

И. А. КОЗЛОВ, Б. В. ТЯГЛОВ, Е. С. ГРОМОВА, Р. К. ЛЕДНЕВА,
З. А. ШАБАРОВА, член-корреспондент АН СССР М. А. ПРОКОФЬЕВ

ВЛИЯНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ СУБСТРАТА
НА ГИДРОЛИЗ ДЕЗОКСИДИНУКЛЕОТИДОВ
ЭКЗОНУКЛЕАЗОЙ A_5

Экзонуклеаза A_5 ⁽¹⁾ используется нами при доказательстве структуры синтетических олигонуклеотидов. Для успешного проведения структурных исследований необходимо знать механизм действия фермента, и в частности его субстратную специфичность. В плане проводимых нами исследований свойств экзонуклеазы A_5 мы изучили кинетику гидролиза ряда природных и модифицированных по гетероциклическим основаниям дезоксидинуклеотидов. Для выяснения роли конформации субстрата в фермент-субстратных взаимодействиях представляло интерес сравнить доступность динуклеотидов действию экзонуклеазы A_5 с их вторичной структурой. Вторичная структура динуклеотидов в растворе определяется, как известно, внутримолекулярными гидрофобными взаимодействиями гетероциклических оснований. О силе этих взаимодействий можно судить по увеличению оптической плотности раствора при гидролизе динуклеотидов (гиперхромный эффект). Имеющиеся в литературе сведения о величинах гиперхромных эффектов ряда природных динуклеотидов и динуклеозидмонофосфатов крайне противоречивы; соответствующие данные для защищенных по гетероциклическим основаниям динуклеотидов в литературе отсутствуют. В связи с этим для дезоксидинуклеотидов, использовавшихся в настоящей работе в качестве субстратов, было проведено измерение гиперхромных эффектов после исчерпывающего гидролиза этих соединений экзонуклеазой A_5 .

Дезоксидинуклеотиды синтезировали по методу Кораны⁽²⁾. Спектрофотометрирование растворов динуклеотидов проводили на спектрофотометре SP-700 «Unicum» (Англия) при 20°. Исчерпывающий ферментативный гидролиз экзонуклеазой A_5 * проводили в 1-сантиметровой кварцевой кювете. Реакцию начинали добавлением равных количеств фермента к опытной пробе и кювете сравнения. Состав пробы: динуклеотид в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ M, фермент 0,2—5,0 единиц активности (с.а.) ** 0,02 M трис-HCl-буфер pH 9 и 0,01 M хлористый магний в конечном объеме 3 мл. Ферментативный гидролиз проводили в течение 0,5—4 час. в зависимости от количества добавленной экзонуклеазы A_5 . Величину гиперхромного эффекта (H) рассчитывали по уравнению: $H = (1 - D_0/D_h) \cdot 100\%$, где D_0 — оптическая плотность исходного раствора динуклеотида при длине волны, соответствующей максимуму поглощения динуклеотида, D_h — оптическая плотность раствора после исчерпывающего гидролиза динуклеотида ферментом при той же длине волны. Полноту гидролиза контролировали хроматографически.

* Препарат экзонуклеазы A_5 был любезно предоставлен Р. И. Татарской (Институт молекулярной биологии АН СССР).

** За единицу активности экзонуклеазы A_5 принимали количество фермента, гидролизующее дезоксидинуклеотид p³²T со скоростью 0,15 мол/мин., в пробе следующего состава: субстрат $1 \cdot 10^{-3}$ M, 0,01 M хлористый магний, 0,02 M трис-HCl-буфер pH 9 в общем объеме 1 мл.

Кинетические измерения проводили на автотитраторе («Radiometer», ТТГ-1с, Дания) при температуре 20°. В кювету помещали субстрат и хлористый магний в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-2} M$ соответственно, добавляли 0,01 N NaOH до pH 8,9—9,1 и дистиллированную воду до объема 1,5—6,0 мл (объем пробы определялся скоростью гидролиза и, соответственно, конечной концентрацией субстрата). Реакцию начинали добавлением экзонуклеазы A_5 , и начальную скорость гидролиза определяли титрованием нуклеотида, образующегося в ходе ферментативной реакции, щелочью (0,005 N NaOH). Скорость гидролиза дезоксидинуклеотидов выражали в $\mu\text{моль}/(\text{мин} \cdot \text{е.а.})$ после пересчета измеряемой начальной скорости на стандартную концентрацию фермента 1 е.а./мл. $K_{M(\text{каж})}$ и V_{max} определяли в координатах Лайнгувера — Берка ($K_{M(\text{каж})}$ — константа Михаэлиса кажущаяся).

