

Кладова Ольга Алексеевна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Кинетический механизм конформационной подстройки и
функциональная роль аминокислот активных центров ферментов,
входящих в структурные семейства N_hH-GPD и N₂tH

Направление подготовки

04.06.01 Химические науки

Направленность

03.01.04 Биохимия

Новосибирск – 2018

1. Введение

Генетическая информация, зашифрованная в ДНК, находится под постоянной угрозой из-за способности нуклеотидов участвовать в химических превращениях, таких как окисление, алкилирование, дезаминирование и других. Повреждение азотистых оснований ДНК может повлиять на свойства комплементарной пары, что в свою очередь может привести к нарушению стабильности генома.

Окислительное повреждение компонентов клетки является следствием аэробного дыхания, в ходе которого образуются активные формы кислорода (ROS, reactive oxygen species). Они приводят к появлению, в основном, необъемных окислительных повреждений в ДНК. Поэтому все аэробные организмы обладают способностью к репарации таких окислительных повреждений. За специфическое узнавание поврежденных азотистых оснований отвечают ДНК-гликозилазы, которые инициируют ферментативный путь эксцизионной репарации оснований ДНК (BER, base excision repair). Одними из таких ферментов являются ДНК-гликозилазы Endo III и Endo VIII из *E. coli*, которые обладают субстратной специфичностью к преимущественно модифицированным пиримидиновым основаниям.

Несмотря на большой интерес к выяснению природы высокой специфичности ДНК-гликозилаз, непонятным остается вопрос, как именно ДНК гликозилазы распознают поврежденные азотистые основания среди огромного числа не поврежденных. Помимо этого, до сих пор не известна функциональная роль ряда аминокислотных остатков, расположенных в активном центре и ДНК-связывающем центре ферментов, в процессе узнавания повреждения и его последующего химического превращения.

Таким образом, основной целью работы являлось определение механизмов конформационных изменений фермента и ДНК в ходе специфического узнавания повреждений в процессах, катализируемых ДНК-гликозилазами Endo III и Endo VIII.

В задачи настоящего исследования входило:

- установление роли конформационных изменений в молекулах ферментов и ДНК-субстратов в протекании ферментативного процесса;
- определение аминокислотных остатков ферментов, участвующих на ранних стадиях связывания с ДНК-субстратами;
- установление влияния замен отдельных каталитических аминокислотных остатков на конформационную динамику ферментов и начальные стадии связывания с ДНК;
- анализ кинетических и термодинамических параметров взаимодействия ферментов с ДНК-субстратами.

Конформационные изменения в молекулах ДНК-гликозилаз в ходе ферментативного процесса регистрировались по изменению интенсивности флуоресценции аминокислотных остатков триптофана, находящихся в последовательности ферментов. Для регистрации конформационных изменений в ДНК-субстратах различной степени специфичности, использовались флуоресцентные аналоги азотистых оснований (2-аминопурин, 1,3-диаза-2-оксофеноксазин) либо FRET-пара FAM/ВНQ1. Поскольку узнавание субстратов и их превращение протекает в миллисекундном и секундном диапазонах, для регистрации конформационных изменений и смешивания растворов фермента и субстрата использовали метод остановленной струи (Stopped-flow), позволяющий смешивать образцы за 1,2 мс. Для детализации регистрируемых стадий использовался подход усложнения субстратов от неспецифического (неповрежденный ДНК-дуплекс), к специфическому (содержащему специфическое повреждение 5,6-дигидроуридин либо AP-сайт). Такой подход позволил

установить конформационные превращения характерные для специфического узнавания субстратов и катализа ферментативной реакции, а так же изменения, возникающие на ранних этапах неспецифического связывания ферментов с ДНК. Для установления роли отдельных аминокислотных остатков в процессах узнавания поврежденного азотистого основания были использованы мутантные формы фермента Endo VIII, содержащие замены аминокислотных остатков: L70S, L70W, Y71W, F121W, F230W, P253W. Для установления влияния каталитических аминокислотных остатков на конформационную динамику ферментов и ДНК были использованы мутантные формы ферментов, содержащие замены Endo III K120A, D138A и Endo VIII E2Q.

Полученные данные о конформационной динамике молекул ферментов и ДНК-субстратов совместно с известными рентгеноструктурными данными позволили предложить молекулярно-кинетическую модель взаимодействия Endo III и Endo VIII с ДНК, установить роль отдельных аминокислотных остатков в процессе ферментативного цикла, а так же определить термодинамические параметры отдельных стадий взаимодействия ферментов с ДНК.

2. Конформационные изменения структуре Endo III и ДНК в процессе их взаимодействия

На сегодняшний момент получены кристаллические структуры эндонуклеазы III из *E. coli* в свободной форме и из *G. stearotherophilus* комплексе с ДНК (Kuo et al., 1992; Fromme et al., 2003). Было показано, что под действием фермента ДНК изгибается примерно на 55° , кроме того происходит сближение С-концевого и N-концевого доменов самого фермента. Endo III образует множественные контакты как с цепью ДНК, содержащей повреждение, так и с комплементарной цепью, причем Endo III взаимодействует преимущественно с фосфатными группами, расположенными с 3' и 5' стороны от повреждения (аминокислотные остатки Gln42, Asp 45, Thr140, His141, Arg186 у фермента из *G. stearotherophilus*). Так же было показано, что, как и многие другие ДНК-гликозилазы, Endo III встраивает аминокислотные остатки внутрь ДНК-дуплекса. Помимо этого, нуклеотид, содержащий повреждение, выворачивается из двойной спирали ДНК, а поврежденное гетероциклическое основание помещается в активный центр фермента. Исходя из данных о кристаллической структуре, можно сделать вывод, что при связывании Endo III с ДНК происходят структурные перестройки в обоих биополимерах. Для регистрации возникающих конформационных изменений в структуре ДНК использовали ДНК-дуплексы, содержащие субстраты различной степени специфичности и флуорофорную группу 1,3-диаза-2-оксофеноксазина (tC^O), расположенную в комплементарной цепи напротив повреждений, либо флуорофорную группу 2-аминопурина (2-aPu), расположенную с 3' стороны от повреждения.

Взаимодействие с G-лигандом

Для регистрации конформационных изменений в ДНК, возникающих при неспецифическом связывании с Endo III, использовали ДНК-дуплексы не содержащие специфических повреждений (G-лиганд). Полученные данные приведены на рисунке 1. Интенсивность флуоресценции 2-aPu не менялась в диапазоне времени регистрации. Взаимодействие Endo III с ДНК-дуплексом, содержащим флуорофорную группу tC^O приводило к трехфазному изменению интенсивности флуоресценции. Такое изменение интенсивности флуоресценции при математической обработке в программе DynaFit соответствовало схеме, содержащей три обратимых стадии (схема 1). Рассчитанные константы скоростей прямых и обратных стадий, а так же полученные константы равновесия представлены в таблице 1.

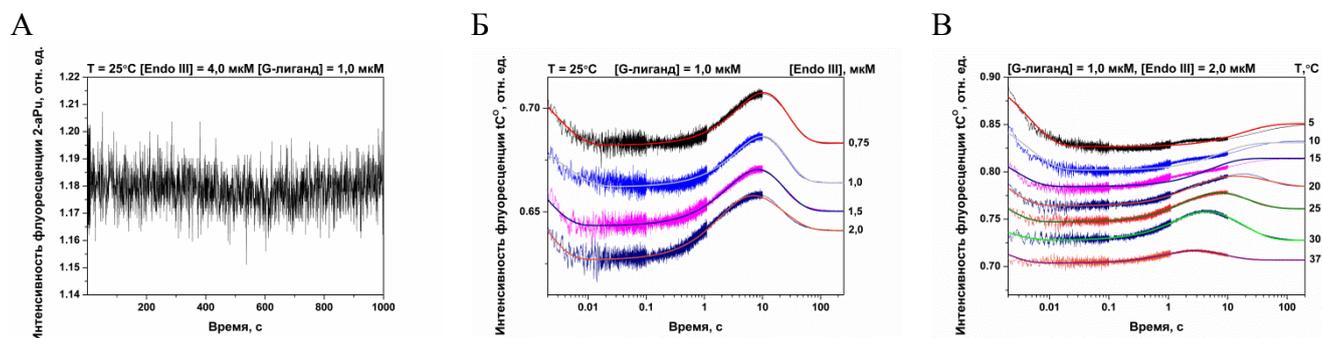
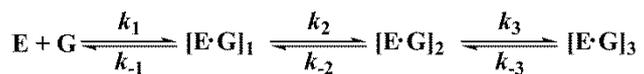


Рисунок 1. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения G-лиганда в процессе взаимодействия с Endo III (А) изменение интенсивности флуоресценции 2-aPu (Б) изменение интенсивности флуоресценции tC^O (В) изменение интенсивности флуоресценции tC^O при проведении экспериментов при различных температурах.

Схема 1



где E – фермент, G – лиганд, $[E \cdot G]_i$ – фермент-субстратный комплекс

Первое падение интенсивности флуоресценции tC^O , по-видимому, связано с изменением окружения флуорофорной группы на более гидрофобное. Данный процесс может отражать неспецифическое связывание Endo III с ДНК-дуплексом. Дальнейший рост интенсивности флуоресценции может быть связан с изменением микроокружения флуорофорной группы на более гидрофильное, и отражать этапы вклинивания аминокислотных остатков Gln41 и Leu81. Третья стадия падения интенсивности флуоресценции была зарегистрирована только для температур 20-37°C и может отражать попытки фермента вывернуть какой-либо нуклеотид в свой активный центр.

