



УДК 547.963.32.057:577.31*26.4.042

© 1994 Н. Ф. Крынецкая, Я. И. Алексеев,
В. М. Белков, Х. К. Х. Ибрагим, В. Н. Тацлицкий, Т. С. Орецкая,
З. А. Шабарова

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РНКазы Н ИЗ *E. coli*
С МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ГИБРИДНЫМИ ДУПЛЕКСАМИ
I. ДУПЛЕКСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МОДИФИКАЦИИ ПО УГЛЕВОДНОМУ
ОСТАТКУ

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

Ключевые слова: рибонуклеаза Н из *E. coli*, гибридный дуплекс, константа ингибирования.

Изучено влияние введенных в олигодезоксирибонуклеотидный зонд 1-(β-D-2'-дезокситреопентофуранозил)тимина (хТ) или/и 1-(β-D-2'-дезоксит-2'-фторпентофуранозил)урацила (fU) на характер взаимодействия гибридных дуплексов с РНКазой Н из *E. coli*. Для оценки влияния использован кинетический подход и предложена модельная система, состоящая из природных гибридных дуплексов gA_n/dT_m , являющихся субстратами для РНКазы Н из *E. coli*, и модифицированных гибридных дуплексов $gA_n/d(TTZ)_m$, где Z — модифицированный нуклеозид. Непрерывный контроль за ходом реакции гидролиза рибоаденилатов в составе природных и модифицированных дуплексов проводили с использованием метода УФ-спектроскопии. Установлено, что гибридный дуплекс $rgA_{18}/d(TTfU)_6TT$ не взаимодействует с РНКазой Н из *E. coli*, а гибридный дуплекс $rgA_{18}/d(xTTT)_6$ ингибирует ее активность (K_i 0,67 мкМ).

Изучена термическая стабильность модифицированных дуплексов.

В последние годы рибонуклеаза Н (РНКаза Н) стала объектом повышенного интереса исследователей. Это обусловлено участием фермента в жизненно важных процессах функционирования клетки, например в репликации, а также в гидролизе РНК-мишени в присутствии антисенсовых олигонуклеотидов [1]. РНКаза Н — это эндонуклеаза, гидролизующая фосфодиэфирную связь РНК в составе РНК-ДНК-дуплексов с образованием 5'-фосфорилированных фрагментов РНК. (КФ 3.1.26.4) [2].

Сокращения: fU — 1-(β-D-2'-дезоксит-2'-фторпентофуранозил)урацил, хТ — 1-(β-D-2'-дезокситреопентофуранозил)тимин.

Адрес: 119899, ГСП-3, Москва, В-234, Ленинские горы, МГУ им. М. В. Ломоносова, химический факультет, кафедра ХПС.

Состав и термодинамическая устойчивость гибридных дуплексов *

| Гибридный дуплекс | Состав | Т. пл., °С | h, % |
|-------------------|---|------------|------|
| (I) | d(T ₁₆)/rA ₁₁ | 22 | 21 |
| (II) | d(G ₂ T ₂₀)/rA ₁₈ | 39 | 22 |
| (III) | d(TTTU) ₆ TT/rA ₁₈ | 36 | 15 |
| (IV) | d(xTTT) ₆ /rA ₁₈ | 23 | 26 |

* C₀ = 0,3 мкМ, h — гипохромия.

Настоящая работа является продолжением исследований механизма действия РНКазы Н из *E. coli*. Ранее было показано, что структура олигодезоксирибонуклеотидов, входящих в состав гетеродуплекса, оказывает сильное влияние на специфичность действия фермента и эффективность расщепления фосфодиэфирных связей в РНК [3—5]: увеличение числа модифицированных по С2'-атому фуранозного кольца нуклеозидов в олигодезоксирибонуклеотиде приводит к уменьшению числа гидролизуемых связей в РНК. Оставалось, однако, невыясненным, взаимодействует ли фермент с модифицированным участком гибридного дуплекса. Для ответа на этот вопрос мы использовали модельную систему, состоящую из немодифицированных гибридных дуплексов rA_n/dT_m, являющихся субстратами для РНКазы Н из *E. coli* и модифицированных гибридных дуплексов rA_n/d(TTZ)_m (Z — модифицированный нуклеозид). Изучение гидролиза РНК в немодифицированном гибридном дуплексе в присутствии модифицированных дуплексов позволяет оценить влияние модификаций в олигодезоксирибонуклеотиде на связывание с РНКазой Н.

