

УДК 577.151.02/45

Н. А. Тимофеева¹, В. В. Коваль^{1,2}, О. С. Федорова^{1,2}¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
просп. Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия² Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия
E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru**КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТА APE1
В ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ***

Исследована динамика конформационных превращений и кинетический механизм действия апуриновой-апириимидиновой (AP) эндонуклеазы человека (APE1) в процессе эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER). Установлено, что действие данного фермента описывается кинетической схемой, которая содержит четыре стадии, соответствующие формированию начального фермент-субстратного комплекса, изомеризации данного комплекса, необратимой каталитической стадии и равновесной стадии диссоциации комплекса фермента с продуктом. Наличие стадии изомеризации начального фермент-субстратного комплекса показывает, что структура фермента APE1 не является слишком жесткой, как это ранее предполагалось в литературе.

Ключевые слова: репарация ДНК, апуриновая-апириимидиновая эндонуклеаза человека.

Клетки живых организмов постоянно подвергаются воздействию ионизирующего и ультрафиолетового излучения, действию различных химических мутагенов. Кроме того, в процессах метаболизма в клетках образуются активные формы кислорода (АФК) в виде радикалов O_2^- и OH , а также молекул синглетного кислорода и пероксида водорода. Все это вызывает различные повреждения клеточной ДНК, приводящие к гибели клетки, раковым и аутоиммунным заболеваниям, ускоряет процессы старения. Для защиты генетической информации в клетках всех живых организмов существуют системы репарации, направленные на исправление повреждений ДНК. Основную роль в удалении поврежденных азотистых оснований ДНК играет механизм BER [1]. Данный путь репарации начинается с действия ДНК-гликозилаз – ферментов, удаляющих поврежденные или неправильно спаренные основания с образованием апуриновых-апириимидиновых сайтов (AP-сайтов). Эти сайты могут образовываться под действием урацил-ДНК-гликозилаз, удаляющих Т и U напротив G. Кроме того человеческая аденин-ДНК-гликозилаза (hMUN) удаляет А из А / G-пары. AP-сайты возникают также в результате спонтанной потери

оснований (в основном пуринов) [1–3]. AP-сайты могут блокировать ДНК-репликацию и транскрипцию. В случае, когда репликация все же идет, во вновь синтезируемой цепи ДНК напротив AP-сайта встраивается преимущественно аденозин [4], что приводит к однонуклеотидным заменам в ДНК. Альдегидная группа AP-сайта может вступать в реакцию со многими клеточными белками [5]. В процессе BER ДНК расщепляется с 5'-конца AP-сайта с помощью апуриновых-апириимидиновых эндонуклеаз (AP-эндонуклеаз). В организме человека основной AP-эндонуклеазой является белок APE1 (35,5 кДа) [6]. Кроме AP-эндонуклеазной активности данный белок проявляет и другие ферментативные активности: 3' → 5'-экзонуклеазную, фосфодиэстеразную, 3'-фосфатазную, активность РНКазы H. Эти дополнительные активности на 3–4 порядка слабее AP-эндонуклеазной активности. Помимо этого, данный фермент удаляет неправильно спаренные нуклеотиды с 3'-конца ДНК [7]. Недавно было показано, что APE1 может удалять некоторые поврежденные основания ДНК независимо от участия ДНК-гликозилаз [8].

Ранее было проведено исследование стационарной кинетики ферментативного про-

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 07-04-00191-а), Роснауки (проект № 02.512.11.2194), интеграционного проекта СО РАН (№ 60) и гранта Президента РФ (НШ-652.2008.4).

цесса разрезания ДНК, содержащей AP-сайт, ферментом APE1 [9], получены значения кинетических параметров, соответствующих схеме Михаэлиса – Ментен: k_{cat} и K_M . С помощью рентгеноструктурного анализа получены структуры свободного фермента [10] и его комплекса с ДНК, содержащей AP-сайт [11]. Сделан вывод о том, что структура фермента APE1 является жесткой и предформирована для узнавания и связывания ДНК-субстрата.

