

УДК 547.693.32.057:542.95

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНТАКТОВ ФОСФАТНЫХ ГРУПП ДНК С НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ АМИНОКИСЛОТАМИ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ФОРМАМИДОПИРИМИДИН-ДНК ГЛИКОЗИЛАЗЫ *E. coli*

А. И. Рыхлевская¹, О. М. Сидоркина³, Е. А. Романова², Т. С. Орецкая^{1*}, Ж. Лаваль³,
С. А. Кузнецова¹

(¹химический факультет, ²Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Воробьевы горы,
Москва 119899, Россия; тел.: 939-31-48; e-mail: oretskaya@genebee.msu.su); ³Институт
Гюстава Русси, Вильжуиф, Франция)

Для зондирования активного центра Fpg *E. coli* и определения контактов белка с фосфатными группами в ДНК использовали набор реакционноспособных аналогов субстратов, содержащих в своей структуре одновременно остаток 8-ОГ и тризамещенные пирофосфатные межнуклеотидные группировки в различных положениях по отношению к нему. Модифицированные ДНК-дуплексы были получены методом химического лигирования. Изучены свойства и реакционная способность синтезированных аналогов субстратов, исследовано их взаимодействие с Fpg *E. coli*, определены константы диссоциации ДНК-белковых комплексов. Изучено каталитическое расщепление модифицированных ДНК-дуплексов Fpg и найдены новые негидролизующие аналоги субстратов этого фермента. Подобраны оптимальные условия для ковалентного связывания реакционноспособных ДНК-дуплексов с ферментом и получены специфические ковалентные ДНК-белковые комплексы, что позволило определить контакты нуклеофильных аминокислот Fpg *E. coli* с фосфатными группами ДНК.

Репарация ДНК является одним из основных процессов, обеспечивающих стабильность и целостность генетической информации. Нарушения в системе репарации могут приводить к преждевременному старению, заболеваниям аутоиммунной системы, кардиологическим, онкологическим и ряду других [1–4]. Изучение основ механизма репарации, и в частности исследование субстратной специфичности и механизма действия ферментов, принимающих участие в этом процессе, является одной из приоритетных задач современной биоорганической химии, молекулярной биологии и медицины. Ключевую роль в репарации повреждений ДНК, вызванных воздействием активного кислорода, играет фермент эксцизионной репарации ДНК – формамидопиримидин-ДНК гликозилаза *E. coli* (Fpg) [5, 6]. Этот фермент узнает и выщепляет из ДНК остатки 7,8-дигидро-8-оксогуанина (8-ОГ) – наиболее распространенные повреждения ДНК, образующиеся под действием окислительных агентов, и является удобной моделью для исследования механизма действия репарирующих ферментов данного типа [7–10].

Целью настоящей работы явилось определение контактов Fpg *E. coli* с углеводофосфатным остовом ДНК. Для этого проводили зондирование активного центра фермента с помощью набора аналогов субстратов, содержащих в своей структуре одновременно остаток 8-ОГ и тризамещенные пирофосфатные межнуклеотидные группы в раз-

личных положениях по отношению к нему. Модифицированные ДНК-дуплексы, содержащие реакционноспособные тризамещенные пирофосфатные группы, предложенные нами ранее, успешно используются в настоящее время в качестве эффективных аффинных реагентов для кросслинкинга с ДНК-узнающими белками, поскольку реакционноспособные межнуклеотидные группы в этих соединениях способны образовывать специфические ковалентные комплексы с нуклеофильными аминокислотами белков, сближенными с ними в составе фермент-субстратного комплекса [11–14].

В работе синтезированы модифицированные ДНК-дуплексы, содержащие остаток 8-ОГ и тризамещенные пирофосфатные межнуклеотидные группы, исследовано их взаимодействие с Fpg *E. coli* и определены константы диссоциации ДНК-белковых комплексов.

Исследовано каталитическое расщепление этих соединений Fpg и найдены новые негидролизующие аналоги субстратов этого фермента.

Подобраны оптимальные условия для ковалентного связывания реакционноспособных ДНК-дуплексов с белком, получены специфические ковалентные ДНК-белковые комплексы.

Определены специфические контакты нуклеофильных аминокислот Fpg *E. coli* с фосфатными группами ДНК в составе фермент-субстратного комплекса.

*Адресат для переписки.