Исследуемые олигодезоксирибонуклеотиды (табл. 1) содержат нуклеозиды, модифицированные по 2'- или 3'-положению сахарного кольца:



Введение фтора в 2'-положение сахарного кольца, а также инверсия ОН-группы в 3'-положении приводит к изменению конформации сахарного остатка [6]. Распределение же модифицированных звеньев (одно модифицированное через два немодифицированных) предполагает изменение формы спирали дуплексов нуклеиновых кислот в целом.

Для оценки влияния введенных модификаций на термодинамическую устойчивость гибридных дуплексов (I) — (IV) (табл. 1) и для определения температурного режима проведения реакции ферментативного гидролиза были получены кривые зависимости оптического поглощения от температуры. Из данных табл. 1 видно, что введение в олиготимидилаты нуклеозидов с инвертированными 3'-ОН-группами сильно дестабилизирует дуплекс. В связи с этим реакцию гидролиза проводили при 10 °С и концентрации олигонуклеотидов около 1 мкМ, полагая, что при этих условиях гибридные дуплексы (I) — (IV) термически стабильны.

Для оценки влияния модификаций, вводимых в гибридные дуплексы, на характер взаимодействия этих дуплексов с ферментом был использован кинетический подход — изучалось влияние присутствия в реакционной среде модифицированных дуплексов на скорость реакции гидролиза немодифицированных субстратов (I) и (II) РНКазой Н из *E. coli*.

Для определения кинетических параметров реакции ферментативного гидролиза были получены кривые зависимости прироста оптического поглощения реакционной смеси, содержащей дуплекс (I) (или (II)) в концентрации 0,4 мкМ *

* Выбранные концентрации субстрата соответствуют области субстратного насыщения [7].

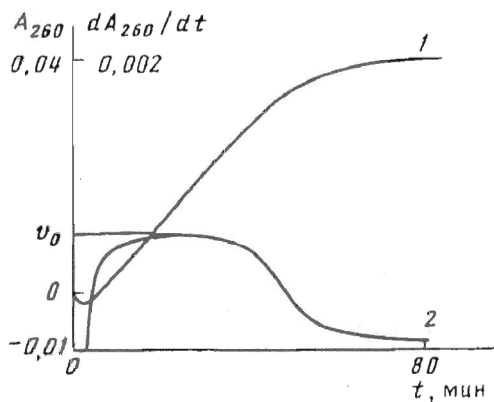


Рис. 1. Интегральная (1) и дифференциальная (2) кривые изменения оптического поглощения при ферментативном гидролизе гибридного дуплекса (II) в присутствии РНКазы Н из *E. coli*. [S] 0,4 мкМ; [E] 2,48 нМ

и РНКазу Н из *E. coli* (35 ед. акт/мкл), от времени при непрерывной УФ-детекции (рис. 1). Дифференцируя кривую 1, мы смогли проследить изменение скорости реакции гидролиза во времени (рис. 1, 2). По горизонтальному участку кривой 2 определяли скорость реакции (v_0). Параллельно проводили анализ реакционной смеси до начала реакции и через 80 мин после добавления фермента (рис. 2) с помощью метода ион-парной ВЭЖХ. Анализ данных ВЭЖХ подтвердил, что увеличение оптического поглощения связано с гидролизом олигоаденилата, приводящего к плавлению гибридного дуплекса в условиях реакции.

