



УДК 577.113.4:577.152.314'14

© 1994 З. А. Шабарова, Г. Я. Шефлян,
С. А. Кузнецова, Е. А. Кубарева, О. Н. Сысов,
М. Г. Ивановская, Е. С. Громова

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ *EcoRII* ДНК-ДУПЛЕКСОМ, СОДЕРЖАЩИМ МОНОЗАМЕЩЕННУЮ ПИРОФОСФАТНУЮ МЕЖНУКЛЕОТИДНУЮ СВЯЗЬ

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

Ключевые слова: эндонуклеаза рестрикции, ДНК-дуплекс, аффинная модификация, монозамещенная пирофосфатная межнуклеотидная связь.

Синтезированы ДНК-дуплексы, содержащие в заданном положении углеводофосфатного остова монозамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь вместо природной фосфодиэфирной. Исследована их стабильность в воде и буферных растворах, использующихся для изучения взаимодействия эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* с субстратами. Показана принципиальная возможность ковалентного присоединения нуклеофильных аминокислотных остатков к остаткам олигонуклеотидов, содержащих монозамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь. Осуществлена аффинная модификация эндонуклеазы *EcoRII* ДНК-дуплексом, содержащим монозамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь между остатками цитозина и тимидина в участке узнавания. Подтверждена специфичность ковалентного присоединения остатка олигонуклеотида к *EcoRII*.

Использование аффинных реагентов на основе производных олигонуклеотидов является эффективным средством зондирования структуры и участков связывания в белках, специфичных к нуклеиновым кислотам [1]. Так, для определения каталитического центра в эндонуклеазах рестрикции *EcoRI* и *EcoRV* в экспериментах по ковалентному присоединению в качестве фоточувствительных аналогов субстратов использовали короткие ДНК-дуплексы с остатком br^5U вместо Т [2]. Однако подходы к аффинной модификации большого класса ферментов рестрикции типа II, узнающих определенные последовательности ДНК, пока еще недостаточно разработаны.

В нашей лаборатории впервые получены ДНК-дуплексы, содержащие в заданном положении углеводофосфатного остова вместо фосфодиэфирной связи монозамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь [3]. Показано, что в одноцепочечных олигонуклеотидах эта связь легко и количественно расщепляется

Используемые сокращения: MeIm — N-метилимидазол, EDA — этилендиамин, SDS — додецил-сульфат натрия; префикс «d» (дезокс) всюду опущен.

устойчивости и свойств монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи в составе ДНК. Дуплекс (II) использовали также в контрольных экспериментах при изучении специфичности взаимодействия *EcoRII* с модифицированным субстратом (I). ДНК-дуплексы (I)—(III) получали конденсацией на комплементарной матрице двух олигонуклеотидов, один из которых содержал на 3'-концевой фосфатной группе остатки алифатического спирта или амина, а 5'-концевая фосфатная группа другого была активирована водорастворимым карбодимидом [3]. Выход дуплексов (I)—(III) составил соответственно 60, 71 и 77%.

Было показано, что ДНК-дуплексы (I)—(III) устойчивы в воде при 37° С по крайней мере в течение 72 ч. При выдерживании этих же соединений в водных буферных растворах А, Б и В (см. «Экспер. часть») при комнатной температуре в течение 48 ч расщепления монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи также не наблюдалось. Важно отметить, что буфер В аналогичен буферу, который используется для разрезания ДНК-субстратов *EcoRII*, но не содержит Mg^{2+} . Таким образом, компоненты этого буферного раствора не оказывают влияния на устойчивость монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи в модифицированных ДНК-дуплексах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что олигонуклеотиды с монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью в составе дуплекса стабильнее по отношению к воде и компонентам исследуемых буферов, чем одноцепочечные олигонуклеотиды с аналогичной модификацией [3].

