



УДК 577.152.322*3.01

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ТЕСТИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ УРАЦИЛ-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ

© 2000 г. А. Е. Судьина, Е. М. Волков, Т. С. Орецкая,
С. Х. Дегтярев*, Д. А. Гончар*, Е. А. Кубарева***

Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;

** Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАН, Новосибирск;*

*** Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова,
119899, Москва, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 15.11.99 г. Принята к печати 30.12.99 г.

Предложен быстрый и эффективный метод тестирования активности репарирующего фермента урацил-ДНК-гликозилазы (UD-гликозилаза). В качестве субстрата для UD-гликозилазы использован дезоксиуридинсодержащий 5'-³²P-меченый олигонуклеотид, необратимо присоединенный к полистирольному носителю (Tenta Gel S-NH₂). Расщепление аммиаком образующегося при ферментативной реакции апиримидинового участка приводит к переходу меченого фрагмента олигонуклеотида с полимера в раствор, что позволяет судить об активности фермента.

Ключевые слова: урацил-ДНК-гликозилаза; апиримидиновый/апуриновый участок; ферментативная активность.

ВВЕДЕНИЕ

В ходе репликации некоторые минорные нуклеотиды включаются в новообразованную цепь ДНК, что делает возможным возникновение мутаций, если ошибки не будут вовремя исправлены. Кроме ошибок, возникающих при репликации, ДНК часто подвергается повреждениям, которые могут возникать под воздействием окружающей среды (УФ-излучение, алкилирующие агенты и др.).

В клетках существует ряд ферментов – ДНК-*N*-гликозилаз, которые узнают минорные или поврежденные основания и расщепляют *N*-гликозидную связь данного основания с остатком дезоксирибозы с образованием апиримидинового/апуринового участка – AP-сайта. Один из таких ферментов – урацил-ДНК-гликозилаза (UD-гликозилаза) (КФ 3.2.2.3) – узнает остаток дезоксиуридина, появляющийся в ДНК в процессе репликации при ошибочном встраивании dUTP вместо dTTP или в результате дезаминирования цитозина. Фермент удаляет урацил посредством гидролиза *N*-гликозидной связи. Далее AP-эндо-нуклеаза и экзонуклеаза выщепляют остаток дезоксирибозы, а разрыв в цепи ДНК ликвидируется

при последующем репарационном синтезе (с участием ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы) [1].

UD-гликозилаза нашла практическое применение в генно-инженерной и молекулярно-биологической практике для футпринтинга ДНК-белковых комплексов [2], детекции точечных мутаций [3], удаления праймеров в ПЦР [4, 5]. Вследствие этого в последние годы активно изучается механизм взаимодействия этого фермента с ДНК [6–10].

UD-гликозилазу выделяют из разных источников (из *E. coli*, плаценты человека, вируса герпеса и др.). Для количественного определения активности UD-гликозилазы в качестве субстрата обычно используют [³H]dU-ДНК, инкубация которой с ферментом приводит к накоплению кислоторастворимого ³H-содержащего урацила и убыли триетивой метки в исходной ДНК. Об активности фермента судят по уменьшению количества триетивой метки в кислотонерастворимом осадке за единицу времени [7].

В ряде случаев, особенно на промежуточных стадиях выделения UD-гликозилазы, достаточно качественной оценки активности фермента, которую проводят методом гель-электрофореза: предварительно образовавшийся в результате действия фермента AP-сайт расщепляется химическими реагентами (пиперидином или щелочью) с последующим анализом продуктов в ПААГ [9]. Иногда активность UD-гликозилазы тестируют по изменению флуоресценции при взаимодействии фермента с двукратной ДНК, содержащей

Сокращения: AP-сайт – апиримидиновый/апуриновый участок; [³H]dU-ДНК – [³H]-деоксиуридинсодержащий олигонуклеотид; UD-гликозилаза – урацил-ДНК-гликозилаза.
Автор для переписки (тел.: (095) 939-31-48; факс: (095) 939-31-81; e-mail: kubareva@genebee.msu.su).