Результаты кинетических и физико-химических измерений представлены в табл. 1. Для сравнения в табл. 1 приведены также литературные данные по величинам гиперхромных эффектов некоторых динуклеотидов после исчерпывающего гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда. Полученные нами значения величин гиперхромных эффектов не зависели ни от концентрации субстрата в пробе ($2 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-4} M$), ни от количества экзонуклеазы A_5 (0,2—5,0 е.а.) Это говорит о том, что взаимодействие экзонуклеазы A_5 с исходным динуклеотидом или продуктами ферментативного гидролиза не вносит вклада в величину гиперхромного эффекта и представленные в табл. 1 величины действительно отражают силу гидрофобных взаимодействий гетероциклических оснований в динуклеотидах. Сравнение гиперхромных эффектов показывает, что способность гетероциклических оснований к гидрофобным взаимодействиям в природных динуклеотидах убывает в ряду $A > G > C > T$, что полностью согласуется с литературными данными последних лет (3—6).

Поскольку гидролиз экзонуклеазой A_5 проводится в растворе, содержащем 0,01 M $MgCl_2$, необходимо было выяснить, не происходит ли изменения конформации динуклеотидов или их самоагрегации в присутствии ионов этого металла. Для выяснения этого вопроса было проведено изучение дисперсий оптического вращения (д.о.в.) защищенных и незащищенных динуклеотидов. Оказалось, что за исключением $dpGpG$ и $dpG^{iBn}pG^{iBn}$, кривые д.о.в. изучаемых соединений, снятые в 0,02 M три- HCl -буфере pH 9, содержащем 0,01 M $MgCl_2$, не отличаются от соответствующих кривых в 0,02 M три- HCl -буфере. Эти результаты свидетельствуют об отсутствии влияния ионов магния на конформацию изучаемых динуклеотидов и их производных в растворе. В случае $dpGpG$ (рис. 1)* при наличии в среде ионов магния наблюдается существенное увеличение величин молярных вращений. Это, по-видимому, объясняется известной склонностью гуанин-содержащих олигонуклеотидов к самоагрегации (6), которой в нашем случае способствуют ионы магния. Межмолекулярные взаимодействия в агрегатах динуклеотида $dpGpG$ могут вносить некоторый вклад в определяемую величину гиперхромного эффекта.

Модифицированные по аминогруппам гетероциклических оснований динуклеотиды характеризуются меньшими величинами гиперхромных эф-

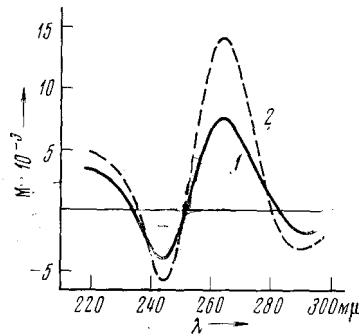


Рис. 1. Кривые д.о.в. $dpGpG$ в 0,02 M три- HCl -буфере pH 9 (1) и в 0,02 M три- HCl -буфере pH 9, содержащем 0,01 M $MgCl_2$ (2). M — молярное вращение

* При расчете молярных вращений использовали ε $dpGpG$ 25 000 (7% гипохромия), полученный в нашей лаборатории Н. Г. Долиной в условиях, исключающих самоагрегацию динуклеотида.