Скорость расщепления монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи под действием нуклеофилов изучали на примере модифицированных олигонуклеотидов $TGGCCp(OC_2H_5)_pGTCGTTTT$ (IV) и $TGGCCp(NHC_4H_9)_pGTCGTTTT$ (V), в которых связь между фосфатной группой и ненуклеотидным заместителем имеет соответственно фосфодизфирную и фосфоамидную природу. В качестве нуклеофильных агентов использовали этилендиамин и $MeIm$ как наиболее хорошо изученные в аналогичных реакциях реагенты [3]. На рис. 1а представлены кривые накопления продуктов расщепления модифицированных олигонуклеотидов (IV) и (V) под действием этилендиамина (буфер Г) и $MeIm$ (буфер Д). Для сравнения на том же рисунке приведены кривые накопления продуктов расщепления олигонуклеотида $ACCTACCp(OC_2H_5)_pTGGTGGT$ (VI), входящего в состав дуплекса (I), теми же реагентами. Как видно из рисунка, во всех случаях скорости реакций расщепления монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи выше, когда ненуклеотидный заместитель представлен остатком этанола, т. е. связь между фосфатной группой и заместителем имеет фосфодизфирную природу. Поэтому в качестве аффинных реагентов целесообразнее использовать модифицированные ДНК-дуплексы именно этого типа, что позволит повысить выход продукта ковалентного присоединения к белкам. С учетом этих данных для аффинной модификации *EcoRII* использовали ДНК-дуплекс (I).

Для изучения взаимодействия ДНК-дуплексов, содержащих монозамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь, с нуклеофильными группами основных аминокислот в качестве примера использовали защищенные по N- и C-концам аргинин и глутаминовую кислоту: водные растворы хлоридрата амида N^{α} -бензоиларгинина (буфер Е) и *трет*-бутилового эфира N^{α} -*трет*-бутилкарбонилглутаминовой кислоты (буфер Ж). Эти аминокислоты, как известно, вовлечены в образование специфических контактов между эндонуклеазой *EcoRI* и ДНК-субстратом [5]. На рис. 1б представлены кривые накопления продуктов расщепления модифицированной связи в олигонуклеотидах (IV) и (VI). Как следует из этих данных, монозамещенная пирофосфатная межнуклеотидная связь расщепляется под действием нуклеофильных групп обеих аминокислот, хотя и со значительно меньшей скоростью, чем под действием этилендиамина и $MeIm$. Этот факт подтверждает сделанное ранее предположение [3] о возможности использования ДНК-дуплексов с монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью для аффинной модификации ДНК-связывающих белков.

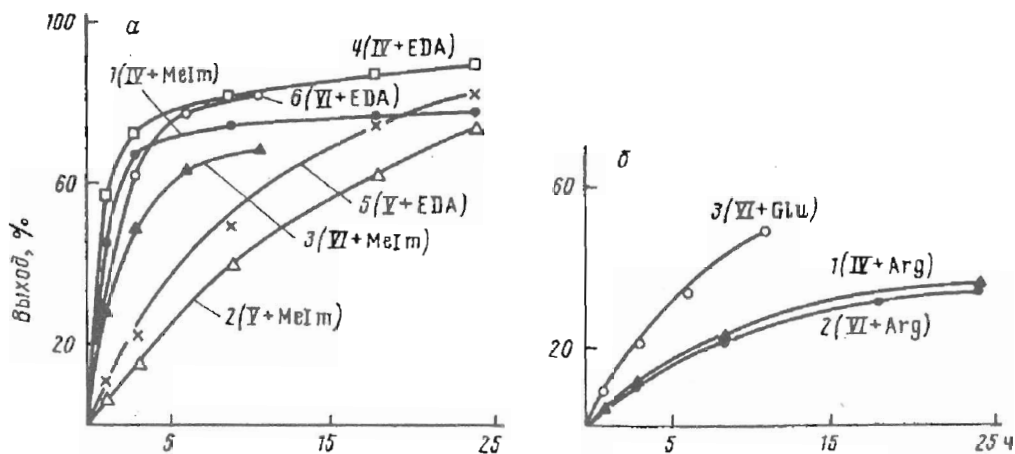


Рис. 1. Накопление продуктов расщепления монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связи в олигонуклеотидах (IV)—(VI) при 37° С: а) под действием MeIm (буфер Д) [(IV)—(VI) — кривые 1—3 соответственно] и EDA (буфер Г) [(IV)—(VI) — кривые 4—6 соответственно]; б) под действием производных аргинина (буфер Е) [(IV) — кривая 1, (VI) — 2] и глутаминовой кислоты (буфер Ж) [(VI) — 3]