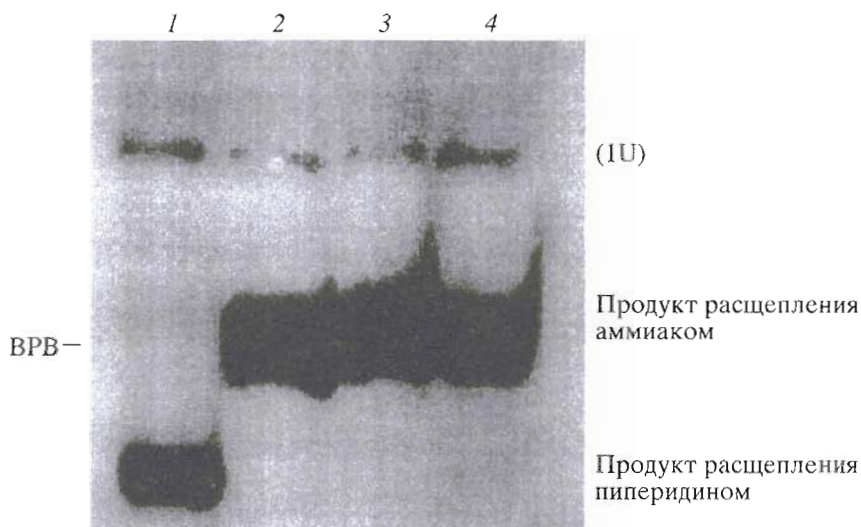


Рис. 1. Радиоавтограф геля, полученный при анализе продуктов расщепления углеводфосфатного остова [^{32}P] (IU) в AP-сайте. Дорожки: 1 – обработка пиперидином (90°C, 30 мин); 2–4 – обработка аммиаком (95°C, 5, 10 и 15 мин соответственно). ВРВ – положение красителя-маркера бромфенолового синего.

остаток 2-аминопурина напротив выщепляемого урацила [11].

Однако быстрые методы анализа активности UD-гликозилазы, не требующие специального оборудования, отсутствуют. В настоящей работе мы предлагаем экспресс-метод оценки активности UD-гликозилазы *E. coli*, основанный на гидролизе необратимо присоединенного к полимеру олигонуклеотидного субстрата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий расщепления олигодезоксирибонуклеотида по AP-сайту, образующемуся под действием UD-гликозилазы. Для разработки метода определения активности UD-гликозилазы в качестве субстрата мы использовали синтетический 14-звенный олигодезоксирибонуклеотид (IU), радиоактивно меченный по 5'-концу:



Использование такого дезоксиридинсодержащего субстрата является вполне оправданным, поскольку известно, что ДНК-узнающий центр UD-гликозилазы взаимодействует более чем с десятью нуклеотидными звеньями нуклеиновой кислоты [7].

При взаимодействии олигонуклеотида (IU) с UD-гликозилазой происходит разрыв N-гликозидной связи, образованной остатком урацила с углеводным фрагментом. Гидролиз углеводфосфатного остова в полученном апириимидиновом сайте обычно проводят в 10% водном растворе пиперидина. Однако пиперидин является сильным основанием и такая обработка может привести к неспецифическому расщеплению синтетических олигодезоксирибонуклеотидов при нагре-

вании до 90°C [12]. В работе [12] была показана возможность применения в данной реакции более слабых аминов в качестве расщепляющих агентов. Мы использовали для этой цели концентрированный раствор аммиака, что позволило значительно ускорить процедуру гидролиза AP-сайта в ДНК. В подобранных нами оптимальных условиях расщепления (5 мин, 95°C, 25% водный аммиак) происходит практически полный гидролиз олигонуклеотида, содержащего AP-сайт (рис. 1). Степень расщепления AP-сайта как аммиаком, так и пиперидином превышает 90%, однако, в первом случае продукт имеет меньшую электрофоретическую подвижность, чем во втором.

