



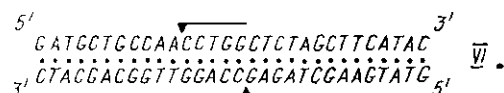
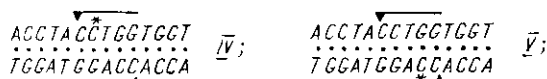
# Структура и функция биополимеров

УДК 577.113.6.088.5

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ И МОДИФИКАЦИИ *EcoRII* С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ ДНК. СИНТЕЗ СУБСТРАТОВ С ОДНИМ УЧАСТКОМ УЗНАВАНИЯ**

**С. А. Кузнецова, Е. А. Кубарева, Т. С. Орецкая, Н. Г. Долшина,  
Н. Ф. Крынецкая, Е. С. Громова, Э. А. Шабарова, Д. Цех**

**Введение.** Изучение механизма действия ферментов рестрикции и модификации II типа представляет значительный интерес как для решения проблемы белково-нуклеинового узнавания, так и в связи с поиском более эффективных путей использования этих ферментов в генной инженерии. В продолжение исследований эндонуклеазы рестрикции *EcoRII*, проводимых в нашей лаборатории [1—3], возникла необходимость расчета термодинамических и кинетических параметров, характеризующих взаимодействие эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* с узнаваемой последовательностью, определения природы и числа специфических и неспецифических контактов белка и ДНК, а также выяснения структурных особенностей белково-нуклеинового комплекса. Представляется также важным провести сравнительное изучение фермента *EcoRII* и его изошизомеров. Для решения этих задач в настоящее время осуществлен синтез 14-звенных олигонуклеотидных дуплексов I—V и более протяженного ДНК-дуплекса VI, содержащих один природный или модифицированный участок узнавания *EcoRII* (обозначен чертой):



\*U=5-фтордезоксисуридин (<sup>5</sup>U); С<sup>\*</sup>=5-метилдезоксцитидин (<sup>m</sup>5C). ДНК-дуплекс II содержит в центре участка узнавания 5-фтор-2'-дезоксисуридин. Это делает возможным применение метода ЯМР на ядрах <sup>19</sup>F для изучения структуры белково-нуклеинового комплекса. В олигонуклеотидных дуплексах III—V метилированы соседние с центральной

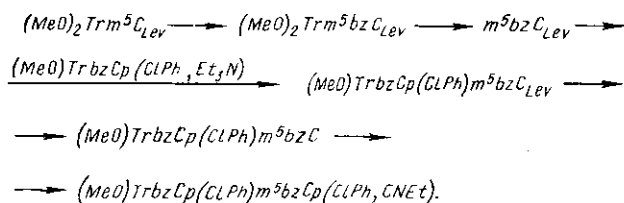
\* Здесь и далее префикс d (дезокс) опущен, направление связи во всех дуплексах, как в дуплексе I.



Синтез GATGCTGCCAACCTGGCTCTAGCTTCATAC (p) и GTATGAAGCTAG-AGCCAGGTTGGCAGCATC (c). 5'-фосфорилирование олигонуклеотидов проводили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы в присутствии АТР или [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТР [1]. Ферментативное лигирование олигонуклеотидов GATGCTGCC, pAACCTGGCTCT и pAGCTTCATAC, один из которых содержал 5'-концевую метку  $^{32}$ P, осуществляли на матрице из двух олигонуклеотидов AGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCTAGAGCC с помощью Т4-ДНК-лигазы в течение 16—18 ч (5—8 °С) в 0,05 М трис-НСl-буфере, рН 7,6, содержащем 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,005 М 2-меркаптоэтанол, 0,001 М спермидин и 1 мМ АТР. Аналогично проводили лигирование  $^{32}$ P-меченного олигонуклеотида pAGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCTAGAGCC на матрице из GATGCTGCC, AACCTGGCTCT и AGCTTCATAC. Выходы «верхнего» и «нижнего» тяжей 30-звенного дуплекса VI составили 85—95 %. Анализ продуктов ферментативного сшивания олигонуклеотидов Т4-ДНК-лигазой проводили электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 7 М мочевины.  $^{32}$ P-меченные 30-звенные олигонуклеотиды выделяли элюцией с геля.