Целью работы являлось исследование кинетического механизма взаимодействия AP-эндонуклеазы человека APE1 с ДНК-субстратом, содержащем AP-сайт, в стационарных условиях методом «остановленной струи» с регистрацией конформационных превращений молекулы фермента в ходе каталитического цикла и сравнение с процессом связывания неповрежденной ДНК.

Материал и методы

Дезоксирибоолигонуклеотиды (ATGCA-CATCGTCTACATGCGTATGCAGTCA), d (TGACTGCATA X GCATGTAGACGATGTGCAT) ($X = C$ или U), d (TGACTGCATA) и pd (FGCATGTAGACGATGTGCAT) были синтезированы в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в лаборатории бионанотехнологии стандартным фосфитамидным методом и очищены с помощью анионообменной и обращеннофазовой ВЭЖХ. Концентрации одноцепочечных дезоксирибоолигонуклеотидов определяли спектрофотометрически по методу «ближайших соседей». Для получения AP-сайта олигонуклеотид d (TGACTGCAT-AUGCATGTAGACGATGTGCAT) обрабатывали урацил-ДНК-гликозилазой [12]. На 5'-конец олигонуклеотида d (TGACTGCATA (AP) GCATGTAGACGATGTGCAT) вводили метку ^{32}P согласно стандартной методике [13] с использованием T4-полинуклеотид киназы (10–20 ед., «СибЭнзим», Россия) и $[\gamma\text{-}^{32}P]$ АТФ («Биосан», Россия). Структуры олигонуклеотидных дуплексов представлены на рис. 1. Тридцатизвенный ДНК-субстрат, содержащий остаток C в положении X, является неспецифическим и не расщепляется ферментом APE1.

Фермент APE1 выделяли из клеток *E. coli* и очищали, как описано ранее [8].



а



б

Рис. 1. Дезоксирибоолигонуклеотиды, использованные в экспериментах:

а – специфический и неспецифический субстраты ($X = C$ или AP); б – модельный продукт расщепления ДНК: (F = остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофурана)

Максимумы в спектрах поглощения и испускания флуоресценции остатков триптофана белка APE1 определяли на спектрофлуориметре SFM 25 («Kontron Instruments», Италия). Их значения составили $\lambda_{ex} = 281$ и $\lambda_{em} = 330$ нм.

Для исследования стационарной кинетики взаимодействия фермента APE1 со специфическим и неспецифическим ДНК-субстратами использовали метод «остановленной струи». Кинетические кривые регистрировали при 25 °C на спектрометре остановленной струи SX.18MV («Applied Photophysics», Англия) с детекцией флуоресценции остатков триптофана белка. Флуоресценцию наблюдали на длинах волн более 320 нм, используя светофильтр Schott WG320. Мертвое время прибора составляло 1,37 мс; во всех расчетах использовались данные, полученные при времени ≥ 2 мс. Реакцию проводили в условиях «одного оборота фермента» в буфере BER (20 mM HEPES / KOH pH 7,5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂), концентрация APE1 в реакционной ячейке была 1 мкМ, концентрация олигонуклеотидных субстратов варьировалась в пределах 0,5–3,0 мкМ. Каждая представленная кинетическая кривая являлась результатом усреднения четырех или более экспериментальных кривых.

Полученные данные обрабатывали методом нелинейной регрессии, используя программный пакет DynaFit («BioKin», США) [14].

Для определения сродства APE1 к продукту реакции фермент в стационарных условиях титровали комплексом дезоксирибоолигонуклеотидов, моделирующим продукты расщепления ДНК. Смесь выдерживали 10 мин при 25 °C в буфере BER.