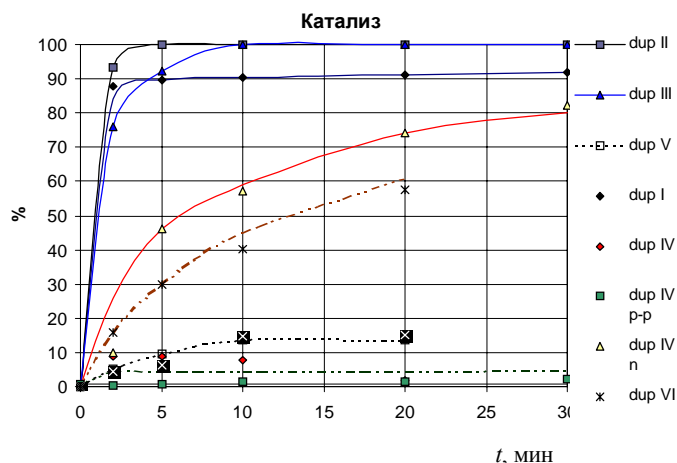


Рис. 2. Зависимость степени расщепления аналогов субстратов Frg *E. coli* от времени инкубации с ферментом

только активные молекулы белка, то нами предварительно была определена концентрация активных молекул Frg *E. coli*. Для этого мы использовали метод Скэтчарда [17].

Связывание Frg *E. coli* с модифицированными ДНК-дуплексами (I)–(VI) проводили в буфере Д при температуре 0° в течение 5 мин. В качестве примера на рис. 1 представлен радиоавтограф нативного гель-электрофореза, полученный при связывании ДНК-дуплекса (II) с ферментом. Как видно из этого рисунка, с увеличением концентрации белка эффективность связывания увеличивается, а при концентрации 1,5 нМ происходит полное связывание модифицированного субстрата.

Оказалось, что все синтезированные ДНК-дуплексы (I)–(VI), содержащие тризамещенные пирофосфатные группы, а также дуплекс (IVa), содержащий стабильную дизамещенную пирофосфатную группу, эффективно связываются с ферментом. Известно, что введение пирофосфатных группировок в структуру природных субстратов может изменять эффективность их связывания с ферментами. Так, эффективность связывания урацил-ДНК гликозилазы с ДНК-дуплексом, содержащим дизамещенную пирофосфатную группу с 3'-конца по отношению к остатку дезоксиуридина, была на 4 порядка ниже, чем с аналогичными субстратами природного строения [18]. В то же время введение этой модифицированной группы в структуру аналога субстрата Frg (ДНК-дуплекс (IVa)) непосредственно с 3'-конца от 8-OG хотя и приводило к уменьшению эффективности связывания, но значительно

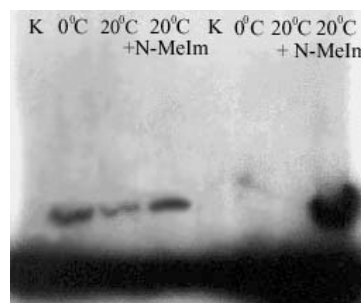


Рис. 3. Радиоавтограф 12% SDS-ПААГ, иллюстрирующий связывание ДНК-дуплексов (III) и (IV) с ферментом в оптимальных условиях

в меньшей степени (табл. 2). Специфичность связывания Frg с модифицированными ДНК-дуплексами была подтверждена методом конкурентного вытеснения избытком холодного субстрата. Константы диссоциации комплексов аналогов субстратов (I)–(VI) с белком приведены в табл. 2. Они были рассчитаны как описано в работе [19]. Как видно из табл. 2, эффективность связывания зависела от положения модифицированной межнуклеотидной группы и ее природы. Так, введение тризамещенной пирофосфатной группы с 3'-конца от остатка 8-OG и через одно звено от него (дуплексы (IV) и (V)) значительно уменьшало эффективность связывания с ферментом по сравнению с эффективностью связывания природного субстрата (IVn). Введение модификации с 5'-конца от 8-OG (дуплексы (II) и (III)) также приводило к уменьшению эффективности связывания, однако в меньшей степени, чем для дуплексов (IV) и (V). Эти данные свидетельствуют о том, что межнуклеотидные фосфаты с 3'-конца от остатка 8-OG играют особую роль в узнавании и связывании Frg с ДНК. В случае ДНК-дуплекса (IVa), когда с 3'-конца от 8-OG находилась дизамещенная пирофосфатная группа, т.е. при введении дополнительного отрицательного заряда, значение константы увеличивалось (от 3,1 нМ для дуплекса (IV) до 4,1 нМ для дуплекса (IVa)), что свидетельствует о том, что такие субстраты хуже узнаются белком и связываются с ним. По мере удаления модифицированных межнуклеотидных групп от остатка 8-OG значение константы диссоциации уменьшалось.