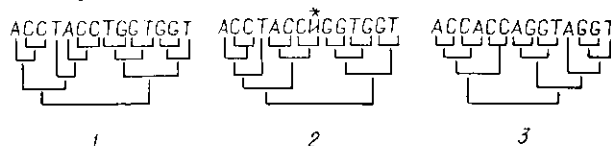
Синтез GATGCTGCCAACCGGCTCTAGCTTCATAC (r) и GTATGAAGCTAGAG-CCGGTTGGCAGCATC (y). Соединения (r) и (y) получали аналогично (p) и (c) ферментативным лигированием олигонуклеотидов (l) и (m) на матрице (n) и олигонуклеотидов (k) и (p) на матрице (o) соответственно

**Результаты и обсуждение.** Для получения ДНК-дуплексов I—V, содержащих природный или модифицированный участок узнавания эндонуклеазы *EcoRII*, осуществлен синтез пяти 14-звенных олигонуклеотидов (a—d), в том числе содержащих 5-фтордезоксисуридин и 5-метилдезокситидин, триэфирным растворным методом. Преимуществом этого метода в данном случае является возможность введения модифицированных звеньев в олигонуклеотиды в процессе синтеза. При синтезе олигонуклеотидов с модифицированными звеньями первым этапом было преобразование 5-фтор-дезоксисуридина и 5'-О-диметокситритил-3'-левулинил-5-метилдезокситидина\* в стандартные компоненты триэфирного синтеза. Для фторпроизводного это был 5'-О-монометокситритил-5-фтор-дезоксисуридин-3'-(*n*-хлорфенил- $\beta$ -цианэтил) фосфат, полученный по методике [7]. (MeO)<sub>2</sub>Tm<sup>5</sup>C<sub>Lev</sub> претерпевал превращения по следующей схеме:



Конденсацию нуклеотидной и нуклеозидной компонент проводили, используя их в соотношениях от 1,25 : 1 до 1 : 1,5, что не влияло на выход нужного продукта. Выходы на стадиях конденсации составили 80—90 %. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными [5, 7].

Схема синтеза отдельных олигонуклеотидов, входящих в состав дуплексов I—VI, определялась наличием повторяющихся блоков и модифицированных нуклеозидов:

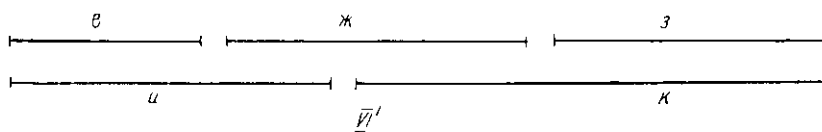


Таким образом были получены олигонуклеотиды (a—k) в количествах 50—170 ед. А<sub>260</sub>. Чистота препаратов составляла 95—98 %.

Нуклеотидную последовательность 14-звенных олигонуклеотидов (a—d) подтверждали методом Максама—Гилберта в твердофазном варианте [10], а остальных (e—k) — тем же методом в растворе [11].

\* Соединение (MeO)<sub>2</sub>Tm<sup>5</sup>C<sub>Lev</sub> синтезировано Л. Л. Сухановой по методике [6].

Дуплекс VI получен ферментативным лигированием пяти олигонуклеотидов, собирающихся в растворе за счет комплементарных взаимодействий в дуплекс VI' с тремя одноцепочечными разрывами:



Разбивку дуплекса VI на составляющие олигонуклеотиды проводили таким образом, чтобы короткие перекрывающиеся блоки были обогащены Г-С-парами. Это должно повысить общую термическую устойчи-

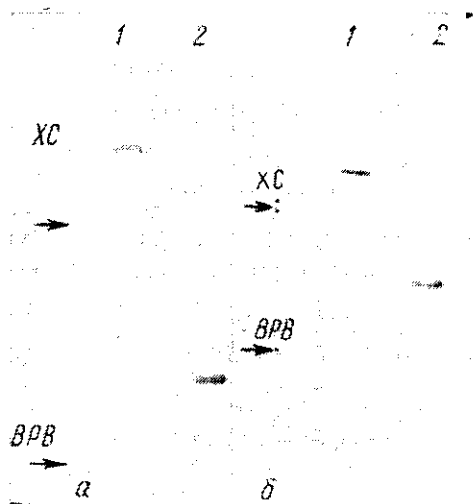
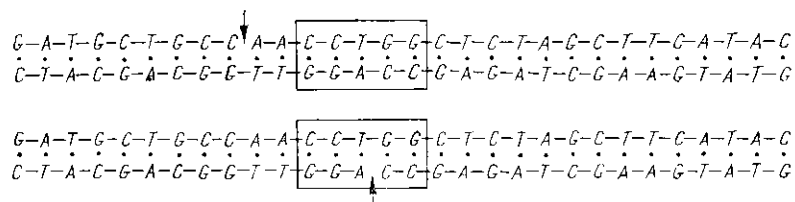