Таблица 1. Значения констант скорости, характеризующих взаимодействие фермента Endo III с G-лигандом, содержащим напротив остаток tC^O .

Константы	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(27 \pm 2) \times 10^6$	$(30 \pm 4) \times 10^6$	$(45 \pm 5) \times 10^6$	$(52 \pm 5) \times 10^6$	$(61 \pm 4) \times 10^6$	$(65 \pm 11) \times 10^6$	$(72 \pm 3) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	110 ± 3	131 ± 11	239 ± 11	299 ± 20	360 ± 14	379 ± 36	494 ± 24
K_1, M	$(0,25 \pm 0,01) \times 10^6$	$(0,23 \pm 0,04) \times 10^6$	$(0,19 \pm 0,02) \times 10^6$	$(0,18 \pm 0,02) \times 10^6$	$(0,17 \pm 0,01) \times 10^6$	$(0,17 \pm 0,03) \times 10^6$	$(0,15 \pm 0,01) \times 10^6$
k_2, c^{-1}	0,034 ± 0,006	0,15 ± 0,05	0,33 ± 0,01	0,47 ± 0,14	0,58 ± 0,14	0,9 ± 0,3	1,0 ± 0,2
k_{-2}, c^{-1}	0,013 ± 0,003	0,04 ± 0,01	0,078 ± 0,004	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,12 ± 0,06	0,53 ± 0,13
K_2	2,6 ± 0,8	3,5 ± 1,8	4,2 ± 0,2	5,42 ± 2,55	8,5 ± 4,2	7,8 ± 4,5	1,95 ± 0,57
k_3, c^{-1}				0,004 ± 0,002	0,014 ± 0,004	0,017 ± 0,003	0,029 ± 0,006
k_{-3}, c^{-1}				0,015 ± 0,003	0,050 ± 0,004	0,054 ± 0,016	0,09 ± 0,04
K_3				0,26 ± 0,12	0,27 ± 0,09	0,3 ± 0,1	0,32 ± 0,15
K_{ass}, M^{-1}	$(0,9 \pm 0,01) \times 10^6$	$(1,04 \pm 0,04) \times 10^6$	$(0,99 \pm 0,02) \times 10^6$	$(1,4 \pm 0,02) \times 10^6$	$(2,0 \pm 0,01) \times 10^6$	$(1,9 \pm 0,03) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,01) \times 10^6$

Взаимодействие с F-лигандом

Для регистрации конформационных изменений ДНК при специфическом связывании с Endo III регистрировали изменения интенсивности флуоресценции флуорофорной группы tC^O , расположенной напротив F-сайта, и флуорофорной группы 2-аPu, расположенной с 3'-стороны от F-сайта (рисунок 2). На полученной концентрационной серии кривых присутствует однофазное изменение интенсивности флуоресценции 2-аPu. Уменьшение интенсивности флуоресценции может быть связано с увеличением гидрофобности микроокружения в области остатка 2-аPu. Наиболее вероятным предположением причины изменения флуоресцентного сигнала может быть этап встраивания аминокислотных остатков Endo III в полость в ДНК-дуплексе, образуемую из-за отсутствия комплементарного нуклеотида. Данный процесс соответствует одностадийному обратимому превращению (схема 2). Рассчитанные константы скоростей прямых и обратных стадий, а так же полученные константы равновесия представлены в таблице 2. Связывание F-лиганда с ферментом Endo III вызывает двухфазные изменения интенсивности флуоресценции tC^O . Такое падение флуоресцентного сигнала говорит об образовании более гидрофобной области вблизи флуорофорной группы. Полученные данные соответствовали кинетической схеме 3, содержащей две обратимых стадии. Рассчитанные константы скоростей прямых и обратных стадий, а так же полученные константы равновесия представлены в таблице 3.

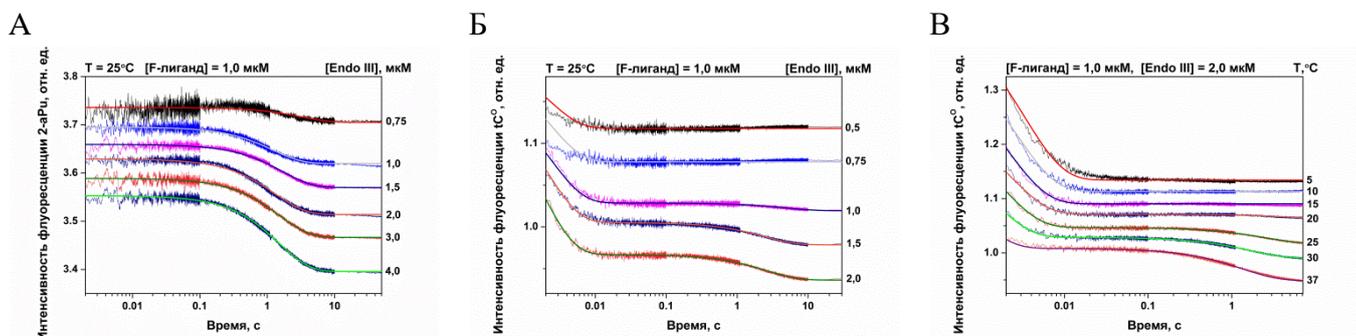


Рисунок 2. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения F-лиганда в процессе взаимодействия с Endo III (А) изменение интенсивности флуоресценции 2-аРи (Б) изменение интенсивности флуоресценции tC^O (В) изменение интенсивности флуоресценции tC^O при проведении экспериментов при различных температурах.

Схема 2



где E – фермент, F – лиганд, E·F – фермент-субстратный комплекс

Схема 3



где E – фермент, F – лиганд, $[E \cdot F]_i$ – фермент-субстратный комплекс

Таблица 2. Значения констант скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo III с ДНК-субстратами, содержащими флуорофорную группу 2-аминопурина с 3'-стороны от повреждения.

Константы	F-лиганд	AP-субстрат	DHU-субстрат
$k_1, M^{-1} c^{-1}$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$	$(3,4 \pm 0,6) \times 10^6$	$(9,5 \pm 0,5) \times 10^7$
k_{-1}, c^{-1}	$0,30 \pm 0,03$	$6,0 \pm 1,3$	670 ± 30
K_1, M	$(2,3 \pm 0,3) \times 10^{-6}$	$(1,8 \pm 0,5) \times 10^{-6}$	$(7,0 \pm 0,5) \times 10^{-6}$
k_2, c^{-1}		$0,47 \pm 0,04$	$0,29 \pm 0,09$
k_{-2}, c^{-1}		$0,06 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,02$
K_2		$0,13 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,08$
k_{cat}, c^{-1}		$0,38 \pm 0,02$	$0,054 \pm 0,009$
K_p, M		$(1,1 \pm 0,6) \times 10^{-5}$	$(1,6 \pm 0,6) \times 10^{-5}$

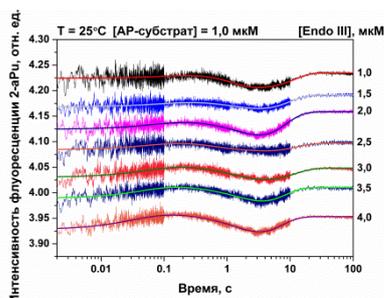
Таблица 3. Значения констант скорости, характеризующих взаимодействие фермента Endo III с F-лигандом, содержащим напротив остаток tC^O .

Константы	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C
$k_1, M^{-1} c^{-1}$	$(86 \pm 15) \times 10^5$	$(98 \pm 17) \times 10^6$	$(102 \pm 20) \times 10^6$	$(106 \pm 10) \times 10^6$	$(156 \pm 15) \times 10^6$	$(172 \pm 6) \times 10^6$	$(191 \pm 27) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	122 ± 12	150 ± 18	169 ± 15	214 ± 15	298 ± 50	395 ± 6	528 ± 34
K_1, M^{-1}	$(0,71 \pm 0,14) \times 10^6$	$(0,65 \pm 0,14) \times 10^6$	$(0,60 \pm 0,13) \times 10^6$	$(0,49 \pm 0,06) \times 10^6$	$(0,52 \pm 0,1) \times 10^6$	$(0,44 \pm 0,017) \times 10^6$	$(0,36 \pm 0,06) \times 10^6$
k_2, c^{-1}				$0,005 \pm 0,001$	$0,06 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,06$
k_{-2}, c^{-1}				$0,17 \pm 0,04$	$0,37 \pm 0,02$	$0,804 \pm 0,003$	$0,50 \pm 0,02$
K_2				$0,03 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,1$
K_{ass}, M^{-1}	$(0,1 \pm 0,14) \times 10^6$	$(0,65 \pm 0,14) \times 10^6$	$(0,60 \pm 0,13) \times 10^6$	$(0,50 \pm 0,06) \times 10^6$	$(0,41 \pm 0,10) \times 10^6$	$(0,54 \pm 0,17) \times 10^6$	$(0,52 \pm 0,06) \times 10^6$

Взаимодействие с AP-субстратом

AP-сайт является расщепляемым субстратом для Endo III, поскольку после связывания фермента происходит реакция β -элиминирования. На рисунке 3 представлены полученные данные изменения интенсивности флуоресценции остатков 2-aPu и tC^O. На кривых изменения интенсивности флуоресценции 2-aPu можно выделить несколько фаз. Полученные кинетические кривые соответствуют механизму, содержащему две обратимых стадии связывания, необратимую каталитическую стадию, и стадию диссоциации комплекса фермент-продукт (схема 4). Константы прямых и обратных стадий, а так же константы равновесия представлены в таблице 3. На кривых изменения интенсивности флуоресценции tC^O первая фаза падения интенсивности флуоресценции продолжалась по 10 мс, как и в случае с F-лигандом. Вторая стадия падения интенсивности флуоресценции продолжалась с 10 мс до 1 с. Вероятно, две фазы падения интенсивности флуоресценции tC^O отражают распознавание ферментом Endo III AP-сайта. Реакция β -элиминирования приводящая к образованию разрыва в поврежденной цепи и высвобождению продукта сопровождается ростом интенсивности флуоресценции tC^O на временах больше 1 с. Минимальная кинетическая схема, описывающая полученные данные об изменении флуоресцентного сигнала, содержала те же стадии, что и схема, предложенная в случае 2-aPu содержащего субстрата (схема 4). Константы скорости реакций, соответствующих данной схеме, приведены в таблице 4.