Константу диссоциации (K_p) рассчитывали из зависимости интенсивности флуоресценции фермента F от концентрации продукта L с помощью уравнений:

$$K_p = \frac{[L][E]}{[EL]};$$

$$F = f_E \times [E] + f_{EL} \times [EL];$$

$$f_E = F_0 / [E]_0; f_{EL} = F_{lim} / [E]_0.$$

Откуда

$$F = f_{EL}[E]_0 + (f_E - f_{EL}) \times \left\{ \frac{[E]_0 - [L]_0 - K_p}{2} + \sqrt{\left(\frac{[E]_0 - [L]_0 - K_p}{2} \right)^2 + K_p[E]_0} \right\},$$

где F_0 , F_{lim} представляют собой интенсивности флуоресценции при $[L] = 0$ и насыщающих концентрациях лиганда соответственно; f_E и f_{EL} – удельные интенсивности собственной флуоресценции свободного фермента и комплекса; $[L]_0$ и $[E]_0$ – суммарные концентрации олигонуклеотидного лиганда и белка соответственно; $[L]$, $[E]$ и $[EL]$ – концентрации свободного лиганда, фермента и их комплекса соответственно.

Зависимость степени расщепления ферментом специфического субстрата, меченого по 5'-концу, от времени получали при следующих концентрациях: APE1 – 1 мкМ, субстрат – 0,75, 1 и 1,25 мкМ. Реакцию проводили в буфере BER при 25 °С. Продукты расщепления разделяли в 20 % ПААГ. Гели сушили и экспонировали на рентгеновскую пленку CP-BU («Agfa-Geavert», Бельгия).

Результаты исследования и обсуждение

Взаимодействие APE1 с неспецифическим С-лигандом приводило к образованию фермент-субстратного комплекса, однако расщепления ДНК не происходило. При связывании APE1 с С-лигандом на отрезке времени от 0 до 20 мс наблюдалось падение интенсивности флуоресценции белка (рис. 2, а). При времени, превышающем 30 мс, интенсивность флуоресценции не-

много увеличивалась, и кривые выходили на плато. По-видимому, падение интенсивности флуоресценции отражало образование неспецифического диффузионного комплекса, который является результатом столкновений взаимодействующих молекул в растворе. Мы полагаем, что дальнейшее возрастание флуоресценции соответствует изомеризации столкновительного комплекса с образованием второго комплекса белка с ДНК, при этом фермент меняет свою конформацию. Таким образом, взаимодействие фермента APE1 с неспецифическим С-лигандом в условиях BER может быть представлено следующей схемой:



После обработки кинетических кривых в соответствии со схемой были получены значения констант скорости взаимодействия APE1 с С-лигандом (табл.).

Взаимодействие APE1 со специфическим AP-субстратом приводило к более существенным изменениям в интенсивности флуоресценции на кинетических кривых, чем в случае С-субстрата (рис. 2, б). Интенсивность флуоресценции падала до времени ~ 40 мс, причем на данном участке кинетических кривых наблюдался перегиб, отражающий существование двух равновесных стадий: связывания и изомеризации. Затем наблюдался небольшой рост, и кинетические кривые выходили на плато.

Для подтверждения существования двух начальных равновесных стадий кривые обрабатывались по схеме, содержащей как одну стадию связывания, так и две. Поскольку величины стандартных отклонений для двухстадийной схемы были меньше по величине, чем для одностадийной, то это позволило заключить, что вторая стадия (стадия изомеризации) действительно присутствует. Для примера представлены стандартные отклонения, полученные при обработке кривой для 0,5 мкМ субстрата (см. рис. 2, б).