фектов по сравнению с соответствующими природными динуклеотидами. По-видимому, введение объемного гидрофобного заместителя в аминогруппы оснований уменьшает гидрофобные взаимодействия гетероциклических оснований в динуклеотидах, в результате чего их вторичная структура становится менее закрепленной. К аналогичным выводам недавно

Таблица 1

Величина гиперхромных эффектов (H) дезоксидинуклеотидов и кинетические параметры гидролиза этих соединений экзонуклеазой A_5

| Соединение * | λ , м μ | H , % | K_M (как.), M | $V_{max}/$ [Е] ** имол/ (мин·е.а.) | Литературные данные | | | | |
|--------------|---------------------|---------|----------------------|---|---------------------|---------------------|----|---------|----------|
| | | | | | Соединение | λ , м μ | pH | H , % | источник |
| dpTpT | 215 | 3,7 | $1,0 \cdot 10^{-3}$ | 0,30 | dTpT | 260 | 7 | 3,6 | (3) |
| dpCpC | 280 | 3,9 | $1,4 \cdot 10^{-3}$ | 0,30 | dpTpT | 265 | 8 | 5,7 | (4) |
| dpGpG | 258 | 14,0 | $3,5 \cdot 10^{-3}$ | 0,30 | dCpC | 260 | 7 | 1,4 | (3) |
| dpApA | 260 | 15,0 | $6,6 \cdot 10^{-3}$ | 0,55 | CpC | 260 | 7 | 6,7 | (5) |
| dpApC | 268 | 8,7 | $1,5 \cdot 10^{-3}$ | 0,35 | dGpG | 260 | 7 | 5,7 | (3) |
| dpCpA | 268 | 6,5 | $1,0 \cdot 10^{-3}$ | 0,45 | GpG | 260 | 7 | 6,5 | (5) |
| An An | | | | | dpApA | 260 | 8 | 18,5 | (4) |
| dpCpC | 302 | <2,0 | $1,2 \cdot 10^{-4}$ | 0,30 | dApA | 260 | 7 | 10,0 | (3) |
| iBu iBu | | | | | dApC | 260 | 7 | 6,6 | (3) |
| dpGpG | 258 | 3,8 | $7,0 \cdot 10^{-4}$ | 0,50 | ApC | 260 | 7 | 7,1 | (5) |
| Bz Bz | | | | | dCpA | 260 | 7 | 6,6 | (3) |
| dpApA | 280 | 5,0 | $8,0 \cdot 10^{-4}$ | 0,20 | CpA | 260 | 7 | 7,1 | (5) |
| An Bz | | | | | | | | | |
| dpCpA | 287 | 2,2 | $1,7 \cdot 10^{-4}$ | 0,30 | | | | | |
| Bz An | | | | | | | | | |
| dpApC | 287 | 3,3 | $1,9 \cdot 10^{-4}$ | 0,30 | | | | | |

* При обозначении динуклеотидов использовали принятые в литературе сокращения (8, 9).
** Концентрация фермента.

пришел Швайцер с сотрудниками в отношении N^6 - $(\Delta^2\text{-изопентенил})$ -аденилил-(3'-5')-аденозина и аденилил-(3'-5') N^6 - $(\Delta^2\text{-изопентенил})$ -аденозина на основании изучения спектров я.м.р. и д.о.в. (7).

Изучение кинетики гидролиза дезоксидинуклеотидов экзонуклеазой A_5 не выявило специфичности фермента к какому-либо природному основанию. Обращает на себя внимание корреляция значений K_M (как.) и величин гиперхромных эффектов: фермент проявляет большее средство к субстратам с менее закрепленной конформацией. В то же время на скорость ферментативного гидролиза вторичная структура субстрата влияния не оказывает: все динуклеотиды гидролизуются практически с одинаковой скоростью. Интерпретация физического смысла K_M (как.) и V_{max} станет возможной после выяснения механизма действия экзонуклеазы A_5 ; работы в этом направлении нами проводятся.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
18 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- 1 R. I. Tataрskaya, T. N. Lvova et al., Europ. J. Biochem., **15**, 442 (1970).
- 2 S. A. Narang, T. M. Jacob, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **89**, 2158 (1967).
- 3 C. R. Cantor, M. M. Warschaw, H. Shapiro, Biopolymers, **9**, 1059 (1970).
- 4 G. R. Cassawi, F. J. Bollum, Biochemistry, **8**, 3928 (1969). 5 M. M. Warschaw, I. Tinoco jr., J. Mol. Biol., **20**, 29 (1966). 6 R. K. Ralph, W. J. Connors, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **84**, 2265 (1962). 7 M. P. Schweitzer, R. Thedford, J. Slama, Biochem. et biophys. acta, **232**, 217 (1971). 8 E. Ohtsuka, M. W. Moon, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2956 (1965). 9 T. M. Jacob, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., **87**, 2971 (1965).