А



Б

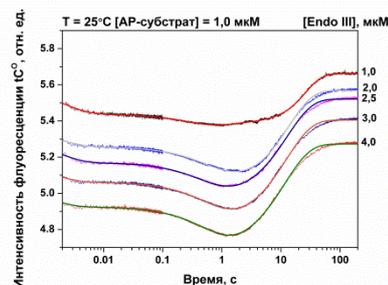


Рисунок 3. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения AP-субстрата в процессе взаимодействия с Endo III (А) изменение интенсивности флуоресценции 2-aPu (Б) изменение интенсивности флуоресценции tC^O.

Схема 4



где E – фермент, AP - субстрат, [E · AP]_i – фермент-субстратные комплексы, [E · P] – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

Таблица 4. Значения констант скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo III с AP-субстратом, содержащим остаток tC^O напротив AP-сайта.

Константы	AP-субстрат
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(8,0 \pm 2,0) \times 10^7$
k_{-1}, c^{-1}	360 ± 50
K_1, M	$(4,5 \pm 1,3) \times 10^{-6}$
k_2, c^{-1}	$4,5 \pm 1,8$
k_{-2}, c^{-1}	$0,6 \pm 0,1$
K_2	$0,13 \pm 0,06$
k_3, c^{-1}	$0,13 \pm 0,01$
K_P, M	$(14,6 \pm 4,6) \times 10^{-5}$

Взаимодействие с DHU-субстратом

Для получения данных о конформационных изменениях ДНК в ходе полного ферментативного цикла при взаимодействии с Endo III, были использованы ДНК-дуплексы, содержащие остаток 5,6-дигидроуридина. На полученных кривых изменения интенсивности флуоресценции 2-аPu (рисунок 4) присутствует фаза падения флуоресцентного сигнала до 20 с. Последующая фаза роста флуоресцентного сигнала, по-видимому, отражает каталитический этап и стадию диссоциации комплекса фермент-продукт. Полученные кинетические кривые были охарактеризованы четырехстадийным механизмом, аналогичным механизму для AP-субстрата (схема 4). Рассчитанные константы скорости и равновесия представлены в таблице 2. При взаимодействии Endo III с DHU-субстратом, изменения интенсивности флуоресценции tC^O имели такой же вид, что и для AP-субстрата (рисунок 4). Поскольку в ДНК-дуплексе присутствует поврежденное гетероциклическое основание (5,6-дигидроурин), то после образования каталитически-компетентного комплекса происходят две реакции: гидролиз N-гликозидной связи и реакция β -элиминирования. Дополнительная стадия гидролиза N-гликозидной связи приводит к тому, что полученные изменения интенсивности флуоресценции немного сдвигаются в сторону большего времени, по сравнению с AP-субстратом. Кинетические кривые были обработаны минимальной схемой, соответствующей схеме для 2-аPu-содержащего ДНК-дуплекса (схема 4). Значения констант скорости приведены в таблице 5.

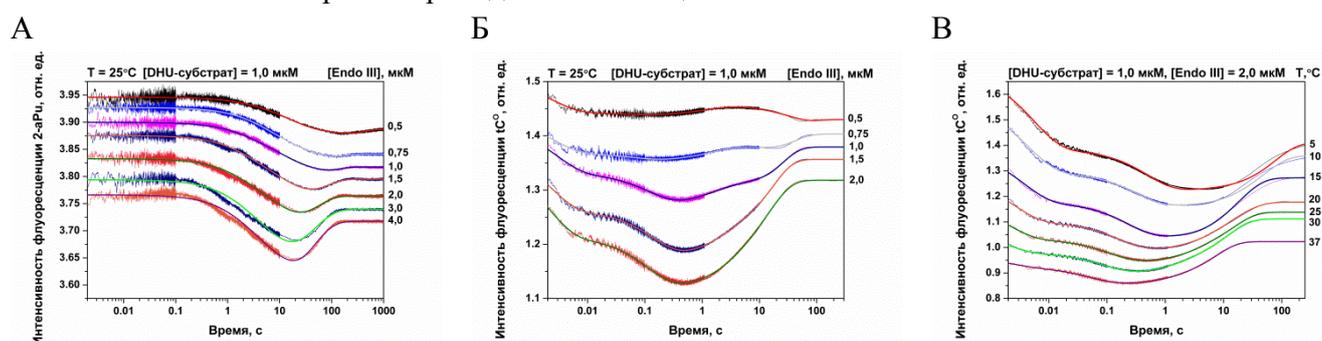


Рисунок 4. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения DHU-субстрата в процессе взаимодействия с Endo III (А) изменение интенсивности флуоресценции 2-аPu (Б) изменение интенсивности флуоресценции tC^O (В) изменение интенсивности флуоресценции tC^O при проведении экспериментов при различных температурах.

Таблица 5. Значения констант скорости, характеризующих взаимодействие фермента Endo III с DHU-субстратом, содержащим напротив остаток tC^O .

Константы	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(50\pm 7)\times 10^6$	$(63\pm 11)\times 10^6$	$(88\pm 8)\times 10^6$	$(98\pm 16)\times 10^6$	$(116\pm 5)\times 10^6$	$(127\pm 30)\times 10^6$	$(144\pm 7)\times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	47±6	63±11	88±15	111±17	145±11	166±16	210±35
K_1, M^{-1}	$(0,4\pm 0,2)\times 10^6$	$(1,0\pm 0,3)\times 10^6$	$(1,0\pm 0,2)\times 10^6$	$(0,9\pm 0,2)\times 10^6$	$(0,8\pm 0,1)\times 10^6$	$(0,8\pm 0,2)\times 10^6$	$(0,7\pm 0,1)\times 10^6$
k_2, c^{-1}	2,1±0,7	2,6±0,4	3,5±0,3	3,8±0,4	3,8±0,4	5,3±1,2	9,5±1,5
k_{-2}, c^{-1}	1,0±0,1	1,3±0,1	2,0±0,4	4,1±0,5	5,5±0,2	7,2±1,3	14,5±1,2
K_2	2,2±0,7	1,9±0,4	1,8±0,4	0,9±0,1	0,7±0,1	0,7±0,2	0,65±0,12
k_{cat}, c^{-1}	0,027±0,006	0,045±0,007	0,13±0,03	0,27±0,06	0,39±0,04	0,41±0,09	0,8±0,2
K_P, M	$(2,9\pm 1,7)\times 10^6$	$(3,0\pm 2)\times 10^6$	$(1,6\pm 1,4)\times 10^6$	$(1,6\pm 1,4)\times 10^6$	$(0,62\pm 0,5)\times 10^6$	$(0,9\pm 0,4)\times 10^6$	$(0,4\pm 0,1)\times 10^6$
K_{ass}, M^{-1}	$(3,5\pm 0,2)\times 10^6$	$(2,9\pm 0,3)\times 10^6$	$(2,8\pm 0,2)\times 10^6$	$(1,7\pm 0,2)\times 10^6$	$(1,5\pm 0,1)\times 10^6$	$(1,4\pm 0,2)\times 10^6$	$(1,2\pm 0,1)\times 10^6$

Анализ термодинамических параметров взаимодействия Endo III с ДНК-лигандами и субстратами

Для определения термодинамических параметров из флуоресцентных данных, полученных при различных температурах, были определены значения индивидуальных констант скорости прямых и обратных реакций равновесных и неравновесных стадий (k_i и k_{-i} , где i – номер стадии) и получены константы равновесия отдельных стадий многостадийного процесса образования промежуточных фермент-субстратных комплексов K_i (k_i/k_{-i}). Для каждой i -ой стадии были получены зависимости между термодинамической константой равновесия (K_i) и температурой. Термодинамические параметры i -й равновесной стадии определяли с помощью уравнения Вант-Гоффа (формула 1).

$$(1) \ln(K_i) = -\Delta G_i^\circ/RT = -\Delta H_i^\circ/RT + \Delta S_i^\circ/R,$$

ΔG_i° – стандартная свободная энергия Гиббса, ΔH_i° – стандартная энтальпия, ΔS_i° – стандартная энтропия, R – газовая постоянная, T – температура в градусах Кельвина.