Для аффинной модификации эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* использовали ^{32}P -меченый ДНК-дуплекс (I), причем метка находилась в дизамещенной фосфатной группе пирофосфатной группировки. Эта группа участвует в образовании ковалентной связи с нуклеофильными агентами (см. схему). ^{32}P -Меченый ДНК-дуплекс (I) и фермент *EcoRII* инкубировали 18 ч в буферах В и З при 37° С. Буфер З отличается от буфера В тем, что в его состав вместо 0,04 М трис(гидроксиметил)аминометана (трис) входит 0,04 М MeIm. Этот реагент, как известно, может катализировать реакции нуклеофильного замещения, протекающие с участием олигонуклеотидов в водной среде [6, 7]. Полагают, что процесс связан с образованием промежуточного высокорекреационноспособного фосфо-N-метилимидазолида олигонуклеотида, фосфатная группа которого участвует в нуклеофильном замещении. Более того, было показано, что эффективность аффинной модификации эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *RsrI* в присутствии MeIm увеличивается [4].

Продукты реакции анализировали методом электрофореза по Лэммли с предварительной обработкой реакционной смеси SDS при 95° С, что исключает образование нековалентных комплексов. Образование белково-нуклеинового конъюгата доказывали прокрашиванием геля кумасси G-250 с последующей автордиографией. Результаты аффинной модификации *EcoRII* в буферах В и З (рис. 2) свидетельствуют о том, что в обоих буферах происходит ковалентное присоединение *EcoRII* к ^{32}P -меченому олигонуклеотидному остатку ДНК-дуплекса (I). Однако в буфере В выход продукта ковалентного присоединения составляет около 1%, в то время как в буфере З — 15%. Такое резкое увеличение выхода ковалентно связанного продукта в MeIm-буфере подтверждает наличие катализа метилимидазолом при взаимодействии *EcoRII* с ДНК-субстратом (I). Следует отметить, что выход ковалентного аддукта *EcoRII* с субстратом (I) значительно превышает выходы аддуктов эндонуклеаз *EcoRI* и *RsrI* с аналогичными субстратами [4].

Нами была подтверждена специфичность ковалентного присоединения *EcoRII* к ДНК-субстрату, содержащему монозамещенную пирофосфатную межнуклеотидную связь. Для этого в качестве контроля в экспериментах по пришивке мы использовали ДНК-дуплекс (II), содержащий аналогичную модификацию, но не имеющий участка узнавания *EcoRII*. Из рис. 2 видно, что в данном случае не происходит ковалентного присоединения к *EcoRII*. Кроме того, субстрат (I)

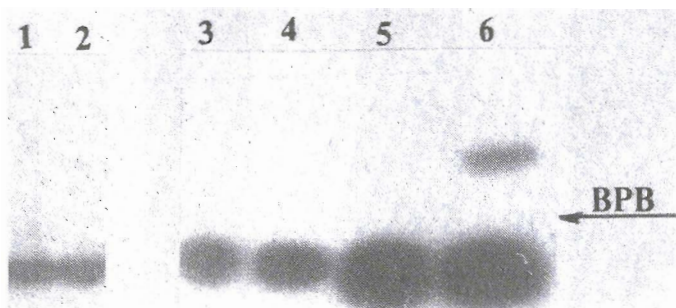
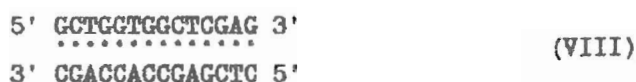


Рис. 2. Анализ продуктов ковалентного присоединения *Eco*RII к дуплексам (I) и (II) методом электрофореза по Лэмбли в 8% ПААГ. 1 и 5 — исходный дуплекс (I) в буферах В и З соответственно, 3 — исходный дуплекс (II) в буфере З. Реакционные смеси после обработки *Eco*RII дуплексов: (I) в буфере В (2), (II) в буфере З (4) и (I) в буфере З (6) (условия см. «Эксп. часть»). BPB — положение красителя бромфенолового синего

инкубировали с *Eco*RII в присутствии возрастающих количеств немодифицированных ДНК-дуплексов, содержащих (VII) или не содержащих (VIII) участок узнавания *Eco*RII (выделен рамкой):



Уже 5-кратный избыток конкурентного субстрата (VII) полностью ингибирует ковалентное присоединение дуплекса (I) к *Eco*RII. В присутствии дуплекса (VIII) не наблюдается тенденции к снижению выхода ковалентного продукта (рис. 3). Полученные данные подтверждают высокую специфичность ковалентного присоединения дуплекса (I) к *Eco*RII. Таким образом, было показано, что аналог субстрата с монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью в участке узнавания ковалентно и специфично присоединяется к *Eco*RII.