При использовании других аминов, например, морфолина, 1,2-этилендиамина, а также лизина, время реакции составляло не менее 30 мин [12]. Преимуществом использования аммиака является отсутствие необходимости длительного перемешивания смеси после реакции.

Можно предположить, что превращения в AP-сайте олигонуклеотида под действием аммиака и пиперидина происходят по механизму, показанному на схеме 1. При расщеплении углеводфосфатного остова раствором пиперидина образуются продукты двойного β -элиминирования, в том числе (III) и (IV) [13]. При реакции с аммиаком, как более слабым основанием, по-видимому, происходит лишь гидролиз 3'-фосфодиэфирной связи в AP-сайте и образуется аддукт (II) – продукт β -элиминирования, который должен иметь меньшую подвижность, чем (IV), в ПААГ. При использовании других аминов, имеющих rK_a ниже, чем у пиперидина, также наблюдали преимущественное образование продуктов неполной деградации дезоксирибозы [12].

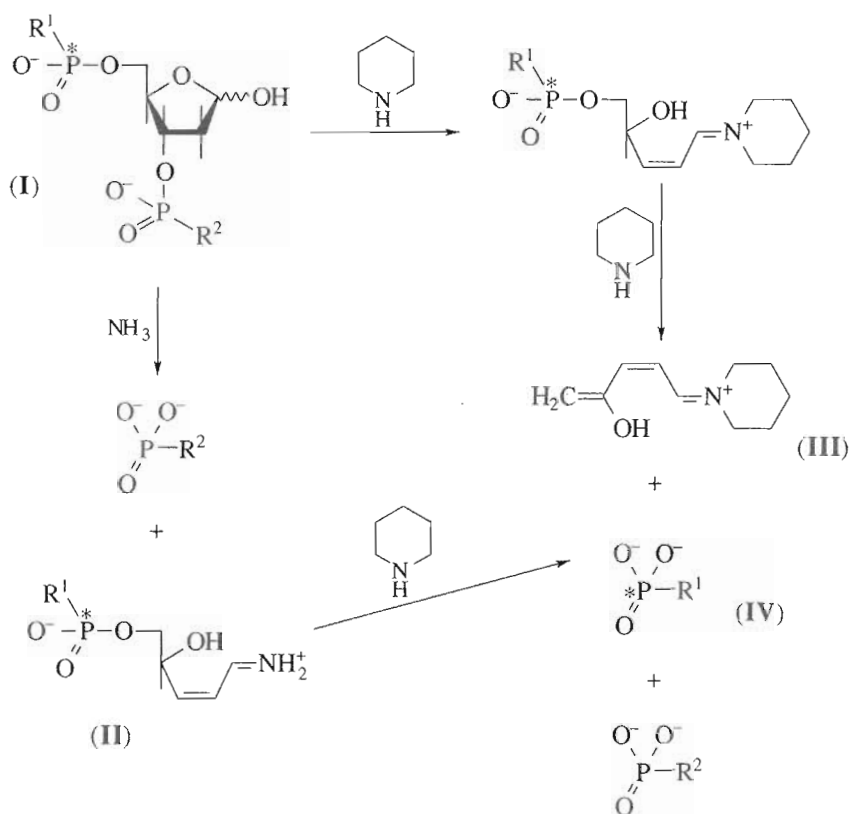


Схема 1.

При увеличении времени инкубации с аммиаком происходит постепенный гидролиз соединения (II) до фосфорилированного олигонуклеотида (IV) (18% за 1 ч инкубации), а обработка (II)

раствором пиперидина при $90^\circ C$ в течение 30 мин приводит к его количественному переходу в продукты (III) и (IV).

Таким образом, была доказана возможность использования аммиака для расщепления углеводфосфатного остова и подобраны оптимальные условия проведения данной реакции.