Из зависимости величины константы скорости необратимой химической стадии k_i от температуры, описываемой с помощью уравнения Эйринга теории переходного состояния, были рассчитаны значения стандартной энтальпии и энтропии активации (формула 2):

$$(2) \ln(k_i/T) = \ln(k_B/h) + \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT,$$

где k_i – константа скорости химической стадии, k_B – постоянная Больцмана, h – постоянная Планка, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура в градусах Кельвина.

Зависимости логарифма рассчитанных констант равновесия от $1/T$ приведены на рисунке 5. Полученные значения термодинамических параметров представлены в таблице 6.

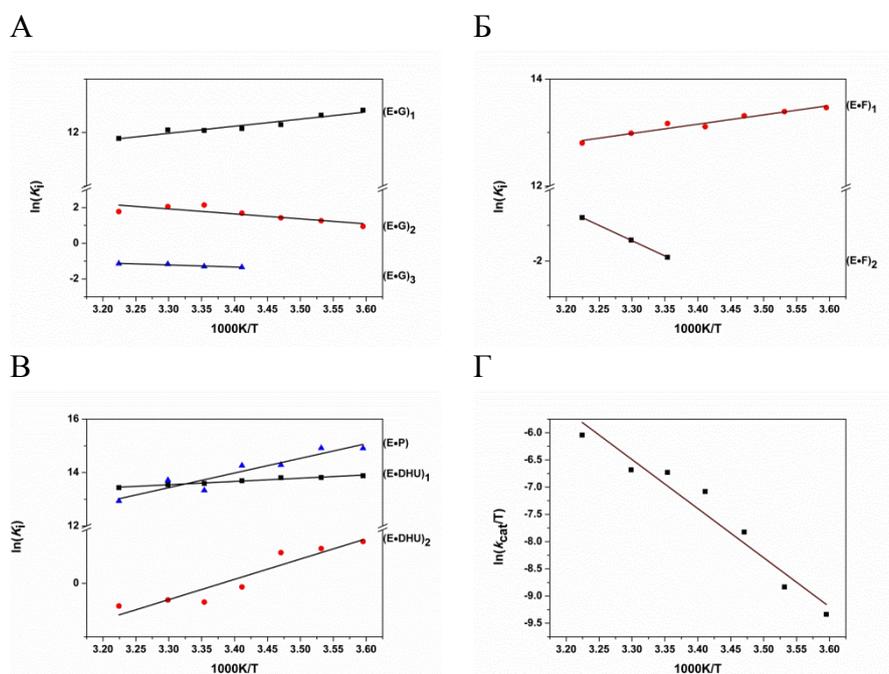


Рисунок 5. Зависимость $\ln(K_i)$ (А, Б, В) от $1/T$ в соответствии с уравнениями Вант-Гоффа и Эйринга, характеризующая взаимодействие Endo III с G-лигандом (А), F-лигандом (Б), DHU-субстратом (В, Г).

Таблица 6. Термодинамические параметры взаимодействия ДНК-гликозилазы Endo III с G- и F-лигандами и DHU-субстратом.

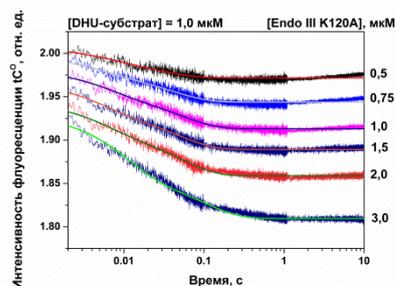
ДНК	Номер стадии	ΔH^0 , ккал/моль	ΔS^0 , кал/(моль×К)	ΔG_{298}^0 , ккал/моль
G	1: Начальное связывание, встраивание Leu81	-2,6±0,3	15,1±1,1	-7,1
	2: Встраивание Gln41	5,5±1,5	22±5	-1,3
	3: Попытки фермента вывернуть какое-либо основание	2,3±0,5	5,3±1,4	0,7
	Σ	5,2±2,3	42,4±7,8	-7,7
F	1: Начальное связывание, встраивание Leu81	-3,5±0,4	14±1	-7,8
	2: Встраивание Gln41	17,0±0,1	53,3±0,5	1,1
	Σ	13,5±0,5	67,3±1,5	-6,7
DHU	1: Начальное связывание, встраивание Leu81	-2,4±0,2	19±1	-8,0
	2: Встраивание Gln41, образование каталитически компетентного комплекса	-7,5±1,2	-25±4	0,2
	Σ			
	3: каталитическая стадия	-9,9±1,4	-6,0±5,0	-7,8
	4: Диссоциация продукта, стадия	18±2	-1,0±0,1	18,0
		-11±2	9±6	-7,9

Образование первого комплекса для любого из исследованных ДНК-дуплексов связано с отрицательным изменением энтальпии и положительным изменением энтропии, что указывает на схожую природу взаимодействий на этапе образования начального фермент-субстратного комплекса. Значение изменения энергии Гиббса равное -7 ккал/мол является типичным для комплексов фермент-ДНК (*Privalov et. al., 2007*). Тем не менее, при анализе данных было установлено, что общие термодинамические изменения между процессами связывания Endo III со специфическим и не специфическим дуплексом имеют четкие качественные отличия. Суммарное связывание с G- и F-лигандами характеризуется положительным изменением энтропии и энтальпии, но в случае связывания с DHU-субстратом – это полностью энтальпийно-зависимый процесс исходя их экзотермичности второй стадии связывания. Вторая стадия связывания DHU-субстрата отражает подстройку фермент-субстратного комплекса под каталитически-активное состояние и характеризуется отрицательными изменениями, как энтальпии, так и энтропии. Отрицательное значение ΔH^0_2 указывает на стабилизацию комплекса в процессе образования новых, энергетически выгодных связей среди реагирующих атомов, в то время как отрицательное значение ΔS^0_2 указывает на компактизацию и увеличенную жесткость комплекса. Третья стадия взаимодействия Endo III с DHU-субстратом отражает N-гликозилазную реакцию и реакцию β -элиминирования 3'-фосфатной группы. Четвертая стадия для DHU-субстрата является равновесием между комплексом Endo III с продуктом и его свободными формами в растворе.

Исследование конформационной динамики ДНК-субстратов при взаимодействии с мутантными формами фермента Endo III K120A и D138A

Для выяснения влияния каталитических аминокислотных остатков Lys120 и Asp 138 на этапы начального взаимодействия Endo III с ДНК, была введена замена Lys120 и Asp138 на аланин. При анализе взаимодействия мутантной формы фермента Endo III K120A с DHU-субстратом были зарегистрированы кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции tC^0 , находящейся напротив специфического повреждения 5,6-дигидроуридина (рисунок 6). В отличие от фермента дикого типа, не удалось зарегистрировать роста интенсивности флуоресценции, который мог бы означать накопление продукта реакции и его диссоциацию из активного центра фермента. Полученные данные соответствовали кинетической схеме 5, содержащей две обратимых стадии. Константы скоростей отдельных стадий приведены в таблице 7. При регистрации конформационных изменений DHU-субстрата, в процессе взаимодействия с Endo III D138A не наблюдали изменения интенсивности флуоресценции tC^0 (рисунок 6).

А



Б

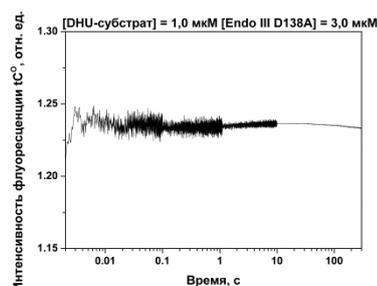


Рисунок 6. Экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции tC^O , входящего в состав DHU-субстрата, при взаимодействии с Endo III K120A (А) и Endo III D138A (Б).

Схема 5



где E – фермент, DHU – субстрат, содержащий остаток 5,6-дигидроурацила, $(E \cdot DHU)_n$ – комплекс фермента с субстратом.

Таблица 7. Значения констант скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo III K120A с DHU-субстратом, содержащим остаток tC^O напротив повреждения.

Константы	DHU-субстрат
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(8 \pm 2) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	60 ± 15
K_1, M^{-1}	$(0,13 \pm 0,05) \times 10^6$
k_2, c^{-1}	$4,6 \pm 1,4$
k_{-2}, c^{-1}	12 ± 2
K_2	$0,4 \pm 0,1$
k_3, c^{-1}	
k_{-3}, c^{-1}	
K_{ass}, M^{-1}	$0,18 \times 10^6$

Заключение к разделу 2

При взаимодействии с Endo III ДНК претерпевает ряд последовательных конформационных изменений, которые отражают различные этапы её взаимодействия с ферментом. Было показано, что образование начальных контактов Endo III с ДНК предполагает взаимодействие фермента с комплементарной цепью, а не с той, в которой расположено повреждение. При этом вероятно, уже на этом этапе фермент пытается вывернуть нуклеотид в свой активный центр, вне зависимости от того, есть ли в нем повреждение или нет. Примечательно, что замена каталитического аминокислотного остатка D138 на аланин, приводит к тому, что, по-видимому, фермент становится не способен связываться с ДНК даже на начальных этапах. Помимо этого, на этапе образования начальных контактов происходит вклинивание аминокислотного остатка Leu81, который является своеобразным сенсором повреждения у Endo III. После образования начальных контактов с ДНК, фермент нуждается в дополнительной подстройке активного центра, для достижения каталитически компетентного состояния. Завершающие этапы образования фермент-субстратного комплекса характеризуются десольватацией и дегидратацией функциональных групп фермента и ДНК-субстрата.