Каталитическое расщепление модифицированных ДНК-дуплексов Frg *E. coli*.

Каталитическое расщепление модифицированных ДНК-дуплексов ферментом Frg *E. coli* проводили, как описано

Таблица 2

Константы диссоциации аналогов субстратов Frg *E. coli*

Номер дуплекса	(I)	(II)	(III)	(IV)	(IVa)	(IVn)	(V)	(VI)
Kd, нМ	0,19±0,04	0,72±0,14	1,0±0,2	3,1±0,6	4,1±0,8	0,35±0,07	1,1±0,2	0,38±0,08

в [20]. На рис. 2 представлены кривые зависимости доли расщепленных ДНК-дуплексов (I)–(VI), (IVa) и (IVn) от времени инкубации с белком. Оказалось, что все дуплексы, за исключением дуплексов (IV) и (IVa), расщепляются ферментом. Эффективность расщепления зависела от положения модифицированной группы и была выше, когда тризамещенная группировка находилась с 5'-конца от остатка 8-OG. Так, дуплексы (I)–(III) расщеплялись ферментом даже более эффективно, чем природный субстрат (IVn). Это может быть связано с тонкими конформационными изменениями в структуре этих субстратов, способствующими ускорению каталитического процесса.

В то же самое время дуплекс (IVa), содержащий стабильную дизамещенную пирофосфатную группу с 3'-конца от остатка 8-OG (как и дуплекс IV, содержащий реакционноспособную тризамещенную пирофосфатную группу с 3'-конца от остатка 8-OG), не расщеплялся ферментом. Известно, что механизм каталитического выщепления остатков 8-OG ферментом Fpg *E. coli* включает расщепление фосфодиэфирных связей с 3'- и 5'-концов от остатка 2'-дезоксирибозы, образующейся в результате дегликозилирования, по механизму последовательного β - δ -элиминирования [21]. На основании полученных данных можно предположить, что Fpg *E. coli* не расщепляет ДНК-дуплексы (IV) и (IVa), поскольку модифицированная межнуклеотидная группа, расположенная с 3'-конца от 8-OG, препятствует β -элиминированию. Таким образом, мы обнаружили, что дуплексы (IV) и (IVa) – негидролизуемые аналоги субстратов Fpg *E. coli*. Эти соединения являются наиболее близкими к физиологическим субстратам структурными аналогами Fpg и могут быть использованы для рентгеноструктурного анализа ДНК-белкового комплекса.

Региоспецифическое ковалентное связывание реакционноспособных аналогов субстратов с Fpg *E. coli*

Региоспецифическое ковалентное связывание Fpg *E. coli* с ДНК-дуплексами (I)–(VI) изучали в условиях, подобранных нами в экспериментах по нековалентному связыванию. Реакционноспособные аналоги субстратов выдерживали с ферментом в буфере Д, варьируя температуру и время инкубации. В работе [11] было показано, что в присутствии N-метилимидазола эффективность ковалентного связывания может возрастать за счет N-метилимидазольного катализа, поэтому реакцию проводили в присутствии N-метилимидазола.

Оказалось, что специфический кросслинкинг наблюдается только в случае ДНК-дуплексов (III) и (IV), содержащих тризамещенные пирофосфатные группы с 5'- и 3'-концов от остатка 8-OG соответственно. Максимальная эффективность связывания (30%) наблюдалась в случае дуплекса (IV) при температуре 20° в присутствии 0,05 М N-метилимидазола (рис. 3). С меньшей эффективностью ковалентно связывался с ферментом дуплекс (III) (10%). Образование ковалентных комплексов аналогов субстратов (III) и (IV) с Fpg *E. coli* является прямым экспери-

ментальным доказательством сближенности нуклеофильных групп аминокислот белка, формирующих активный центр Fpg, с межнуклеотидными фосфатами с 3'- и 5'-концов от 8-OG в ДНК.