Полученные в настоящей работе данные в совокупности с экспериментами по ковалентному присоединению ферментов рестрикции-модификации *Eco*RI и *Rsr*I [4] свидетельствуют о том, что ДНК-дуплексы с монозамещенной пирофосфатной межнуклеотидной связью могут применяться для аффинной модификации ДНК-специфичных белков.

Экспериментальная часть

Получение модифицированных ДНК-дуплексов. Олигодезоксирибонуклеотиды TGGCCp, pGTTCGTTTT, GTA AACGACGGCCAGT, ACCTACCp(OC₂H₅), TGGTGGT, ACCACCAGGTAGGT были любезно предоставлены Т. С. Орцкой и Е. М. Волковым. Олигодезоксирибонуклеотиды TGGCCp(OC₂H₅) и TGGCCp(NHC₄H₉) были синтезированы как описано в работе [3]. Модифицированную цепь ДНК-дуплекса (I) получали химическим лигированием олигонуклеотида ACCTACCp(OC₂H₅) и олигонуклеотида pTGGTGGT, несущего 5'-концевую ³²P-метку, на матрице ACCACCAGGTAGGT с помощью водорастворимого карбодиимида в 0,05 М 2-морфолиноэтансульфонатном (MES) буфере, pH 6,0, содержащем 0,02 М MgCl₂ (А) как описано ранее [3]. 5'-Фосфорилирование и 5'-мечение олигонуклеотида TGGTGGT (0,036 ОЕ₂₆₀) проводили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и [γ-³²P]АТФ, а затем повторно с 1 мМ гАТФ. Продукт

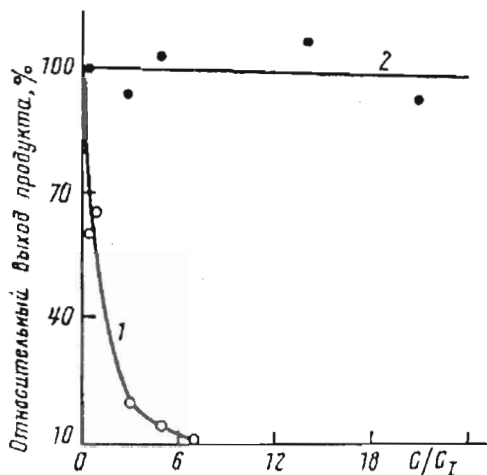


Рис. 3. Зависимость относительного выхода продукта ковалентного присоединения *EcoRII* к дуплексу (I) от соотношения молярных концентраций (C/C_1) дуплексов (VII) (1) или (VIII) (2) и дуплекса (I). Концентрация дуплекса (I) (C_1) $1,8 \cdot 10^{-7}$ М. Концентрация *EcoRII* в расчете на димер $8,5 \cdot 10^{-7}$ М. Выход продукта ковалентного присоединения *EcoRII* к дуплексу (I) в отсутствие дуплексов (VII) и (VIII) принят за 100%

конденсации АССТАССр(ОС₂H₅)-^{*}p-TGGTGGT (VI) с ³²P-меткой (^{*}) в середине цепи выделяли электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, при 700 В. Электродный буфер — 0,05 М трис-борат (рН 8,3), 0,001 М EDTA (Б). Препарат извлекали из геля 2 М водным раствором LiClO₄ при 0° С в течение 16 ч, затем осаждали ацетоном. После выделения модифицированный олигонуклеотид смешивали с эквимольным количеством комплементарной цепи, получая дуплекс (I). Аналогично синтезировали олигонуклеотиды (IV), (V) и дуплексы (II) и (III).

Исследование гидролитической устойчивости соединений (I)–(VI). Модифицированные ДНК-дуплексы (I)–(III) и олигонуклеотиды (IV)–(VI), содержащие ³²P-метку, выдерживали в следующих водных буферных растворах: (А), (Б); 0,04 М трис-НСl (рН 7,6), 0,05 М NaCl, 7 мМ дитиотреит (В); 0,5 М EDA·НСl, рН 8,0 (Г); 0,4 М MeIm (рН 8,0), 0,2 М NaCl, 0,12 М MgCl₂ (Д); 0,1 М хлоргидрат амида N^α-бензоиларгинина*, рН 8,5 (Е); 0,1 М трет-бутиловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонилглутаминовой кислоты, рН 7,8 (Ж); 0,04 М MeIm·НСl (рН 7,6), 0,05 М NaCl, 7 мМ дитиотреит (З) при 37° С. Время инкубации варьировали от 1 до 72 ч. Концентрация соединений (I)–(III) в расчете на дуплекс и олигонуклеотидов (IV)–(VI) в расчете на цепь составляла ($C_1 - C_{VI}$) $1,8 \cdot 10^{-7}$ М. Реакционные смеси анализировали электрофорезом в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Степень расщепления соединений (I)–(VI) определяли как отношение радиоактивности меченого продукта гидролиза к суммарной радиоактивности продукта и исходного соединения. Строили кинетические кривые реакции гидролиза.