В аналогичных условиях было проверено расщепление дуплексов (III) и (IV) (табл. 1). В течение 80—160 мин не происходит изменения оптического поглощения растворов. ВЭЖХ-анализ подтвердил отсутствие коротких фрагментов олигоаденилатов; следовательно, гибридные дуплексы (III) и (IV) не являются субстратами РНКазы Н из *E. coli*.

Чтобы ответить на вопрос, могут ли эти дуплексы связываться с ферментом и ингибировать его активность, мы исследовали гидролиз олигорибоаденилатов в дуплексах (I) и (II) в присутствии дуплексов (III) и (IV) в различных концентрациях. Модифицированные дуплексы добавляли двумя способами: 1) субстрат и модифицированный дуплекс смешивали до добавления фермента (рис. 3а); 2) модифицированный дуплекс добавляли к реакционной смеси после некоторого определенного промежутка времени (рис. 3б).

Оказалось, что добавление дуплекса (III) не меняет начальную скорость реакции — угол наклона кинетической кривой не меняется. Это говорит о том, что такой дуплекс не только не является субстратом для РНКазы Н, но и не связывается с ним.

Добавление же дуплекса (IV) к субстрату приводит к уменьшению угла наклона кинетической кривой, т. е. к уменьшению скорости гидролиза природного гибридного дуплекса. Скорость уменьшается с увеличением избытка модифицированного дуплекса (IV) (см. рис. 3). Это означает, что дуплекс (IV) конкурирует с субстратом (II) за связывание с ферментом и может рассматриваться как конкурентный ингибитор РНКазы Н.

Используя уравнение Михаэлиса — Ментен [8], мы рассчитали кинетические параметры реакции (рис. 4, 5). Вычисленные из экспериментальных данных значения V_{max} , K_m и K_i приведены в табл. 2.

Из анализа этих данных видно, что фермент практически с одинаковой эффективностью связывается с субстратом (II) и ингибитором (IV).