Использование олигонуклеотида, ковалентно присоединенного к полимеру, в качестве субстрата для *UD*-гликозилазы. Анализ продуктов расщепления углеводфосфатного остова методом гель-электрофореза – достаточно длительная процедура. Использование в качестве субстратов олигонуклеотидов, ковалентно присоединенных к полимерной матрице, исключает необходимость в электрофорезе. После расщепления по *AP*-сайту меченый материал переходит с полимера в раствор, и по соотношению радиоактивности раствора и полимера можно судить об активности фермента (схема 2). Связь между субстратом и полимером должна быть устойчива к процедурам деблокирования олигонуклеотида и к гидролизу *AP*-сайта аммиаком после реакции с *UD*-гликозилазой.

Синтез олигонуклеотида, ковалентно присоединенного к полимерному носителю. Нами бы-

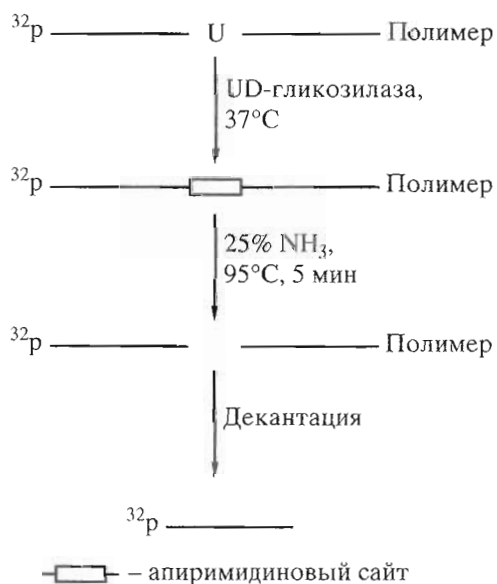
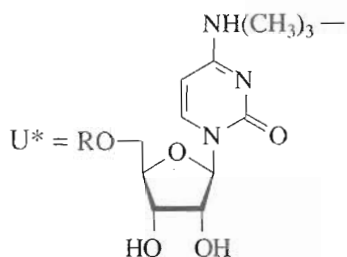


Схема 2.

ла исследована возможность применения двух различных типов полимерных носителей с закрепленным на них олигонуклеотидом, меченным по 5'-концу. Для предотвращения возможных стерических препятствий при функционировании UD-гликозилазы между субстратом и полимером вводили дополнительный фрагмент (dT)₉:

5'd(ACCTACCUGGTGGTT₉)U* – полимер, где полимер – CPG-500 или Tenta Gel S-NH₂,



R – олигонуклеотидная цепь.

В первом случае для иммобилизации субстрата использовали носитель на основе силикагеля – CPG-500 (полимер А), присоединение первого нуклеозида к которому проводили по методике [14]. Первым нуклеозидным звеном при синтезе служило 4-триазолидное производное 2',3'-ди-*O*-ацетил-5'-*O*-монометокситритилуридина с последующим замещением остатка триазола на аминогруппу полимера. Концентрация олигонуклеотида на поверхности матрицы невелика – 20–30 мкмоль/г.

Очевидно, что связь олигонуклеотид–полимер А будет устойчивой в условиях удаления защитных групп с олигонуклеотида. Однако при обработке полимера А раствором концентрированного аммиака происходит его частичная деструкция и, как следствие, потеря иммобилизованного олигонуклеотидного материала (до 70%).

Во втором случае для присоединения субстрата был опробован коммерческий носитель Tenta Gel S-NH₂: сополимер *O*-(2-аминоэтил)полиэтиленгликоля и полистирола (полимер В). Присоединение первого нуклеотида проводили как описано выше. Содержание первого нуклеозида на полимере В составило 50 мкмоль/г, и для него характерна устойчивость в условиях удаления защитных групп.

Таким образом, для оценки активности UD-гликозилазы предпочтительнее в качестве субстрата использовать олигонуклеотид, закрепленный на полистирольной матрице.