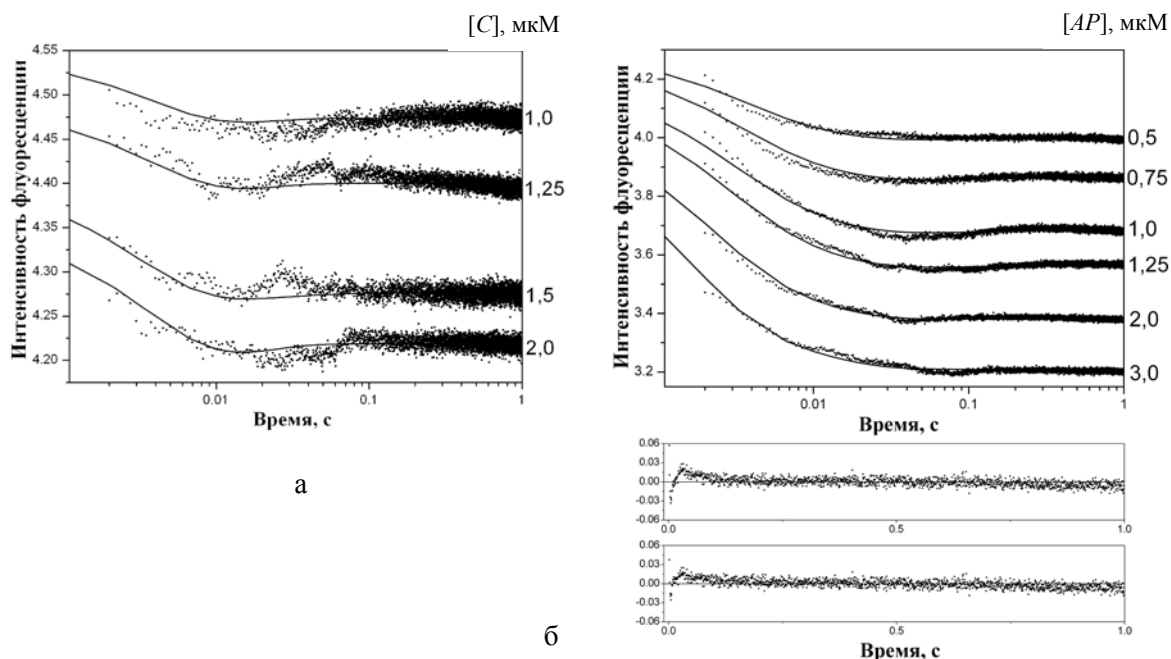


Рис. 2. Кинетические кривые взаимодействия APE1 с неспецифическим С-лигандом (а) и специфическим AP-субстратом (б).

Точки представляют собой экспериментальные данные, плавные кривые теоретически подогнаны. Концентрации субстратов указаны справа по оси Y. Данные представлены без корректировки фона, чтобы избежать наложения отдельных участков кривых друг на друга. Под кинетическими кривыми для AP-субстрата (б) приведены стандартные отклонения для следующих случаев: образование фермент-субстратного комплекса описывалось одной экспонентой (средний график); образование фермент-субстратного комплекса описывалось двумя экспонентами (нижний график). Отклонения показаны для кривой, полученной при концентрации субстрата 0,5 мкМ

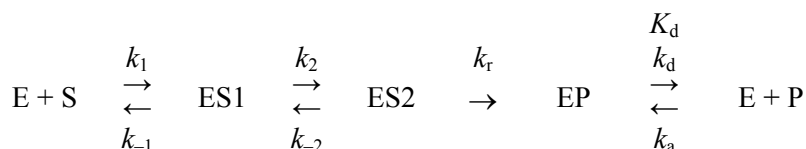
Константы скорости и равновесные константы взаимодействия APE1 с неспецифическим С-лигандом и со специфическим AP-субстратом

Константы скорости и равновесные константы	С-лиганд	AP-субстрат
$k_1, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$1,05 \pm 0,01 \times 10^7$	$1,76 \pm 0,03 \times 10^8$
k_{-1}, c^{-1}	204 ± 1	116 ± 2
k_2, c^{-1}	$16,4 \pm 0,1$	$18,4 \pm 0,7$
k_{-2}, c^{-1}	$79,8 \pm 0,3$	$32,4 \pm 0,5$
k_r, c^{-1}		$96,8 \pm 0,7$
K_D, M		$6,86 \pm 0,03 \times 10^{-7}$
K_p (из титрования), M		$4,77 \pm 2,23 \times 10^{-7}$
K_M, M^*		$6,45 \times 10^{-7}$
$k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}^*$		12,1

Примечание: * – константы рассчитаны как $K_M = (k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_r + k_2k_r) / k_1(k_2 + k_{-2} + k_r)$; $k_{\text{cat}} = k_2k_r / (k_2 + k_{-2} + k_r)$.

