

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 «Uniscum» (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 $2 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ М, фермент 0,2—5,0 единиц активности (с.а.) ** $0,02$ М трис-НСl-буфер pH 9 и $0,01$ М 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: $H = (1 - D_0 / D_k) \cdot 100\%$, где D_0 — оптическая плотность исходного раствора динуклеотида при длине волны, соответствующей максимуму поглощения динуклеотида, D_k — 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 рТрТ со скоростью 0,15 мол/мин., в пробе следующего состава: субстрат $1 \cdot 10^{-3}$ М, $0,01$ М хлористый магний, $0,02$ М трис-НСl-буфер pH 9 в общем объеме 1 мл.

Кинетические измерения проводили на автотитраторе («Radiometer», ТТТ-1с, Дания) при температуре 20°. В кювету помещали субстрат и хлористый магний в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-2}$ М соответственно, добавляли 0,01 N NaOH до pH 8,9—9,1 и деионизованную 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 $\mu\text{мол}/(\text{мин} \cdot \text{е.а.})$ после пересчета измеряемой начальной скорости на стандартную концентрацию фермента 1 е.а./мл. $K_{M(\text{каж})}$ и V_{max} определяли в координатах Лайнуивера — 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 истощающего гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда. Полученные нами значения величин гиперхромных эффектов не зависели ни от концентрации субстрата в пробе ($2 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ М), ни от количеств экзонуклеазы A_5 (0,2—

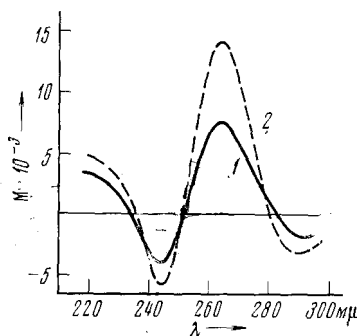


Рис. 1. Кривые д.о.в. dpGpG в 0,02 М трис-HCl-буфере pH 9 (1) и в 0,02 М трис-HCl-буфере pH 9, содержащем 0,01 М MgCl_2 (2). М — молярное вращение

— 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 (³⁻⁵).

Поскольку гидролиз экзонуклеазой A_5 проводится в растворе, содержащем 0,01 М 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 дисперсии оптического вращения (д.о.в.) защищенных и незащищенных динуклеотидов. Оказалось, что за исключением dpGpG и dpG^{IBu}pG^{IBu} кривые д.о.в. изучаемых соединений, снятые в 0,02 М трис-HCl-буфере pH 9, содержащем 0,01 М MgCl_2 , не отличаются от соответствующих кривых в 0,02 М трис-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 аминок группам гетероциклических оснований динуклеотиды характеризуются меньшими величинами гиперхромных эф-

* При расчете молярных вращений использовали $\epsilon_{\text{dpGpG}} 25\,000$ (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 амино-группы 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 , мμ	H , %	K_M (как.), М	$V_{max}/$ $[E]^{**}$ μмол/ (мин·с.а.)	Литературные данные				
					Соединение	λ , мμ	pH	H , %	источ- ник
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 (3, 4).
** Концентрация фермента.

пришел Швайцер с сотрудниками в отношении N^6 - (Δ^2 -изоопентенил)-аде-нилил (3'-5')-аденозина и аденилил-(3'-5') N^6 - (Δ^2 -изоопентенил)-аденози-на 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. Tatarskaya, 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. Cassaw, 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).