldeoxycytidine (m^4dC), 6-N-methyldeoxyadenosine (m^6dA) or deoxyinosine (dI), in only one strand of the recognition site (CC^A/TGG) of *Mva*I and *Eco*RII endonucleases were synthesized. It was shown that *Mva*I and *Eco*RII endonucleases interact with the exocyclic amino groups of the external dC residues and of the central dA residue of the recognition site exposed into the DNA major groove. These endonucleases which are isochizomers were found to possess different mechanisms of substrate cleavage. The ability of *Mva*I endonuclease to hydrolyze only unmodified strand of methylated duplexes allows one to make site-directed single-strand nicks in double-stranded DNA. Elimination of the 2-NH₂-group located in the minor groove of DNA by substituting dI for dG had little, if any, effect on the hydrolytic activity of *Eco*RII and *Mva*I endonucleases.