Полная схема взаимодействия APE1 со специфическим AP-субстратом включает две обратимые стадии (стадию образования столкновительного комплекса и стадию его изомеризации), необратимую химическую стадию расщепления субстрата и обратимую стадию диссоциации комплекса фер-

мента с продуктом. Схема может быть представлена следующим образом: изомеризации), необратимую химическую стадию расщепления субстрата и обратимую стадию диссоциации комплекса фермента с продуктом. Схема может быть представлена следующим образом:



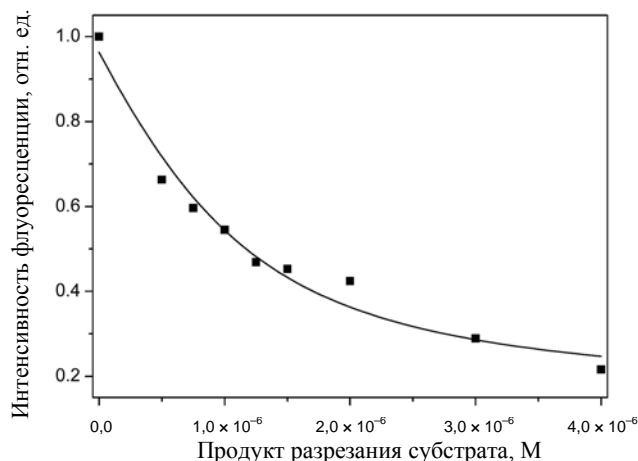


Рис. 3. Флуоресцентное титрование APE1 модельным продуктом расщепления, содержащим остаток (F) на 5'-конце разрыва. Концентрация фермента составляла 1 мкМ

Наличие стадии изомеризации свидетельствует о том, что при связывании с субстратом структура фермента APE1 меняется. Эти данные не согласуются со сделанным ранее (на основании сравнения кристаллических структура фермента и его комплекса с AP-субстратом) выводом о том, что APE1 имеет жесткую, предформированную структуру для изгибания спирали ДНК и связывания AP-сайта [11]. Действительно, кристаллические структуры свободного APE1 и фермента, связанного с ДНК, могут быть практически одинаковыми, но структура белка может проходить через промежуточное состояние во время изгибания ДНК и связывания AP-сайта.

Начальный специфический комплекс образуется более чем на порядок быстрее неспецифического комплекса (см. табл.). Стабильность комплекса с AP-субстратом также примерно на порядок выше, чем комплекса с С-лигандом. Изомеризация комплекса APE1 с AP-субстратом происходит примерно с той же скоростью, что и изомеризация неспецифического комплекса, но специфический комплекс ES2 почти в три раза более стабилен, чем неспецифический.

Эксперименты с радиоактивно меченым AP-субстратом и анализом скорости образования продукта методом гель-электрофореза в ПААГ показали, что в условиях BER при концентрациях, использовавшихся в экспериментах по исследованию предстационарной кинетики, фермент APE1 расщепляет данный субстрат полностью в первой же детектированной точке (~ 10 с; данные не представлены).

После завершения реакции APE1 со специфическим AP-субстратом интенсивности флуоресценции не возвращаются к своим начальным значениям, а стабилизируются на более низких уровнях (см. рис. 2, б). Это свидетельствует об установлении равновесия между комплексом фермент-продукт и свободными ферментом и продуктом. Для независимого определения K_p было проведено флуоресцентное титрование фермента (см. табл.). Продукт реакции, содержащий AP-сайт на 5'-конце разрыва, должен быть химически очень нестабильным [15]. Поэтому для воссоздания продукта реакции использовались три олигонуклеотида с остатком 2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофурана (F) на 5'-конце разрыва (см. рис. 1, б). Для того чтобы убедиться, что данные олигонуклеотиды формируют ожидаемую структуру, была определена температура плавления олигонуклеотидного комплекса. Она оказалась равной 56°C , поэтому данный комплекс при температуре реакции 25°C должен быть стабилен. Фермент APE1 титровали данным комплексом и регистрировали изменения интенсивности флуоресценции фермента (рис. 3). Найденное значение K_p (477 ± 223 нМ) согласуется со значением K_p , полученным из кинетических кривых (686 ± 3 нМ; см. табл.).