3. Конформационные изменения структуре Endo VIII и ДНК в процессе их взаимодействия

Для фермента Endo VIII из *E. coli* известна его кристаллическая структура в свободной форме и в комплексе с ДНК (Golan et al., 2005; Zharkov et al., 2002). Было показано, что при связывании с ДНК структура Endo VIII отличается от структуры фермента в свободной форме. У Endo VIII происходит сближение С- и N-концевых доменов, что говорит о том, что связывание с ДНК вызывает конформационные перестройки в структуре фермента. Помимо этого, структура ДНК, связанной с Endo VIII так же изменяется. Фермент изгибает ДНК в месте повреждения и выворачивает поврежденный нуклеотид в свой активный центр. Поскольку конформационные изменения при образовании фермент-субстратного комплекса происходят с обоими биополимерами, для уточнения полученного механизма была зарегистрирована конформационная динамика ДНК-дуплекса в процессе его взаимодействия с Endo VIII. Для этого использовали ДНК-дуплексы, содержащие повреждения различной степени специфичности и флуорофорную группу tC^O . Для определения термодинамических параметров зарегистрированных изменений эксперименты проводили при различных температурах (5-25°C).

Для поэтапного определения очередности встраивания аминокислотных остатков фермента Endo VIII в ДНК-дуплекс было выделено несколько мутантных форм фермента, содержащих замены некоторых аминокислотных остатков на Trp, для повышения чувствительности флуоресцентного сигнала и наблюдения конформационных изменений вблизи новых остатков Trp. Для определения роли каталитического аминокислотного остатка Glu2 в процессе связывания фермента с ДНК и его дальнейшего каталитического превращения, была использована мутантная форма Endo VIII E2Q. Для регистрации конформационных изменений в ДНК субстратах, при взаимодействии с Endo VIII WT и E2Q были использованы 17-звенные ДНК-дуплексы, содержащие FRET пару FAM/BNQ1 на 5' концах цепей ДНК, таким образом, флуорофор и тушител находились на разных концах ДНК-дуплекса.

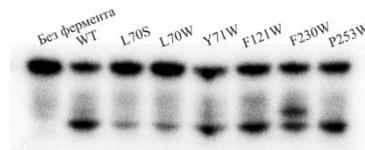
Конформационные изменения мутантных форм Endo VIII

Для уточнения роли некоторых аминокислотных остатков и дальнейшего разъяснения стадий связывания фермента с ДНК, были сконструированы мутантные формы Endo VIII, содержащие в своей последовательности замену этих аминокислот на триптофан либо серин. Аминокислотные остатки Tyr71, Phe121, Phe230 и Pro253 были заменены на остаток триптофана. Остатки Phe121, Phe230 и Pro253 расположены в структуре фермента в ДНК-связывающем сайте, в непосредственной близости от каталитической аминокислоты Pro1 и связанной ДНК. Замена Leu70 и Tyr71 на триптофан позволила регистрировать изменения интенсивности флуоресценции триптофана, находящегося в непосредственной близости от поврежденного основания. Дополнительно остаток Leu70 был заменен на серин. Предварительно был проведен анализ активности всех полученных мутантных форм фермента Endo VIII. Для этого анализировали продукты реакции мутантных форм Endo VIII с ^{32}P радиоактивно-мечеными олигодезоксирибонуклеотидами, содержащими повреждения, специфичные для Endo VIII - 5,6-дигидроуридин либо AP-сайт в своей структуре. Разделение реакционной смеси проводили в 20% полиакриламидном геле. Полученные результаты сравнивали с результатами для Endo VIII дикого типа (рисунок 7)

А



В



Б

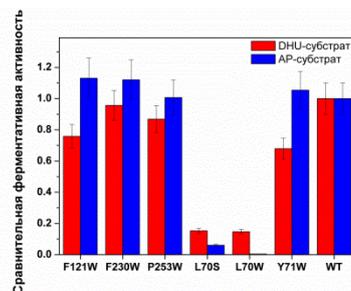
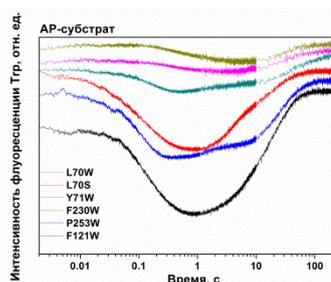


Рисунок 7. Степень расщепления радиоактивно-меченных AP- и DHU- субстратов ферментом Endo VIII за 500 секунд; (А) Взаимодействие Endo VIII с AP-субстратом ($[AP/G13] = 1,0$ мкМ, $[Endo VIII] = 1,0$ мкМ) (Б) Сравнительная активность Endo VIII при взаимодействии с AP- и DHU-субстратом (В) Взаимодействие Endo VIII с DHU-субстратом ($[DHU/G13] = 1,0$ мкМ, $[Endo VIII] = 2,0$ мкМ).

Наибольшим эффектом на активность Endo VIII обладала замена лейцина 70. Как видно из диаграммы Б, мутантные формы L70W и L70S практически теряют способность катализировать расщепление AP-сайтов, и обладают слабой активностью по отношению к DHU-субстрату. Замены остальных аминокислотных остатков на триптофан не приводили к значительному снижению активности фермента. Примечательно, что в случае мутантной формы Phe230Trp при разделении продуктов реакции фермента в геле, была выявлена дополнительная полоса, соответствующая продукту β -элиминирования. Вероятно, такая замена приводит к замедлению реакции δ -элиминирования, катализируемой ферментом. В случае Endo VIII дикого типа обе реакции элиминирования происходят быстро, и в геле наблюдается только одна полоса – от конечного продукта δ -элиминирования фермента.

Анализ конформационной динамики фермента в режиме реального времени позволил уточнить роль аминокислотных остатков, подвергшихся замене, при взаимодействии с ДНК-субстратами. Для этого методом остановленной струи была проанализирована предстационарная кинетика взаимодействия мутантных форм Endo VIII с AP- и DHU-субстратами, данные представлены на рисунке 8.

А



Б

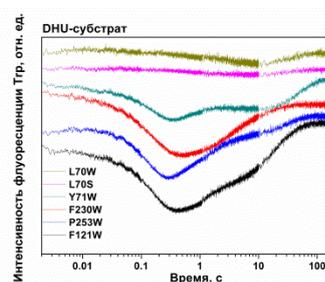
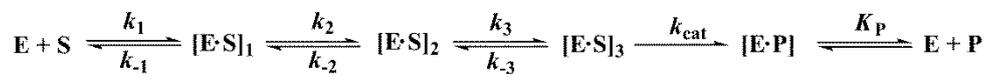


Рисунок 8. Изменение интенсивности остатков триптофанов мутантных форм Endo VIII при взаимодействии с AP-субстратом (А) и DHU-субстратом (Б) ($[Endo VIII] = 2,0$ мкМ, $[ДНК-субстрат] = 4,0$ мкМ).

Анализ полученных данных выявил, что замена Leu70 на Trp либо Ser значительно влияет на конформационную динамику фермента, по сравнению с другими мутантными формами фермента, использованными в работе. Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp, находящихся в мутантных формах L70S и L70W имели схожий характер.

Для мутантных форм Y71W, F121W, F230W, P253W взаимодействие с AP- и DHU-субстратом соответствовало кинетической схеме 5. Для мутантных форм L70S и L70W взаимодействие с AP- и DHU-субстратом соответствовало кинетической схеме 6. Константы скоростей отдельных стадий и равновесные константы скорости приведены в таблице 7.

Схема 5



где E – мутантные формы фермента Endo VIII Y71W, F121W, F230W, P253W, S – AP- либо DHU-субстрат, P – продукт реакции, $[E \cdot S]_i$ – комплексы Endo VIII с ДНК-дуплексом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакции каждой стадии, k_{cat} – константа скорости каталитической реакции, K_p – константа диссоциации комплекса фермент-продукт.

Схема 6



где E – мутантные формы фермента Endo VIII L70S и L70W, S – AP- либо DHU-субстрат, P – продукт реакции, $[E \cdot S]_i$ – комплексы Endo VIII с ДНК-дуплексом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакции каждой стадии, k_{cat} – константа скорости каталитической реакции, K_p – константа диссоциации комплекса фермент-продукт.

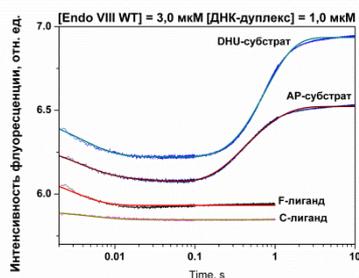
Таблица 7. Значения констант скорости, характеризующих взаимодействие мутантных форм фермента Endo VIII с AP- и DHU-субстратами.