Рис. 1. Электрофорез в 20 %-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины, продуктов ферментативного лигирования олигонуклеотидов:  $\alpha$  — GATGCTGCC,  $\beta$  — AACCTGGCTCT и  $\gamma$  — AGCTTCATAC на матрице AGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCTAGAGCC (1 — реакционная смесь после 16 ч инкубирования, 2 — исходный препарат  $\beta$  — AACCTGGCTCT);  $\delta$  —  $\beta$  — AGGTTGGCAGCATC и GTATGAAGCTAGAGCC на матрице GATGCTGCC, AACCTGGCTCT и AGCTTCATAC (1 — реакционная смесь после 16 ч инкубирования, 2 — исходный препарат  $\beta$  — AGGTTGGCAGCATC). Звездочкой отмечен фосфатный остаток, несущий  $^{32}$ P-метку. Стрелкой указано положение краевых маркеров: XC — ксантинол, BPB — бромфеноловый синий

Fig. 1. Separation of the enzymic ligation products in the 20% polyacrylamide gel containing 7 M urea:  $\alpha$  — GATGCTGCC,  $\beta$  — AACCTGGCTCT and  $\gamma$  — AGCTTCATAC on the matrix formed by AGGTTGGCAGCATC and GTATGAAGCTAGAGCC (1 — reaction mixture 16 h after incubation, 2 — initial  $\beta$  — AACCTGGCTCT);  $\delta$  —  $\beta$  — AGGTTGGCAGCATC and GTATGAAGCTAGAGCC on the matrix formed by GATGCTGCC, AACCTGGCTCT and AGCTTCATAC (1 — reaction mixture 16 h after incubation, 2 — initial  $\beta$  — AGGTTGGCAGCATC). \*P-labelled phosphate group is indicated with asterisk. Xylencianol (XC) and bromphenol blue (BPB) markers are indicated with arrows

вость ДНК-дуплекса с тремя одноцепочечными разрывами. Для репарации последних использовали T4-ДНК-лигазу, причем собирали по отдельности каждую из цепей дуплекса (рис. 1).

Предложенная схема синтеза позволяет получить отдельно «верхний» и «нижний» тяжи олигонуклеотидного дуплекса, а также дает возможность расширить набор субстратов для фермента рестрикции *EcoRII* при минимальных затратах нуклеотидного материала. Так, комбинируя 30-звенные олигонуклеотиды и олигонуклеотиды ( $e-k$ ), не несущие 5'-концевой фосфатной группы, можно получить дуплексы с контролируемым одноцепочечным разрывом:



Для оценки термической устойчивости полученных ДНК-дуплексов и влияния введенных модификаций на структуру двойной спирали были использованы УФ-спектроскопия и КД. Хотя эти методы не позволяют охарактеризовать локальные возмущения, вносимые модифицированными

ми основаниями, они дают возможность выяснить, как влияют модификации на геометрию и термодинамические параметры дуплекса в целом. Такая информация полезна для корректной интерпретации данных, полученных при изучении белково-нуклеиновых взаимодействий.

Кривые плавления дуплексов I—III, VI' и VII в дифференциальной форме представлены на рис. 2, значения  $h$ ,  $T_{пл}$  и  $\Delta H^\circ$  комплексообразования приведены в таблице. Из экспериментальных данных видно, что введение вместо остатка тимидина 5-фтордезоксинуридина практически не влияет на  $T_{пл}$  и  $h$ , но несколько понижает энтальпию комплексообразования. Результаты изучения дуплекса II согласуются с литератур-