Заключение

Методом остановленной струи с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции остатков триптофана и методом

флуоресцентного титрования изучена конформационная динамика и предстационарная кинетика взаимодействия фермента APE1 с ДНК-субстратом в условиях процесса BER. Получены значения констант скорости и равновесия, входящие в кинетические схемы. Проведено сравнение взаимодействия APE1 со специфическим и неспецифическим субстратами. Показано, что при связывании с обоими субстратами происходит изомеризация фермент-субстратного комплекса. Таким образом, структура фермента APE1 изменяется при связывании ДНК-субстрата и расщеплении ДНК, содержащей AP-сайт.

Список литературы

1. Gros L. et al. Enzymology of the repair of free radicals induced DNA damage / L. Gros, M. K. Sagarbaev, J. Laval // *Oncogene*. 2002. Vol. 21. P. 8905–8925.
2. Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // *Biochemistry*. 1972. Vol. 11. P. 3610–3618.
3. Burrows C. J., Muller J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission // *Chem. Rev.* 1998. Vol. 98. P. 1109–1151.
4. Boiteux S., Laval J. Coding properties of poly (deoxycytidylic acid) templates containing uracil or apyrimidinic sites: in vitro modulation of mutagenesis by deoxyribonucleic acid repair enzymes // *Biochemistry*. 1982. Vol. 21. P. 6746–6751.
5. Proteomic approach to identification of proteins reactive for abasic sites in DNA / R. A. Rieger, E. I. Zaika, W. Xie et al. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2006. Vol. 5. P. 858–867.
6. Incision activity of human apurinic endonuclease (Ape) at abasic site analogs in DNA / D. M. Wilson, M. Takashita, A. P. Grolman et al. // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 16002–16007.
7. Chou K. M., Cheng Y. C. An exonucleolytic activity of human apurinic / apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA // *Nature*. 2002. Vol. 415. P. 655–659.
8. The major human AP endonuclease (APE1) is involved in the nucleotide incision repair pathway / L. Gros, A. A. Ishchenko, H. Ide et al. // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32. P. 73–81.
9. Substrate binding by human apurinic / apyrimidinic endonuclease indicates a briggs-haldane mechanism / P. R. Strauss, W. A. Beard, T. A. Patterson et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 1302–1307.
10. The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites / M. A. Gorman, S. Morera, D. G. Rothwell et al. // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. P. 6548–6558.
11. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination / C. D. Mol, T. Izumi, S. Mitra et al. // *Nature*. 2000. Vol. 403. P. 451–456.
12. Bhagwat M., Gerlt J. A. 3'- and 5'-strand cleavage reactions catalyzed by the Fpg protein from *Escherichia coli* occur via successive β - and δ -elimination mechanisms, respectively // *Biochemistry*. 1996. Vol. 35. P. 659–665.
13. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. N. Y., 2001.
14. Kuzmic P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase // *Anal. Biochem.* 1996. Vol. 237. P. 260–273.
15. Bailly V., Verly W. G. The multiple activities of *Escherichia coli* endonuclease IV and the extreme lability of 5'-terminal base-free deoxyribose 5-phosphates // *Biochem. J.* 1989. Vol. 259. P. 761–768.

Материал поступил в редколлегию 21.11.2007

N. A. Timofeeva, V. V. Koval, O. S. Fyodorova

Kinetic Mechanism of APE1 Enzyme in Base Excision Repair

Conformational dynamics and kinetic mechanism of action of human AP endonuclease (APE1) in base excision repair were studied. The action of this enzyme was established to be described by the kinetic scheme, containing four stages corresponding to formation of the initial enzyme-substrate complex, its isomerisation, irreversible catalytic conversion and the equilibrium stage of product release. The existence of stage of the initial enzyme-substrate complex isomerisation gave evidence, that APE1 didn't have a rigid, pre-formed structure to bind the AP-DNA strand and to kink the DNA helix as it was earlier suggested in the literature.

Keywords: DNA repair, human AP endonuclease.