AP-субстрат	L70S	L70W	Y71W	F121W	F230W	P253W
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(0,09 \pm 0,01) \times 10^6$	$(0,11 \pm 0,02) \times 10^6$	$(14 \pm 2) \times 10^6$	$(16 \pm 1) \times 10^6$	$(18 \pm 8) \times 10^6$	$(18 \pm 3) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	$0,9 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,05$	170 ± 17	132 ± 12	81 ± 32	130 ± 28
K_1, M^{-1}	1×10^5	$1,8 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
k_2, c^{-1}			21 ± 2	35 ± 3	25 ± 6	37 ± 4
k_{-2}, c^{-1}			$1,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,5$
K_2			15	39	25	19
k_3, c^{-1}			$0,13 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,02$
k_{-3}, c^{-1}			$1,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,6$	$4,7 \pm 1,1$	$1,9 \pm 0,2$
K_3			0,13	0,27	0,19	0,18
K_{ass}, M^{-1}	1×10^5	1×10^5	$1,6 \times 10^5$	$12,6 \times 10^5$	$10,5 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$
k_{cat}, c^{-1}	$0,09 \pm 0,01$	$0,080 \pm 0,007$	$0,29 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,08$
K_p, M	$(0,18 \pm 0,02) \times 10^{-6}$	$(0,2 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(0,11 \pm 0,01) \times 10^{-6}$	$(1,5 \pm 0,4) \times 10^{-6}$	$(1,1 \pm 0,6) \times 10^{-6}$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-6}$
DHU-субстрат	L70S	L70W	Y71W	F121W	F230W	P253W
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(0,09 \pm 0,02) \times 10^6$	$(0,06 \pm 0,01) \times 10^6$	$(21 \pm 3) \times 10^6$	$(39 \pm 11) \times 10^6$	$(30 \pm 2) \times 10^6$	$(27 \pm 2) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	$1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	330 ± 30	120 ± 31	310 ± 45	310 ± 26
K_1, M^{-1}	$0,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$0,63 \times 10^5$	3×10^5	$0,97 \times 10^5$	$0,87 \times 10^5$
k_2, c^{-1}			16 ± 3	17 ± 4	21 ± 3	23 ± 3
k_{-2}, c^{-1}			$2,5 \pm 0,1$	$0,55 \pm 0,25$	$1,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$
K_2			6,4	31	17,5	28,7
k_3, c^{-1}			$0,4 \pm 0,1$	$0,58 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,03$
k_{-3}, c^{-1}			$1,1 \pm 0,1$	$0,89 \pm 0,14$	$0,66 \pm 0,06$	$1,2 \pm 0,1$
K_3			0,36	0,65	1,2	0,83
K_{ass}, M^{-1}			$1,45 \times 10^5$	6×10^6	2×10^6	2×10^6
k_{cat}, c^{-1}	$0,09 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,03$
K_p, M	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(0,7 \pm 0,5) \times 10^{-6}$	$(0,4 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(0,6 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(0,63 \pm 0,08) \times 10^{-6}$

Сравнение конформационной динамики ДНК-субстратов при взаимодействии с ферментом Endo VIII дикого типа и его мутантной формой E2Q

Для эндонуклеазы VIII из рентгеноструктурных данных было показано, что в структуре фермента присутствуют несколько важных каталитических аминокислотных остатков, например Glu2, находящийся в активном центре фермента. Примечательно, что мутация этого аминокислотного остатка приводит к потере N-гликозилазной активности, но не AP-лиазной, по отношению к AP-сайту. Для установления этапов ферментативного процесса, на который могла бы повлиять замена Glu2, была сконструирована мутантная форма Endo VIII E2Q. Полученные данные о конформационной динамике С- и F-лигандов, а так же AP- и DHU-субстратов приведены на рисунке 9.

А



Б

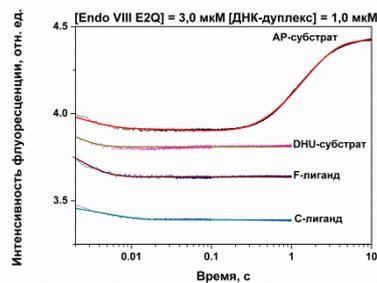
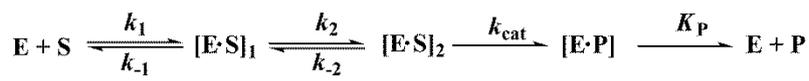


Рисунок 9. Изменение интенсивности FRET сигнала при взаимодействии (А) Endo VIII WT с ДНК-субстратами и лигандами и (Б) Endo VIII E2Q с ДНК-субстратами и лигандами ([Endo VIII] = 3,0 мкМ, [ДНК-дуплекс] = 1,0 мкМ).

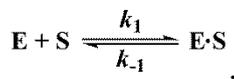
При взаимодействии фермента Endo VIII дикого типа и его мутантной формы E2Q со всеми использованными ДНК-дуплексами наблюдается уменьшение FRET-сигнала на начальном участке кинетических кривых. Такое изменение отражает сближение концов ДНК-дуплекса, вызванное его изгибанием, при котором происходит более эффективное тушение эмиссии флуорофорной группы FAM. Из рентгеноструктурных данных известно, что при связывании фермента Endo VIII с ДНК, содержащей повреждение, происходит изгибание дуплекса, таким образом, согласно кинетическим данным процесс изгибания ДНК происходит уже на этапе образования неспецифического комплекса. Поскольку Endo VIII WT и E2Q могут расщеплять субстраты с AP-сайтом стадия увеличения интенсивности флуоресценции отражает каталитический процесс и последующую диссоциацию комплекса фермент-продукт. При взаимодействии Endo VIII дикого типа с ДНК-субстратом, содержащим остаток 5,6-дигидроуидина в качестве специфического повреждения, изменения на кинетической кривых и их форма очень похожи на полученные для AP-субстрата. В случае фермента Endo VIII, содержащего мутацию E2Q, полученные данные имеют другой вид. Известно, что данная замена аминокислот приводит к потере способности фермента катализировать гидролиз N-гликозилазной связи. На полученных кривых изменения интенсивности флуоресценции можно выделить фазу падения, как было показано в случае неповрежденного С-лиганда. При этом параметры образования комплекса с DHU-субстратом имеют близкие значения с параметрами для С- и F-лигандов. Взаимодействие Endo VIII WT и E2Q с AP-субстратом, а так же взаимодействие Endo VIII с DHU-субстратом соответствовало кинетической схеме 7. Взаимодействие Endo VIII WT с С- и F-лигандами, а так же взаимодействие Endo VIII E2Q с С- и F-лигандами и DHU-субстратом соответствовало кинетической схеме 8. Рассчитанные константы скоростей прямых и обратных стадий, а так же константы равновесия приведены в таблице 8.

Схема 7



где E – фермент, S-субстрат, [E·S]_i– фермент-субстратные комплексы, [E·P] – комплекс фермент-продукт, P – продукт реакции.

Схема 8



где E – фермент, S-субстрат, E·S – фермент-субстратный комплекс.

Таблица 8. Константы скорости и равновесия взаимодействия Endo VIII WT и E2Q, полученные при анализе данных FRET.

Константы	C-лиганд	F-лиганд	AP-субстрат	DHU-субстрат
Endo VIII WT				
$k_1, M^{-1} \times c^{-1}$	$(53 \pm 17) \times 10^6$	$(47 \pm 6) \times 10^6$	$(35 \pm 4) \times 10^6$	$(27 \pm 1) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	72±24	198±38	194±29	152±18
k_2, c^{-1}	-	-	6,1±1,2	5,0±0,4
k_{-2}, c^{-1}	-	-	2,6±0,8	0,6±0,1
k_{cat}, c^{-1}	-	-	9,6±2,3	9±1
k_d, c^{-1}	-	-	2,8±0,8	8,1±0,6
Endo VIII E2Q				
$k_1, M^{-1} \times c^{-1}$	$(45 \pm 14) \times 10^6$	$(63 \pm 8) \times 10^6$	$(29,5 \pm 1,4) \times 10^6$	$(64 \pm 8) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	62±14	163±46	240±78	247±30
k_2, c^{-1}	-	-	3,8±0,9	-
k_{-2}, c^{-1}	-	-	1±0,24	-
k_{cat}, c^{-1}	-	-	2,0±0,6	-
k_d, c^{-1}	-	-	1,3±1	-
k_4, c^{-1}	-	-	2,8±0,8	8,1±0,6

Анализ термодинамики взаимодействия фермента Endo VIII со специфическими и неспецифичным ДНК-субстратами

Для регистрации конформационных изменений в ДНК-субстратах в работе использовали 17-звенные ДНК-дуплексы содержащие флуорофорную группу tC⁰ напротив 5,6-дигидроуридина, выступающего в качестве специфичного повреждения, которое узнаётся и удаляется ферментом Endo VIII. Так же в работе использовали ДНК-дуплекс, содержащий нерасщепляемый аналог AP-сайта – остаток тетрагидрофурана (F), который имитирует промежуточный продукт ферментативной реакции – AP-сайт. Неспецифичный ДНК-дуплекс содержал остаток гуанина напротив флуорофорной группы tC⁰. Полученные данные приведены на рисунке 10.