Таким образом, в настоящей работе впервые было проведено зондирование активного центра Fpg *E. coli* с помощью набора синтетических ДНК-дуплексов, содержащих реакционноспособные тризамещенные пирофосфатные группировки в различных положениях от остатка 8-OG.

В ходе работы было установлено наличие контактов фосфатных групп субстрата, расположенных с 3'- и с 5'-конца от остатка 8-OG, с нуклеофильными группами аминокислот фермента Fpg *E. coli*, в составе фермент-субстратного комплекса. В продолжение этих исследований планируется идентифицировать природу аминокислот, вовлеченных в специфические взаимодействия с фосфатными группами ДНК. Результаты исследования могут быть использованы при изучении про- и эукариотических гомологов Fpg, а также других репарирующих ферментов. В совокупности с результатами других исследований они позволяют пополнить знания о механизмах репарации ДНК.

Экспериментальная часть

В работе использовали КДИ, МЭС, ЭДА («Merck»), EDTA, LiClO₄ («Fluka»); акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, KCl («Serva»); HEPES, MgCl₂ («Sigma»); полинуклеотидкиназу T4 (МБИ «Ферментас»); [γ -³²P] АТФ (1000 Ки/ммоль; «Изон»). Вода очищена на системе лабораторной очистки «Millipore».

5'-³²P-метку вводили фосфорилированием олигонуклеотидов (2, 4, 6, 8, 10 и 12) с помощью T4-полинуклеотидкиназы.

Олигодезоксирибонуклеотиды природного строения, использованные в работе, были синтезированы на автоматическом ДНК-синтезаторе «Applied Biosystems 380B» (США) по стандартной амидофосфитной схеме [15]. Синтез модифицированных олигонуклеотидов с включением остатков 7,8-дигидро-8-оксогуанина был осуществлен с использованием коммерческого 3'-амидофосфитного производного модифицированного 2'-дезоксигуанозина («Glen Research»). Деблокирование функциональных групп олигомеров проводили концентрированным аммиаком в присутствии 0,25 М 2-меркаптоэтанола (36 ч, 20°). Синтез олигонуклеотидов с 3'-алкилфосфатной группой проводили с использованием предварительно синтезированного модифицированного твердофазного носителя для автоматического олигонуклеотидного синтеза, как описано нами ранее [23].

Фермент формамидопиримидин-ДНК гликозилаза *E. coli* предоставлен для работы доктором Ж. Лавалем (Институт Густава Русси, Париж, Франция).

Буферные растворы: А – 0,05 М МЭС (рН 6,0), 0,02 М MgCl₂; Б – 0,5 М МЭС (рН 4,5), 1М MgCl₂; В – 0,05 М Трис-борат (рН 8,5), 0,001 М EDTA; Г – 0,4 М N-MeIm (рН 8,0), 0,2 М NaCl, 0,12 М MgCl₂; Д – 0,025 М HEPES

(рН 7,6), 0,1 М КСl, 0,005 М β -меркаптоэтанол, 0,002 М Na_2EDTA , 0,1% (w/v) BSA, 6% (v/v) глицерин; Е – 0,089 М Трис-борат (рН 8,5) (Ж), 0,025М Трис (рН 8,3), 0,2 М глицин, 0,1% SDS.

Получение модифицированных ДНК-дуплексов методом химического лигирования. К 0,15 о.е. исходных дуплексов (I)–(VI) в 14 мкл буфера А (общенуклеотидная концентрация C_0 составила 10^{-3} М) добавляли 1 мкл 3 М КДИ (конечная концентрация КДИ составила 0,2 М). Реакцию проводили в течение 3–4 сут при 20° в темноте, затем анализировали реакционные смеси с помощью электрофореза в пластинах 20%-го ПААГ, содержащего 7 М мочевины, в буфере В при постоянном напряжении 1200 В с последующей радиоавтографией. Выходы продуктов химического лигирования в дуплексах I–VI варьировали от 12 до 90%.

Аминолиз и гидролиз ДНК-дуплексов (I)–(VI). 0,1–0,5 нмоль дуплексов выдерживали в 0,5 М водном растворе ЭДА (рН 8,0) или в буфере Г при 20° в течение 20 ч. Реакционные смеси анализировали гель-электрофорезом, как описано выше.