Следует отметить, что синтез олионуклеотида со вставками xT гораздо

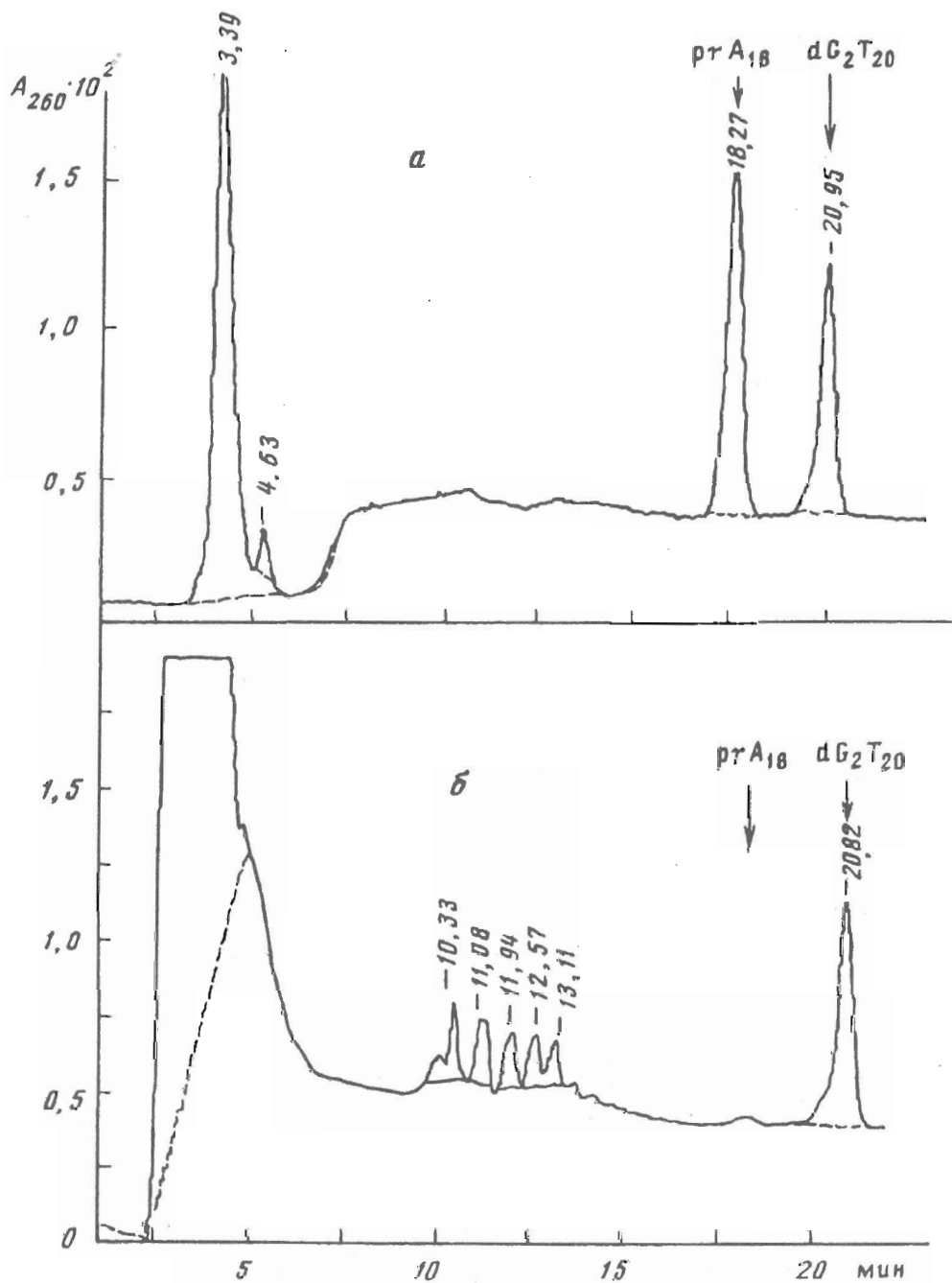


Рис. 2. Ион-парная ВЭЖХ (условия см. «Экспер. часть») гибридного дуплекса II (а) и продуктов его гидролиза РНКазой H после 80 мин инкубации (б)

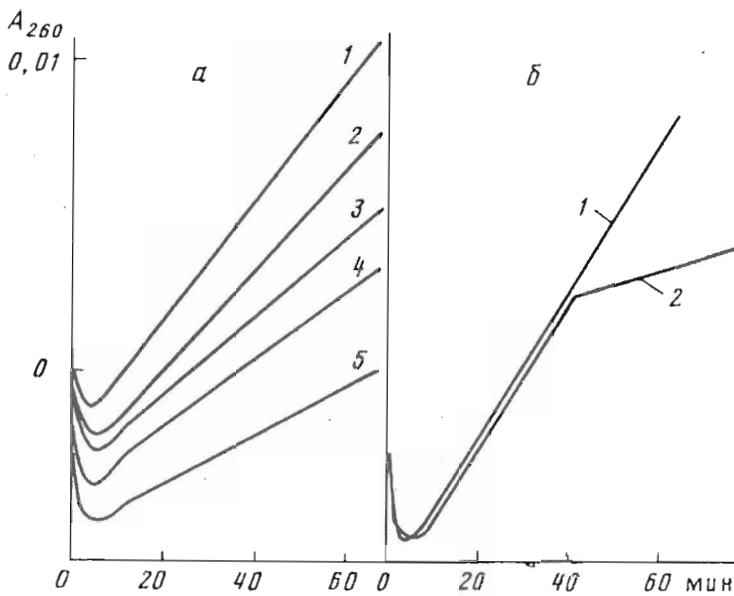


Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза дуплекса (II) РНКазой Н от присутствия модифицированного дуплекса (IV) в среде реакции: а — дуплекс (IV) добавляли до начала реакции при молярном соотношении $[IV]/[II]$: 1 — 0 : 1; 2 — 1 : 1; 3 — 3 : 2; 4 — 2 : 1; 5 — 3 : 1; б — дуплекс (IV) добавляли через 40 мин после начала реакции при соотношении $[IV]/[II]$: 0 (1), 3 (2)