Реакция UD-гликозилазы с олигонуклеотидом, закрепленным на полимере. После инкубации [³²P]олигонуклеотида, иммобилизованного на полимере В, с UD-гликозилазой реакционную смесь обрабатывали аммиаком. Пробу центрифугировали, затем отделяли раствор и измеряли радиоактивность раствора и полимера. Меченый материал более чем на 90% переходит с полимера

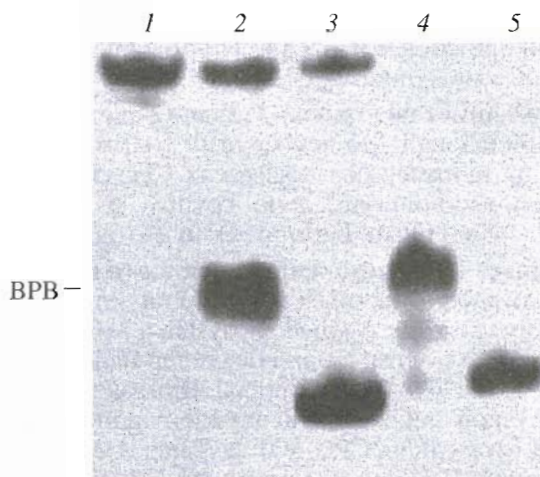


Рис. 2. Анализ продуктов расщепления углеводфосфатного остова в AP-сайте [³²P] (1U), находящегося в растворе (дорожки 1–3) и закрепленного на полимере (дорожки 4, 5). Расщепление проводили аммиаком (2, 4) и пиперидином (3, 5); 1 – исходный (1U). BPB – положение красителя-маркера бромфенолового синего.

в раствор, что свидетельствует об активности фермента. Параллельно в тех же условиях проводили реакцию со свободным олигонуклеотидом, имеющим ту же последовательность.

Одинаковая подвижность в 20% ПААГ фрагментов, полученных в результате реакции с олигонуклеотидом, закрепленным на полимере и находящимся в растворе (рис. 2), свидетельствует о том, что расщепление иммобилизованного субстрата идет специфически по AP-сайту.

Таким образом, разработан экспресс-метод тестирования активности UD-гликозилазы, включающий реакцию с олигонуклеотидом, закрепленным на полистирольной матрице, с последующей обработкой аммиаком. Данный подход применим для оценки активности других репарирующих ферментов при наличии соответствующего субстрата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5'-*O*-диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламино)-(2-цианоэтил)фосфиты 2'-дезоксирибонуклеотидов (Glen Research, США), 2'-дезоксинуридин, бычий сывороточный альбумин, Трис, персульфат аммония (Sigma, США), полинуклеотидкиназу фага Т4 (Сибэнзим, Россия), пиперидин, дитиотреит, MgCl₂, NaCl (Merck, Германия), EDTA, LiClO₄ (Fluka, Германия), тетраметилэтилендиамин (TEMED), акриламид, бисакриламид (Serva, Германия). Остальные реактивы и растворители – производства России, марки “ос. ч.”.

5'-*O*-Диметокситритил-3'-(*N,N*-диизопропиламино)-(2-цианоэтил)фосфит 2'-дезоксинуридина по-

лучали из дезоксиуридина последовательным тритилированием и фосфитилированием по стандартным методикам [15].

5'-О-Диметокситритил-2',3'-ди-О-ацетилюридин иммобилизовали по четвертому положению урацила на полимерных носителях CPG-500, содержащем аминопропильную группу, и Tenta Gel S-NH₂ (оба – Fluka, Германия) по методике [14].

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов выполняли амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380B (США). В качестве полимерных носителей использовали Small Scale dN CPG (Applied Biosystems, США) с загрузкой первым олигонуклеотидным звеном 20–24 мкмоль/г, CPG-500 и Tenta Gel S-NH₂ с загрузкой 5'-О-диметокситритил-2',3'-ди-О-ацетилюридином 20–30 и 50 мкмоль/г соответственно. Анализ чистоты олигонуклеотидов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном варианте [16].