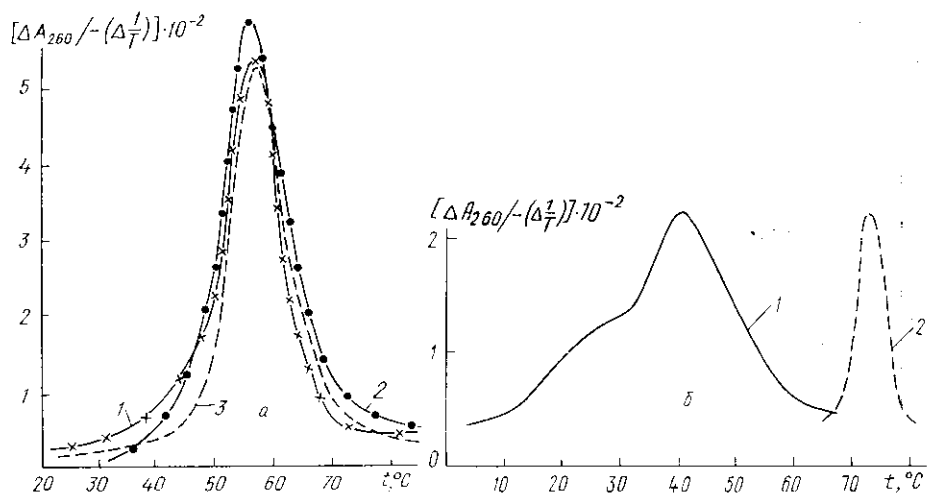


Рис. 2. Кривые плавления (в дифференциальной форме) ДНК-дуплексов: а — I (1), II (2), III (3) в 0,015 М цитратном буфере, pH 7,25, содержащем 0,15 М NaCl,  $C_0$  (0,2—0,4)  $\cdot 10^{-3}$  М; б — VI' (1) в 0,05 М МЭС-буфере, pH 6,0, содержащем 0,02 М  $MgCl_2$ ,  $C_0$  0,3  $\cdot 10^{-3}$  М и VII (2) в 0,04 М трис-НСI-буфере, pH 7,6, содержащем 0,05 М NaCl, 0,005 М  $MgCl_2$ , 0,007 М 2-меркаптоэтанол,  $C_0$  0,1  $\cdot 10^{-3}$  М

Fig. 2. Melting curves (in differential form) for DNA-duplexes: а — I (1), II (2), III (3) in 0.015 M of citrate buffer, pH 7.25, containing 0.15 M of NaCl,  $C_0$  (0.2—0.4)  $\cdot 10^{-3}$  M; б — VI' (1) in 0.05 M of MES-buffer, pH 6.0 containing 0.02 M of  $MgCl_2$ ,  $C_0$  0.3  $\cdot 10^{-3}$  M and VII (2) in 0.04 M of tris-HCl-buffer, pH 7.6 containing 0.05 M of NaCl, 0.005 M of  $MgCl_2$ , 0.007 M of 2-mercaptoethanol,  $C_0$  0.1  $\cdot 10^{-3}$  M

ными данными. Так, недавно методом ЯМР-спектроскопии было показано, что А·U-пара менее устойчива, чем А·Т-пара, однако 12-звенный ДНК-дуплекс, содержащий 5-фтордезоксинуридин, в целом не дестабилизирован [12]. В случае дуплекса III, содержащего 5-метилдезоксцитидин, можно было ожидать изменения термодинамических параметров комплексообразования, так как известно, что 5-метильная группа цитозина экспонирована в большую бороздку двойной спирали, а это должно вызвать изменение в гидратной оболочке дуплекса [13]. Однако полученные результаты (рис. 2, а, таблица) свидетельствуют о том, что введение одной — двух модификаций такого рода на 14 нуклеотидных пар не влияет существенно на термодинамические свойства системы. Для дуплекса VII характерно высокое значение  $T_{пл}$ ; плавление происходит в узком интервале температур (рис. 2, б, таблица). В отличие от этой системы плавление дуплекса VI', содержащего три разрыва в цепи фосфодиэфирных связей, не однофазно (рис. 2, б), что связано с гетерогенностью участков спаривания по длине и составу. В таблице приведена температура полуперехода, отвечающая последней ступени.

Данные КД свидетельствуют о незначительных конформационных изменениях, индуцированных указанными выше модификациями. Как видно из рис. 3, спектры КД дуплексов I—III почти полностью совпадают. Спектр КД дуплекса VI' (рис. 3) аналогичен спектру ДНК в В-форме с 50 % -ным содержанием G·C-пар [14]. В отличие от этого спектры дуплексов I—III имеют существенное сходство со спектром КД

ДНК в А-форме: точка нулевого перехода и максимум положительной полосы смещены в коротковолновую область, положительная полоса КД превышает отрицательную по амплитуде. Это позволяет нам сделать предположение о наличии элементов А-формы в двойной спирали ДНК-дуплексов I—III. Недавно появились сообщения об А-форме спирали в кристаллическом состоянии у коротких двуязычевых олигодезоксисаибонуклеотидов, содержащих кластеры  $\dots \dot{C} - \dot{C} \dots$  [15, 16]. В дуплексах I—III имеются четыре такие последовательности. Другая возможная причина отклонения спектров КД дуплексов I—III от канонического вида В-формы — влияние нуклеотидной последовательности на