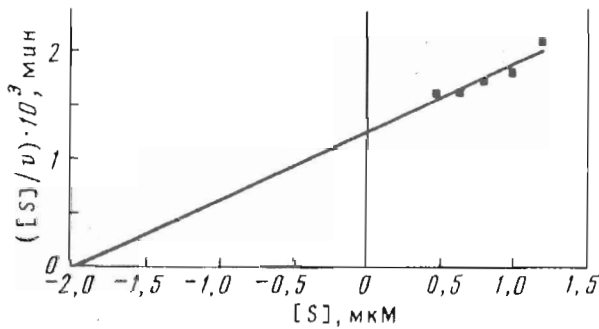


Рис. 4. График зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза дуплекса (I) от его концентрации в координатах Хейнса

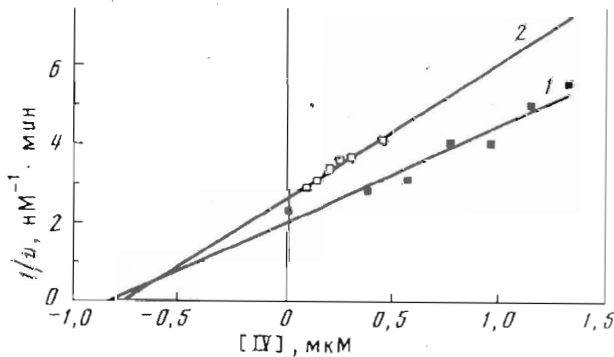


Рис. 5. График зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза дуплекса (II) с начальной концентрацией 0,42 (1) и 0,3 мкМ (2) от концентрации модифицированного дуплекса (IV) в координатах Диксона

Значения константы Михаэлиса и максимальной скорости гидролиза дуплекса (I) и константы ингибирования РНКазы Н дуплексом (IV)

| Гибридный дуплекс | Состав | K_m , мкМ | V_{max}^* , нМ/мин | K_i , мкМ |
|-------------------|--|-------------|----------------------|-------------|
| (I) | dT ₁₆ /rA ₁₁ | 1,92 | 1,6 | — |
| (IV) | d(xTTT) ₆ /rA ₁₈ | — | — | 0,67 |

* Коэффициент пересчета скорости реакции $\beta = 17,1$ мкМ/ОЕ₂₆₀ [7].

проще, чем синтез α -тимидилатов, формирующих с олигоаденилатами ингибиторы РНКазы Н [9].

Спектры КД дуплексов (II) — (IV) (рис. 6) свидетельствуют о конформационных изменениях, индуцируемых указанными выше модификациями в олигодезоксирибонуклеотиде. Введение в один из тяжей гибридного дуплекса (III) fIU привело к значительному отклонению формы двойной спирали от формы, характерной для немодифицированного дуплекса (II): увеличению амплитуды положительной полосы и смещению точки нулевого перехода в сторону коротких волн. Введение xT в олигодезоксирибонуклеотид меньше изменило параметры двойной спирали по сравнению с дуплексом (III). Обнаруженные различия в геометрии двойных спиралей могут служить объяснением различного взаимодействия фермента с дуплексами (II) — (IV). Ранее было показано, что РНК-РНК-дуплексы не связываются с ферментом и не изменяют активности РНКазы Н [10]. Значительное отклонение спектра КД гибридного дуплекса (III) в сторону спектра, характерного для РНК-РНК-дуплекса (рис. 6, 4), объясняет тот факт, что этот дуплекс не связывается с ферментом и не изменяет его активности. Близость форм спиралей