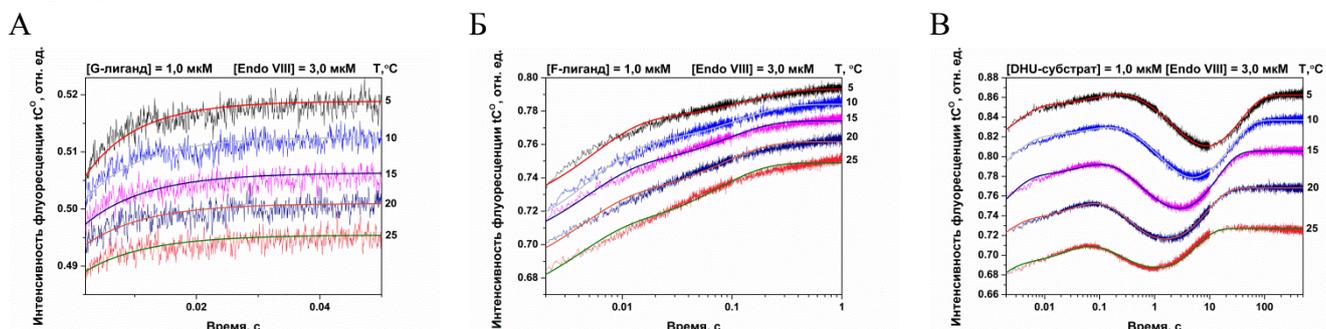


Рисунок 10. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения (А) G-лиганда (Б) F-лиганда (В) DHU-субстрата в процессе взаимодействия с Endo VIII.

На всех полученных кривых присутствует начальная фаза роста интенсивности флуоресценции tC^0 . Наблюдаемое изменение может отражать разрыхление двойной спирали ДНК и встраивание аминокислотных остатков фермента в ДНК-дуплекс. Взаимодействие Endo VIII с G-лигандом соответствовало схеме 8. Рассчитанные константы скоростей прямой и обратной стадии взаимодействия Endo VIII с G-лигандом приведены в таблице 9.

Схема 8



где E – фермент Endo VIII, G – ДНК-дуплекс, содержащий остаток гуанидина напротив флуорофорной группы tC^0 , E·G – комплекс Endo VIII с ДНК-дуплексом, k_1 и k_{-1} – константы скорости прямой и обратной реакции

Таблица 9. Константы равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и G-лигандом.

Константы	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(16\pm 7)\times 10^6$	$(16\pm 8)\times 10^6$	$(15\pm 9)\times 10^6$	$(14\pm 6)\times 10^6$	$(9\pm 2)\times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	53±29	61±37	54±21	61±40	44±15
K_1, M^{-1}	$(0,313\pm 0,215)\times 10^6$	$(0,256\pm 0,210)\times 10^6$	$(0,287\pm 0,201)\times 10^6$	$(0,225\pm 0,182)\times 10^6$	$(0,194\pm 0,081)\times 10^6$

При обработке полученных данных для взаимодействия Endo VIII с F-лигандом была определена минимальная кинетическая схема реакции, соответствующая двум обратимым стадиям образования фермент-субстратного комплекса (схема 3). По сравнению с данными, полученными для G-лиганда, изменения на кинетических кривых взаимодействия F-лиганда с Endo VIII обладают большей амплитудой, что может говорить как о большей эффективности образования комплекса между ферментом и ДНК, так и о больших конформационных перестройках, возникающих в структуре ДНК-дуплекса. Рассчитанные константы скоростей реакций и константы равновесия приведены в таблице 10.

Таблица 10. Константы равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и F-лигандом.

Константы	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(35\pm 9)\times 10^6$	$(35\pm 5)\times 10^6$	$(37\pm 5)\times 10^6$	$(39\pm 5)\times 10^6$	$(40\pm 8)\times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	89±22	99±18	109±28	129±43	144±46
K_1, M^{-1}	$(0,4\pm 0,1)\times 10^6$	$(0,35\pm 0,08)\times 10^6$	$(0,3\pm 0,1)\times 10^6$	$(0,3\pm 0,1)\times 10^6$	$(0,3\pm 0,1)\times 10^6$
k_2, c^{-1}	0,3±0,1	0,9±0,3	1,4±0,2	3±1	3±1
k_{-2}, c^{-1}	7±2	8±1	10±1	11±1	12±1
K_2	0,04±0,02	0,11±0,03	0,13±0,02	0,24±0,09	0,26±0,08

При регистрации взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратом, содержащим остаток 5,6-дигидроуридина, являющегося специфическим субстратом, были получены кинетические кривые, содержащие 4 фазы изменения интенсивности флуоресценции: 2 фазы роста интенсивности флуоресценции, фазу падения, и ещё одну фазу роста. При обработке данных, был получен механизм реакции, включающий в себя 3 стадии образования фермент-субстратного комплекса, которые, по-видимому, отражают различные этапы связывания Endo VIII с ДНК, одну необратимую стадию, которую можно соотнести с каталитической стадией, и одну обратимую стадию диссоциации комплекса фермент-продукт, которая отражает диссоциацию продукта из

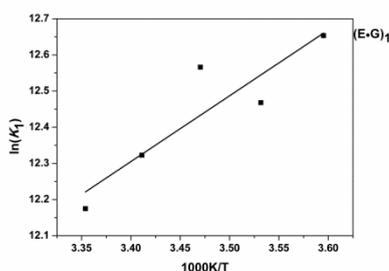
активного центра фермента (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Рассчитанные константы скоростей отдельных стадий и константы равновесия приведены в таблице 11.

Таблица 11. Константы равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и DHU-субстратом.

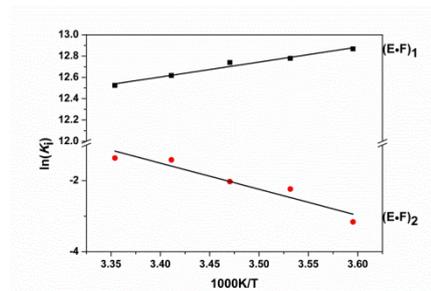
Константы	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(35\pm 7)\times 10^6$	$(40\pm 6)\times 10^6$	$(45\pm 7)\times 10^6$	$(61\pm 4)\times 10^6$	$(80\pm 13)\times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	233±34	272±42	322±11	437±72	576±54
K_1, M^{-1}	$(0,149\pm 0,038)\times 10^6$	$(0,147\pm 0,032)\times 10^6$	$(0,140\pm 0,023)\times 10^6$	$(0,140\pm 0,025)\times 10^6$	$(0,138\pm 0,027)\times 10^6$
k_2, c^{-1}	1,0±0,2	1,7±0,1	2,6±0,4	3,6±0,6	4±1
k_{-2}, c^{-1}	0,34±0,08	0,62±0,03	0,9±0,7	1,2±1	1,3±0,3
K_2	2,72±0,94	2,76±0,24	2,83±2	3,0±2,7	3,0±1
k_3, c^{-1}	6,5±1,4	8,1±0,6	12±2	18±4	29±3
k_{-3}, c^{-1}	1,6±0,3	1,9±0,6	2,5±0,6	3±1	4,4±1,6
K_3	4±1	4,3±1,4	4,6±1,3	5,3±1,9	6,6±2,5
k_{cat}, c^{-1}	0,06±0,02	0,09±0,05	0,15±0,05	0,22±0,08	0,34±0,02
$K_5, M^{-1}c^{-1}$	$(0,06\pm 0,03)\times 10^6$	$(0,047\pm 0,019)\times 10^6$	$(0,042\pm 0,016)\times 10^6$	$(0,038\pm 0,010)\times 10^6$	$(0,34\pm 0,18)\times 10^6$

Из рассчитанных констант равновесия были построены зависимости $\ln(K_i)$ от $1/T(K)$, полученные зависимости имели линейный вид (рисунок 11) Исходя из параметров линейных уравнений были рассчитаны значения изменения энтальпии и энтропии, полученные значения представлены в таблице 12.

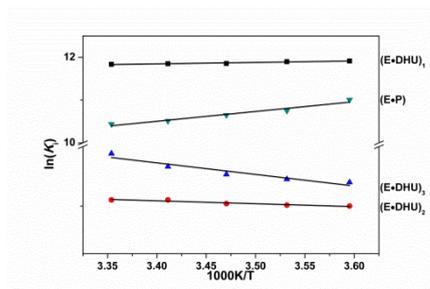
А



Б



В



Г

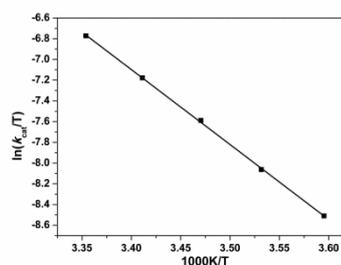


Рисунок 11. Зависимость $\ln(K_i)$ (А, Б, В) от $1/T$ в соответствии с уравнениями Вант-Гоффа и Эйринга, характеризующая взаимодействие Endo VIII с G-лигандом (А), F-лигандом (Б), DHU-субстратом (В, Г).

Таблица 12. Термодинамические параметры взаимодействия Endo VIII с G- и F-лигандами и DHU-субстратом.