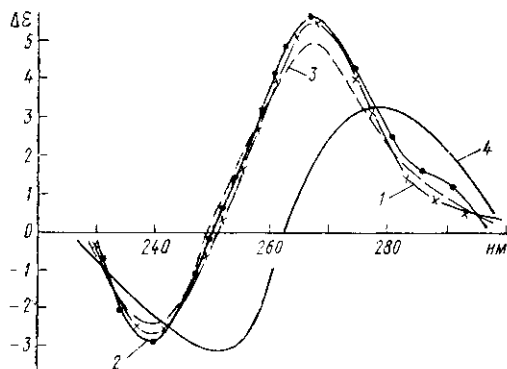


Рис. 3. Спектры КД ДНК-дуплексов I (1), II (2), III (3), VI' (4). Условия, как на рис. 2; 20 °С

Fig. 3. CD spectra of DNA duplexes I (1), II (2), III (3), VI' (4). Conditions as indicated in Fig. 2

Таким образом, результаты физико-химического изучения олигонуклеотидных дуплексов I—III показывают, что введение нуклеотидных аналогов  $m^5C$  и  $f^5U$  не снижает устойчивости дуплексов и не приводит к существенному искажению геометрии двойной спирали в целом. Следовательно, эти дуплексы можно с успехом использовать в качестве субстратов эндонуклеазы рестрикции *EcoRII*, и при интерпретации результатов этих исследований исключить фактор «измененной» по сравнению с немодифицированным субстратом структуры.

Авторы выражают благодарность В. Г. Метелеву и А. А. Пурмалю за помощь при проведении ВЭЖХ.

#### INTERACTION BETWEEN *EcoRII* RESTRICTION/MODIFICATION ENZYMES AND SYNTHETIC DNA FRAGMENTS. SYNTHESIS OF SUBSTRATES CONTAINING A SINGLE RECOGNITION SITE

S. A. Kuznetsova, E. A. Kubareva, T. S. Oretskaya, N. G. Dolinnaya, N. F. Krynetskaya, E. S. Gromova, Z. A. Shabarova, D. Cech

M. V. Lomonosov State University, Moscow;  
A. Humboldt University, GDR, Berlin

#### Summary

9-16 membered oligodeoxyribonucleotides forming DNA-duplexes with one *EcoRII* site (native or modified) were synthesized by the block triester method. The modifications involved the replacement of one (or two) cytidine or thymidine moieties in duplexes for  $m^5dC$  or  $f^5dU$ , respectively. 30-membered DNA-duplex was obtained by enzymatic ligation of five overlapping oligonucleotides. The substitutions introduced neither result in any significant destabilization nor distort the double helix geometry as is evidenced by the UV- and CD-spectroscopy methods.

#### Некоторые характеристики синтетических дуплексов \* Some properties of the duplex synthesized

№ дуплекса	h, % (±1)	T <sub>пл</sub> , °C (±1)	ΔH <sup>о**</sup> , ккал/моль (±5)
I	18	56	-94
II	21	55	-75
III	19	56	-88
VI'	22	40	—
VII	11	73	-188

\* Условия см. в подписи к рис. 2.

\*\* Для дуплекса VI' не рассчитывали ΔH<sup>о</sup> бифазного конформационного перехода.

вид спектра при изогеометричности структуры коротких ДНК-дуплексов — кажется нам значительно менее вероятной.