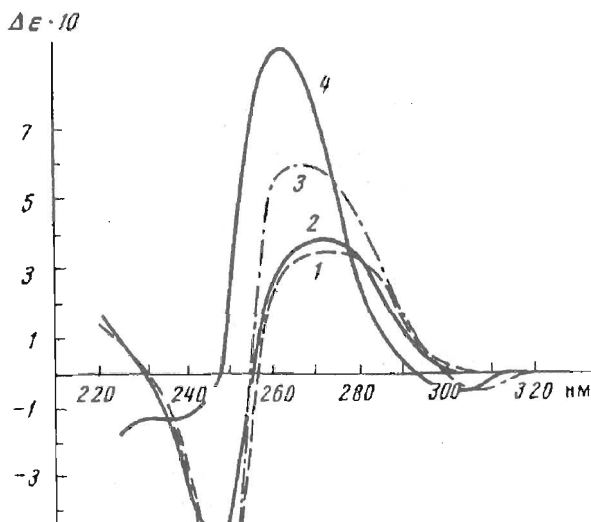


Рис. 6. Спектры КД дуплексов: 1 — (II), 2 — (IV), 3 — (III), 4 — РНК вируса карликовости риса в буфере А

в дуплексах (II) и (IV) позволяет предположить, что фермент связывается с ними, но в дуплексе (IV) из-за введенных модификаций искажается геометрия фосфодиэфирного фрагмента в РНК, которая не попадает в каталитический центр фермента [11]. Поэтому дуплекс (IV) является конкурентным ингибитором и может быть использован для изучения центра связывания рибонуклеазы Н.

Предложенный в работе подход может использоваться для оценки влияния любых модификаций в олигонуклеотидах на эффективность действия РНКазы Н. Такую оценку несомненно следует проводить при конструировании новых антисенсовых олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использовались следующие реактивы: ацетонитрил, неорганические соли (Fluka, Швейцария; Reanal, Венгрия), полирибоадениловая кислота (Serva, Германия).

Олигодезоксирибонуклеотид dG_2T_{20} , а также модифицированные олигодезоксирибонуклеотиды $d(TTfU)_6TT$, $d(xTTT)_6$ были получены на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems (США) амидофосфитным методом с использованием коммерческих реагентов и растворителей. Амидофосфитные компоненты на основе fU и xT были получены по методикам [5, 12].

Для измерения термодинамической стабильности дуплексов, записи спектров КД и проведения ферментативной реакции с РНКазой Н использовали буфер А состава: 0,02 М трис-НСl (рН 7,9), 0,15 М NaCl, 0,011 М $MgCl_2$, 0,5 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA.

В работе использовался раствор РНКазы Н *E. coli* (КФ 3.1.26.4) с M 17,559 кДа, содержащий 4,05 мг/мл (фермент был любезно предоставлен S. Капауа из Института инженерии белка — Осака, Япония).

Оптическое поглощение растворов олигонуклеотидов и температурную зависимость УФ-поглощения гетеродуплексов при непрерывном повышении температуры со скоростью 0,5 °С/мин определяли на спектрофотометре Hitachi 150-20 в термостатируемых кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см.

Спектры кругового дихроизма (КД) были записаны на дихрографе Joun-III (Франция) в буфере А.

Гомогенность олигонуклеотидов, соотношение рибо- и дезоксирибоцепей в гетеродуплексах анализировали методом ион-парной ВЭЖХ на хроматографах Gilson (Франция) и Waters (США) с колонкой 4 × 250 мм (сорбент — Диасорб С16Т, 7 мкм) в 48 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 2 мМ тетрабутиламмонийдигидрофосфат, в логарифмическом градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 40% (скорость элюции 1 мл/мин, 45 °С).

Анализ нуклеозидного состава осуществляли обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе Altex (Beckman, США) в градиенте концентрации (0—12%) ацетонитрила за 40 мин в 0,1 М ацетате аммония, рН 6,5 (скорость элюции 1 мл/мин, 45 °С).

Гель-электрофорез проводили в 20% ПААГ, для визуализации гель прокрашивали этидийбромидом.