Для анализа чистоты иммобилизованных на CPG-500 и Tenta Gel S-NH₂ олигонуклеотидов последние удаляли с полимерного носителя последовательными реакциями окисления 2',3'-цидиольной группировки 3'-концевого уридина и β-элиминирования [17].

³²P-Метку в олигонуклеотиды как неиммобилизованные, так и иммобилизованные на полимере, вводили с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 (5 ед. акт.) в присутствии [γ-³²P]АТФ (0,4 МБк) в Трис-НСl-буфере (50 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, рН 7,6) при 37°C в течение 30 мин. Меченые неиммобилизованные на полимере олигонуклеотиды выделяли из реакционной смеси методом гель-электрофореза. Избыток [γ-³²P]АТФ отделяли от ³²P-меченых олигонуклеотидов, иммобилизованных на полимере, многократным промыванием полимера водой. Радиоактивность измеряли методом счета по Черенкову на счетчике Delta 300 (Tracor, Нидерланды).

Гель-электрофорез олигонуклеотидов осуществляли в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, в Трис-боратном буфере (50 мМ Трис-НСl, 50 мМ борная кислота, 1 мМ EDTA, рН 8,3); с элюцией соединений из геля 2 М водным раствором LiClO₄ в течение 12 ч при 4°C.

Ген урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* клонировали в экспрессирующий вектор pGSD по ранее описанной методике [18]. Этот прием позволяет получить высокий уровень продукции белка с дополнительной N-концевой последовательностью аминокислот, содержащей шесть остатков гистидина. Полученной плазмидой pGSD-UDG, несущей ген UD-гликозилазы, трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3).

Белок, содержащий шесть остатков гистидина, выделяли аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе (QIAGEN GmbH, Германия),

элюировали линейным градиентом N-метилимидазола (0–0,5 М) в буфере А (50 мМ К-фосфат, рН 6,0, 300 мМ KCl) и тестировали методом электрофореза в 12% SDS-ПААГ. Фракции, содержащие UD-гликозилазу, объединяли, концентрировали и диализовали против буфера В (50 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 0,5 мМ EDTA, 5 мМ 2-меркаптоэтанол), содержащего 50% глицерин. Полученный препарат рехроматографировали гель-фильтрацией на сефакриле S-200. Степень очистки фермента составляла более 95%, концентрация белка в препарате – 5 мг/мл, молекулярная масса белка – 26 кДа.

Выщепление с помощью UD-гликозилазы урацила из ³²P-меченого олигонуклеотида, иммобилизованного на полистирольном носителе (концентрация олигонуклеотида 2 мМ), проводили в течение 30 мин при 37°C в 10 мкл 20 мМ Трис-НСl-буфера, рН 7,5, содержащего 60 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина: в реакционную смесь добавляли 0,01 мкг фермента (0,01 ед. акт.) в 2 мкл Трис-НСl-буфера, рН 7,5, содержащего 10 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA, 0,2 % Твин-20, 50% глицерин; объем раствора над полимером 20 мкл. Далее в реакционную смесь добавляли 80 мкл 30% раствора аммиака, инкубировали в течение 5, 10 и 15 мин при 95°C. Пробу центрифугировали 3 мин (10000 об/мин) и отбирали раствор. Радиоактивность раствора и полимера измеряли методом счета по Черенкову как указано выше. Реакцию с UD-гликозилазой и последующее расщепление AP-сайта аммиаком на неприсоединенном к полимеру олигонуклеотиде (1U) (концентрация 5 мкМ) проводили аналогично.

Расщепление AP-сайта пиперидином (10% водный раствор) проводили при 90°C в течение 30 мин. Пиперидин удаляли многократным переупариванием с водой. Анализ продуктов расщепления проводили в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. После радиоавтографии определяли радиоактивность полос геля, соответствующих исходному веществу и продуктам реакции.