1. ДНК-подобные дуплексы, содержащие повторы. VIII. Синтез и свойства фрагментов ДНК-субстратов эндонуклеазы рестрикции *EcoRII* / Е. С. Громова, М. Н. Виноградова, А. А. Елов и др. // Молекуляр. биология.— 1984.— 18, № 2.— С. 370—381.
2. Interaction of *EcoRII* restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. V. Study of single-strand cleavages / A. A. Yolov, E. S. Gromova, E. A. Kubareva et al. // Nucl. Acids Res.— 1985.— 13, N 24.— P. 8969—8981.
3. Interaction of *EcoRII* restriction and modification enzymes with synthetic DNA fragments. VI. The binding and cleavage of substrates containing nucleotide analogs / A. A. Yolov, M. N. Vinogradova, E. S. Gromova et al. // Ibid.— P. 8983—8998.
4. Синтез и изучение термической устойчивости олигодезоксирибонуклеотидных дуплексов со структурными аномалиями / О. И. Грязнова, Н. Г. Долиная, М. Г. Исагулянц и др. // Биоорг. химия.— 1986.— 12, № 1.— С. 124—131.
5. Narang S. A. DNA-synthesis // Tetrahedron.— 1983.— 39, N 1.— P. 3—22.
6. Chemische Synthese von Nonadeoxyribonucleotiden mit den Abgewandelten Basen Uracil, 5-Bromuracil und 5-Methylcytosin nach dem Triester Verfahren / A. Roenthal, D. Cech, V. P. Veiko et al. // Tetrahedron Lett.— 1984.— 25, N 39.— P. 4353—4356.
7. Химические реакции в двуспиральных нуклеиновых кислотах. III. Синтез концевых инвертированных повторов IS1-элемента / З. А. Шабарова, В. П. Вейко, Н. Г. Долиная и др. // Биоорг. химия.— 1987.— 13, № 5.— С. 628—642.
8. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих 3'-концевую фосфатную группу / В. П. Вейко, Т. С. Орецкая, Е. М. Волков и др. // Химия природ. соединений.— 1984.— № 5.— С. 637—641.
9. Изменения в регламенте синтеза олигодезоксирибонуклеотидов на автоматах-синтезаторах «Виктория-2» и «Виктория-4М» / Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева, С. М. Грязнов и др. // Химия природ. соединений.— 1987.— № 1.— С. 153—155.
10. Chemische Synthese, Isolierung und Sequenzierung von Tetradekadesoxyribonucleotiden mit den Abgewandelten Basen 5-Fluoruracil und 5-Methylcytosin / A. Roenthal, F. Shubert, D. Cech et al. // Biomed. Biochim. Acta.— 1985.— 44, N 10.— S. 75—83.
11. Maxam A., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— 74, N 2.— P. 560—564.
12. Cremer A. B., Mikita T., Beardsley G. P. Chemical consequences of incorporation of 5-fluorouracil into DNA as studied by NMR // Biochemistry.— 1987.— 26, N 2.— P. 391—397.
13. Molecular structure of (m<sup>5</sup>dC-dG)<sub>3</sub>: the role of the methyl group in 5-methyl cytosine in stabilizing ZDNA / S. Fujii, A. H.-J. Wang, G. A. van der Marel et al. // Nucl. Acids Res.— 1982.— 10, N 23.— P. 7879—7892.
14. March C., Guschlbauer W. A simple method for the computation of first neighbour frequencies of DNAs from CD spectra // Ibid.— 1978.— 5, N 6.— P. 2013—2031.
15. Shakked Z., Rabinovich D. Sequence-dependent conformation of an A-DNA double helix. The crystal structure of the octamer d(G-G-T-A-T-A-C-C) // J. Mol. Biol.— 1983.— 166, N 2.— P. 183—201.
16. Raman spectra of single crystals of r(GCG)d(CGC) and d(CCCCGGGG) as models to A DNA, their structure transitions in aqueous solution and comparison with double-helical poly(dG)-poly(dC) / L. M. Benevides, A. H.-J. Wang, A. Rich et al. // Biochemistry.— 1986.— 25, N 1.— P. 41—50.

МГУ им. М. В. Ломоносова  
Гумбольдт. ун-т, Берлин

Получено 20.06.86

УДК 577.151.45

## ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ РЕСТРИКТАЗЫ *BspRI* В ОТНОШЕНИИ СОБСТВЕННЫХ САЙТОВ НА ДНК \*

В. Р. Сагитов, А. З. Метлицкая, А. А. Александров

**Введение.** Для ряда рестриктаз (*HaeIII*, *HhaI* [1], *EcoRI* [2, 3], *PstI* [4], *Hinfi* [5], *HindIII* и *BamHI* [6]) показано, что скорость гидролиза ДНК в различных сайтах существенно отличается. В предельных случаях некоторые сайты полностью устойчивы к действию фермента, хотя и обладают канонической последовательностью для данной рестриктазы [7]. Причина этого явления неизвестна. Предполагают, что эффективность гидролиза ДНК определяется ближайшим окружением сайта [2]. Действительно, на олигонуклеотидах было показано, что скорость гидролиза ДНК для рестриктаз *HaeIII*, *BspRI* и *BsuRI* зависит от того,

\* Представлена членом редколлегии М. Д. Франк-Каменецким.