Ковалентное присоединение EcoRII к субстрату. В работе использовали эндонуклеазу рестрикции *EcoRII* производства НПО «Биолар» (Латвия). Препарат фермента имел активность 4500 ед.** /мл и концентрацию 37,5 мкг/мл. Пришивку *EcoRII* (90 ед. акт., 750 нг) к ³²P-меченому соединению (I) (100 000 имп/мин, $C_1 - 1,8 \cdot 10^{-7}$ М) проводили при 37° С в 20 мл буфера В или З в течение 18 ч. За ходом реакции следили методом электрофореза по Лэммли в 8%-ном ПААГ

* Использовали производные аминокислот L-ряда.

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

в присутствии 0,1% SDS [8]. Перед нанесением на гель в пробы добавляли денатурирующий раствор, содержащий 0,1% SDS, меркаптоэтанол и маркерный краситель бромфеноловый синий, образцы выдерживали 5 мин при 95° С для разрушения нековалентных комплексов. Гель прокрашивали кумасси G-250, затем проводили автордиографию. В опытах по конкурентному ингибированию ковалентного присоединения в реакционную смесь, содержащую субстрат (I) и *EcoRII*, добавляли возрастающие количества немеченых ДНК-дуплексов (VII) и (VIII) до достижения соотношения молярных концентраций немодифицированного дуплекса и активированного аналога 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 15.

Авторы благодарят Н. В. Сумбатян за любезно предоставленные препараты N- и C-защитенных аминокислот, Е. М. Волкова и Т. С. Орецкую за синтез олигонуклеотидов, А. С. Карягину и А. Ф. Киселева за консультации по проведению анализов методом электрофореза по Лэммли, М. Г. Бревнова за техническую помощь в процессе исследований.

Данная работа частично финансировалась из средств государственных научно-технических программ «Университеты России» и «Новейшие методы биоинженерии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Welsh J., Cantor C. R.//Trends. Biochem. Sci. 1984. V. 9. № 12. P. 505—508.
2. Wolfes H., Flietz A., Winkler F., Pingoud A.//Eur. J. Biochem. 1986. V. 159. № 2. P. 267—273.
3. Кузнецова С. А., Ивановская М. Г., Шабарова З. А.//Биоорганическая химия. 1990. Т. 16. № 2. С. 219—225.
4. Purmal A. A., Shabarova Z. A., Gumpert R. I.//Nucl. Acids Res. 1992. V. 20. № 14. P. 3713—3719.
5. 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.
6. Shabarova Z. A., Ivanovskaya M. G., Isagulians M. G.//FEBS Lett. 1983. V. 154. № 2. P. 288—292.
7. Ивановская М. Г., Готтх М. Б., Шабарова З. А., Прокофьев М. А.//Докл. АН СССР. 1987. Т. 293. № 2. С. 477—481.
8. Остерман Л. А.//Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. С. 70—73.

Поступила в редакцию
16.VI.1993

После доработки
11.XI.1993

Z. A. Shabarova, G. Ya. Sheflyan, S. A. Kuznetsova,
E. A. Kubareva, O. N. Sysoev, M. G. Ivanovskaya, E. S. Gromova

AFFINITY MODIFICATION OF RESTRICTION ENDONUCLEASE *EcoRII* BY DNA DUPLEX CONTAINING A MONOSUBSTITUTED PYROPHOSPHATE INTERNUCLEOTIDE BOND

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

Oligonucleotide duplex with an active monosubstituted pyrophosphate bond within the recognition site of the *EcoRII* restriction endonuclease was cross-linked to this enzyme with a yield of 10—15%. The cross-linking specificity was proved by the absence of the cross-linking to a DNA duplex with the same modification but without the *EcoRII* recognition site as well as by unmodified *EcoRII* substrate's inhibition of the cross-linking.