Определение активности Frg E. coli методом Скэтчарда. Для определения концентрации активных молекул Frg методом Скэтчарда изучали связывание 5–20 фмоль ДНК-дуплекса (IVn) с 4 нМ фермента в 20 мкл буфера Д при температуре 0° в течение 5 мин. Метод расчета активности фермента из полученных данных описан в [17].

Работа выполнена в рамках гранта INTAS (№ 97–1645) при поддержке РФФИ (№ 00–04–48253), а также гранта Ведущие научные школы (№ 00–15–97944).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang Q.-M., Ishicawa N., Nakahara T., Yonei S. // *Nucleic Acids Res.* 1998. **26**. P. 4669.
- Lipinski L.J., Hoehr N., Mazur S.J., Dianov G.L., Senturker S., Dizdaroglu M., Bohr V.A. // *Nucleic Acids Res.* 1999. **27**. P. 3153.
- Tano K., Akasaka S., Hashimoto M., Asano M., Yamamoto K., Utsumi H., Takimoto K. // *Mutat. Res.* 1998. **420**. P. 7.
- Alhama J., Ruiz-Laguna J., Rodriguez-Ariza A., Toribio F., Lopez-Barea J., Pueyo C. // *Mutagenesis.* 1998. **13**. P. 589.
- Boiteux S., O'Connor T.R., Laval J. // *EMBO J.* 1987. **6**. P. 3177.
- Bailly V., Verly W.G., O'Connor T.R., Laval J. // *Biochem. J.* 1989. **262**. P. 581.
- Menissier-de Murcia J., Molinete M., Gradwohl G., Simonin F., Murcia G.de // *J. Mol. Biol.* 1989. **210**. P. 229.
- Mazen A., Menissier-de Murcia J., Molinete M., Simonin F., Gradwohl G., Poirer G., Murcia G. de // *Nucleic Acids Res.* 1989. **17**. P. 4689.
- Angulo J.F., Rouer E., Mazin A., Tissier A., Horellou P., Benarous R., Devoret R. // *Nucleic Acids Res.* 1991. **19**. P. 5117.
- Navaratham S., Myles G.M., Strange R.W., Sancar A. // *J. Biol. Chem.* 1989. **264**. P. 16067.
- Purmal A.A., Shabarova Z.A. // *Nucl. Acids Res.* 1992. **20**. C. 3713.
- Kuznetsova S.A., Catherine C., Edgardo U., Elias I., Vasseur M., Blumenfeld M., Shabarova Z.A. // *Nucl. Acids Res.* 1996. **24**. P. 4783.
- Ивановская М.Г., Козлов И.А., Кубарева Е.А., Таран Е.А., Саразев Т.В., Шабарова З.А. // *Мол. биол.* 1997. **31**. С. 435.
- Кузнецова С.А., Ивановская М.Г., Шабарова З.А. // *Биоорг. Химия.* 1990. **16**. С. 219.
- Matteucci M.D., Caruthers M.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 1981. **103**. P. 3185.
- Кузнецова С.А., Ивановская М.Г., Шабарова З.А. // *Биоорг. химия.* 1991. **17**. С. 1633.
- Shilov I., Tashlitsky V., Khodoun M., Vasil'ev S., Alekseev Y., Kuzubov A., Kubareva E., Karyagina A. // *Nucl. Acids Res.* 1998. **26**. P. 2659.
- Purmal A.A., Wallace S.S., Kow Y.W. // *Biochemistry.* 1996. **35**. P. 16630.
- Castaing B., Boiteux S., Zelwer C. // *Nucleic Acids Res.* 1992. **20**. P. 389.
- Castaing B., Geiger A., Seliger H., Nehls P., Laval J., Zelwer C., Boiteux S. // *Nucleic Acids Res.* 1993. **21**. P. 2899.
- Bhagwat M., Gerlt J.A. // *Biochemistry.* 1996. **35**. P. 659.
- Долинная Н.Г., Громова Е.С., Михайлов С.Н., Шабарова З.А. // *Биоорг. химия.* 1978. **4**. С. 535.
- Нарышкин Н.А., Ивановская М.Г., Орецкая Т.С., Волков Е.М., Гейт М.Дж., Шабарова З.А. // *Биоорг. химия.* 1996. **22**. С. 691.

Поступила в редакцию 20.06.00