Работа выполнена при поддержке программы “Университеты России” (направление 07.03.01, грант № 992233) и программы “Ведущие научные школы” № 00-15-97944.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. В 3-х т. Пер. с англ. М.: Мир, 1988. Т. 2. С. 122–127.
2. Devchand P.R., McGhee J.D., van de Sande H. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3437–3443.
3. Greger B., Kemper B. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 4432–4438.
4. Liu H.-S., Tzeng H.-C., Liang Y.-J., Chen C.-C. // Nucl. Acids Res. 1994. V. 22. P. 4016–4017.

5. Ball J.K., Curran R. // *Anal. Biochem.* 1997. V. 253. P. 264–267.
6. Delort A.-M., Duplaa A.-M., Molko D., Teoule R. // *Nucl. Acids Res.* 1985. V. 13. P. 319–335.
7. Василенко Н.Л., Булычев Н.В., Горн В.В., Левина А.С., Невинский Г.А. // *Молекулярн. биология.* 1994. Т. 28. С. 679–690.
8. Slupphaug G., Eftedal I., Kavli B., Bharati S., Helle N.M., Haug T., Levine D.W., Krokan H.E. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 128–138.
9. Kubareva E.A., Volkov E.M., Vinogradova N.L., Kanevsky I.A., Oretskaya T.S., Kuznetsova S.A., Brevnov M.G., Gromova E.S., Nevinsky G.A., Shabarova Z.A. // *Gene.* 1995. V. 157. P. 167–171.
10. Виноградова Н.Л., Булычев Н.В., Максакова Г.А., Джонсон Ф., Невинский Г.А. // *Молекулярн. биология.* 1998. Т. 32. С. 489–499.
11. Stivers J.T. // *Nucl. Acids Res.* 1998. V. 26. P. 3837–3844.
12. McHugh P.J., Knowland J. // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1664–1670.
13. Шабарова З.А., Богданов А.А., Золотухин А.С. *Химические основы генетической инженерии.* М.: Изд-во МГУ, 1994. С. 52–60.
14. Webb T.R., Matteucci M.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 2764–2765.
15. Atkinson T., Smith M. // *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* / Ed. M.J. Gait. Oxford; Washington: IRL Press, 1984. P. 35–82.
16. Таулицкий В.Н., Орецкая Т.С. // *Биоорг. химия.* 1997. Т. 23. С. 732–741.
17. Neu H.D., Heppel L.A. // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. P. 3685–3692.
18. Белавин П.А., Нетесова Н.А., Решетников С.С., Иванисенко В.А., Ерошкин А.М., Протопопова Е.В., Локтев В.Б., Малыгин Э.Г. // *Биотехнология.* 1997. № 3. С. 3–9.

An Express Method of Testing Activity of a Repair Enzyme, Uracil-DNA-glycosylase

A. E. Sudina*, E. M. Volkov*, T. S. Oretskaya*,
S. Kh. Degtyarev**, D. A. Gonchar**, and E. A. Kubareva****

*Chemical Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, GSP-3 Moscow, 119899 Russia

**Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Division,
Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

***Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

A rapid and effective method of testing of a repair enzyme, uracil-DNA-glycosylase, was proposed. As a substrate, a deoxyuridine-containing 5'-³²P-labeled deoxyoligonucleotide covalently attached to a polystyrene support (Tenta Gel S-NH₂) was used. The ammonia cleavage of the apyrimidine site formed in the enzymic reaction followed by the transition of the labeled oligonucleotide fragment from the solid phase into solution allowed the detection of the enzymic activity.

Key words: apyrimidine site, enzymic activity, repair enzyme, uracil-DNA-glycosylase

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 939-3148; fax: +7 (095) 939-3181;
e-mail: kubareva@genebee.msu.su.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 6. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.