Получение олигорибоаденилатов. Необходимые олигорибоаденилаты pA_m ($m = 11$ и 18) получали, добавляя к смеси полирибоадениловой кислоты (1 мг/мл) и dT_{16} (1,4 мМ) 5 мкл РНКазы Н из *E. coli* (3,5 ед. акт./мкл) и проводя реакцию в буфере А (18 ч при 25 °С). Продукты гидролиза осаждали добавлением 0,5 М ацетата натрия и этилового спирта (на 1 мл раствора 5 мл этанола). Смесь оставляли на 15—20 ч при -20 °С, выпавший осадок центрифугировали, растворяли в воде и фракционировали олигонуклеотиды с помощью ВЭЖХ (ион-парный вариант) или гель-электрофореза. Фракции упаривали до объема 1 мл и обессоливали на DEAE-целлюлозе. Полноту удаления с сорбента олигонуклеотидного материала контролировали УФ-спектрофотометрически. Вещество элюировали 1 М перхлоратом лития и осаждали избытком ацетона (на 1 мл раствора 5 мл ацетона). Общие потери составляли не более 15%. Осадок растворяли

в 50 мкл воды и пересаждали этанолом. Раствор оставляли на 15—20 ч при -20°C и затем центрифугировали.

Приготовление растворов гетеродуплексов. Растворы гетеродуплексов dT_n/gA_m готовили смешением эквимольных количеств компонентов. Концентрации олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, исходя из молярных коэффициентов поглощения нуклеотидов: dT , xT — 8800, fIU — 9600, dG — 11800, gA — 15400 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Гидролиз гетеродуплексов рибонуклеазой H проводили в буфере A. Концентрация РНКазы H 2,48—24,8 нМ, концентрация субстрата 30—1500 нМ. Реакционную смесь выдерживали 60 мин при 10°C . За ходом реакции следили по изменению УФ-поглощения, через определенные промежутки времени отбирали пробы и проводили анализ методом ВЭЖХ.

Работа проведена при поддержке фонда «Фундаментальные исследования в химии» программы «Университеты России».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crouch R. J. // New Biol. 1990. V. 2. № 9. P. 771—777.
2. Crouch R. J., Dirksen M. L. // Nucleases/Eds Linn S. M., Roberts R. J. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982. P. 211—241.
3. Meteleev V. G. и др. // FEBS Lett. 1988. V. 226. № 2. P. 232—234.
4. Метелев В. Г., Крынецкая Н. Ф., Пурмаль А. А., Шабарова З. А. // Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 4. С. 507—513.
5. Шмидт С. и др. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 823—830.
6. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.
7. Крынецкая Н. Ф. и др. // Биохимия. 1991. Т. 56. Вып. 4. С. 687—693.
8. Келетти Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990.
9. Bloch E. и др. // Gene. 1988. V. 72. № 9. P. 349—360.
10. Berkower I., Lewis J. P., Hurwitz J. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 17. P. 5914—5921.
11. Yang W. и др. // Science. 1990. V. 249. № 4. P. 1398—1405.
12. Крынецкая Н. Ф. и др. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. № 6. С. 669—675.

Поступила в редакцию 15.XI.1993

После доработки 3.IV.1994

N. F. Krynetskaya, Ya. I. Alekseev, V. M. Belkov, H. C. H. Ibrahim,
V. N. Tashlitsky, T. S. Oretskaya, Z. A. Shabarova

INTERACTION OF RNase H FROM *E. coli* WITH MODIFIED OLIGONUCLEOTIDE HYBRID DUPLEXES. I. DUPLEXES CONTAINING MODIFICATION IN FURANOSE MOIETY

Chemical Department, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The influence of oligodeoxyribonucleotide probes containing 1-(*D*- β -2'-deoxytreo-pentofuranosyl)thymine or 1-(*D*- β -2'-deoxy-2'-fluoro-pentofuranosyl)uracil on the ability of the hybrid duplexes to interact with RNase H from *E. coli* was studied. A kinetic approach was used to measure of the modification effect. The hybrid duplex, $prA_{18}/d(TTfIU)_6TT$, was shown not to interact with RNase H, whereas $prA_{18}/d(xTTT)_6$ inhibited the RNase H activity ($K_i = 0.67 \text{ mkM}$). The thermostability of the modified duplexes was estimated. The present technique may lead to the use of some modified oligonucleotides as antisenses.