ДНК	Номер стадии	ΔH^0 , ккал/моль	ΔS^0 , кал/(моль×К)	ΔG^0_{298} , ккал/моль
G-лиганд	1: Первичное связывание, встраивание Leu70	-3,6±0,9	12±3	-7,2
F-лиганд	1: Первичное связывание, встраивание Leu70	-2,8±0,3	16±1	-7,4
	2	15±3	47±9	0,8
	Σ	12,2±3,3	63±10	-6,6
DHU-субстрат	1: Первичное связывание, встраивание Leu70	-0,7±0,1	21,3±0,4	-7,0
	2	1,0±0,2	5,5±0,6	-0,65
	3: Образование каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса	3,9±0,7	17±2	-1,1
	Σ	4,2±1	43,8±3	-8,75
	4: Каталитическая стадия	14,4±0,1	-12,4±0,5	18
	5: Диссоциация комплекса фермент-продукт	-4,5±0,6	5±2	-6,2

Заключение к разделу 3

При анализе термодинамических параметров взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами, удалось выделить некоторые общие особенности. Для первой стадии образования фермент-субстратного комплекса величина изменения ΔG является схожей: -7,2 для G-лиганда, -7,4 – для F-лиганда, -7,0 – для DHU-субстрата. Помимо схожего временного диапазона изменения интенсивности tC^O , энергетика данной стадии является практически одинаковой. Это говорит о том, что вероятно, до 10 мс со всеми использованными ДНК-дуплексами происходит один и тот же процесс. По-видимому, при первичном связывании Endo VIII с ДНК не происходит дискриминация субстратов, а более глубокое внедрение аминокислотных остатков фермента происходит позже, при образовании последующих фермент-субстратных комплексов. Для всех использованных субстратов первичное связывание с ферментом сопровождается небольшим уменьшением энтальпии и повышением энтропии. Отрицательное значение энтальпии может указывать на образование энергетически выгодных контактов между ДНК-дуплексом и ферментом. Повышение энтропии, вероятно, связано с локальным плавлением ДНК-дуплекса. Термодинамический анализ 2 стадии связывания Endo VIII с ДНК-дуплексами, которая была зарегистрирована в случае F-лиганда и DHU-субстрата, выявил различие в протекании этого процесса. В случае F-лиганда значение ΔG является положительным, что говорит о невыгодности протекания этого процесса, и, по-видимому, данное изменение не происходит при низких температурах. На это указывает и высокое положительное значение ΔH . Тем не менее, значение $\Delta S = 47$ кал/(моль×К) компенсирует невыгодную с точки зрения энтальпии реакцию. На третьей стадии взаимодействия Endo VIII с DHU-субстратом, которая предшествует каталитической реакции, должно происходить окончательное встраивание аминокислотных остатков фермента в структуру ДНК и выворачивание поврежденного нуклеотида в активный центр Endo VIII. Вероятно, значительный рост энтропии может быть так же связан с десольватацией и дегидратацией функциональных групп фермента и ДНК-субстрата. 4 стадией взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратом является необратимая каталитическая реакция, в ходе которой образуются разрывы сахаро-фосфатного остова ДНК с 5' и 3' стороны. Последней стадией

взаимодействия Endo VIII с DHU-субстратом является стадия диссоциации фермент-субстратного комплекса.

В ходе работы был проанализирован набор мутантных форм фермента Endo VIII, которые содержали замены различных аминокислотных остатков на триптофан либо серин. Данные мутантные формы были выбраны для уточнения роли отдельных аминокислотных остатков фермента в образовании фермент-субстратного комплекса, и этапах распознавания повреждения и катализа. Остатки Leu70 и Tyr71 были выбраны в качестве потенциальных аминокислот, которые вклиниваются в ДНК-дуплекс на раннем этапе связывания фермента с ДНК, таким образом, действуя в качестве «сенсора» повреждения. Согласно рентгеноструктурным данным оба аминокислотных остатка имеют непосредственный контакт с ДНК-основаниями, расположенными напротив поврежденного основания либо с 5' и 3' стороны от него. Согласно анализу продуктов в ПААГ на взаимодействие фермента Endo VIII с DHU- и AP-субстратом практически не влияют замены аминокислотных остатков Tyr71, Phe121, Phe230, Pro253 на триптофан. Эти данные позволили предположить, что контакты образованные тирозином 71 не являются ключевыми для образования каталитически-активного комплекса. Эти данные позволили предположить, что контакты образованные тирозином 71 не являются ключевыми для образования каталитически-активного комплекса. Наибольшее отличие от дикого типа было показано для мутантных форм L70W и L70S. Из полученных данных было показано, что замена остатка Leu70 значительно влияет как на каталитическую активность фермента, так и на его способность связываться с ДНК. Замены L70S и L70W приводили к значительному (от 5 до 10 раз) уменьшению каталитической активности Endo VIII и падению амплитуды фазы падения интенсивности флуоресценции Trp. Это указывает на то, что остаток Leu70 является важным на начальных этапах образования фермент-субстратного комплекса. Наиболее вероятно, что замена Leu70 нарушает сеть контактов, необходимых на начальном этапе распознавания повреждения.

Анализ конформационной динамики ДНК-дуплексов, содержащих FRET-метки FAM/ВНQ1 на 5'-концах выявил значительные различия в конформационной динамике, при взаимодействии с Endo VIII WT и E2Q. Замена E2Q приводит к неспособности фермента катализировать разрыв N-гликозидной связи. Тем не менее, такая замена аминокислотных остатков не влияет на начальные этапы связывания фермента с ДНК.

4. Выводы

1. Установлена последовательность элементарных стадий взаимодействия ДНК-гликозилаз Endo III и Endo VIII из *E.coli* с ДНК-субстратами и изучена конформационная динамика ферментов и ДНК. Предложены кинетические схемы, позволяющие охарактеризовать зарегистрированные изменения интенсивности флуоресценции флуорофорных групп 2-аминопурина, 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, внутренних триптофанов ферментов и FRET-пары FAM/ВНQ1. Получены данные о термодинамических параметрах быстропротекающих стадий взаимодействия ферментов с субстратами.
2. Показано, что в ходе образования начальных контактов Endo III с ДНК происходит взаимодействие фермента с комплементарной цепью ДНК-дуплекса, не содержащей повреждения. При этом, вероятно, уже на этой стадии взаимодействия фермент пытается вывернуть нуклеотид в свой активный центр. Помимо этого, на этапе образования начальных контактов происходит вклинивание аминокислотного остатка Leu81, который играет роль сенсора повреждения у Endo III. Установлено, что у фермента Endo VIII так же присутствует такой аминокислотный остаток-сенсор – Leu70. Аминокислотный остаток Leu70 встраивается внутрь ДНК-дуплекса раньше других вклинивающихся аминокислотных остатков (Gln69 и Tyr71). Для обеих исследованных ДНК-гликозилаз на первой стадии фермент-субстратного взаимодействия происходит ограничение подвижности обоих биополимеров и высвобождение молекул воды с поверхности комплекса фермент-ДНК.
3. После образования начальных контактов с ДНК, оба фермента претерпевают дополнительную подстройку активных центров, для достижения каталитически компетентного состояния.
4. Замена каталитического аминокислотного остатка K120A у фермента Endo III, приводит к потере каталитической активности фермента, тем не менее мутантная форма связывается с ДНК-субстратом. При этом замена D138A Endo III приводит к полной потере способности связываться с поврежденной ДНК даже на начальных стадиях взаимодействия.
5. Взаимодействие мутантной формы E2Q у фермента Endo VIII с DHU-субстратом включает в себя только одну стадию – стадию начального связывания фермента с ДНК. В отличие от фермента дикого типа, у мутантной формы E2Q при взаимодействии с DHU-субстратом отсутствует вторая стадия, которая, вероятно, отражает этапы окончательной подстройки активного центра фермента и достижение каталитически-компетентной конформации.

Отчет о проверке текста
научно-квалификационной работы
на объем заимствования

Кладова Ольга Алексеевна

«Кинетический механизм конформационной подстройки и функциональная роль
аминокислот активных центров ферментов, входящих в структурные семейства
N_hH-GPD и N₂tH»

Оценка оригинальности: 90.54%

Заимствования: 9.46%

№ документа: 995649

Имя исходного файла: Научный_доклад_Кладова.docx

Размер файла: 1.4 МБ

Размер текста: 42595

Слов в тексте: 6002

Число предложений: 917

Источники (доля в тексте – ссылка):

9.4% <http://www.list-org.com/company/814678>

9.4% <https://www.rusprofile.ru/id/1451999>

6.4% <https://docplayer.ru/32215216-Federalnoe-gosudarstvennoe-byudzhethoe-uchrezhdenie-nau...>

10.6% <http://naukarus.com/mehanizmy-fermentativnogo-kataliza-i-uznavaniya-povrezhdennyh-uch...>

13.275% <https://docplayer.ru/76962318-Kuznecov-nikita-aleksandrovich-molekulyarno-kinetichesk...>

12.475% <http://www.dslib.net/bio-ximia/konformacionnye-prevrascheniya-ferment-substratnyh-kompl...>

12.11484375% <http://earthpapers.net/konformatsionnye-prevrascheniya-ferment-substratnyh-kompleksov...>

12.95% <http://www.dissercat.com/content/konformatsionnye-prevrashcheniya-ferment-substratnyk...>

14.4% <http://doc.knigi-x.ru/22biologiya/508438-1-strukturnie-dinamicheskie-aspekti-funkcion...>

13.2% <http://kursak.net/strukturnye-i-dinamicheskie-aspekty-funkcionirovaniya-dnk-n-glikozi...>

12.7% <http://geum.ru/aref/strukturnie-dinamicheskie-aspekti-funkcionirovaniya-dnk-n-glikozi...>

7.3% <http://naukarus.com/konformatsionnaya-dinamika-i-predstatsionarnaya-kinetika-dnk-glik...>

11.7% <https://scfh.ru/papers/v-glavnoy-rol-i-ferment/>

5.2%

https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%84%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%82_%D0%9A%D0%B0%D1%83...

11.1% <http://geum.ru/aref/kineticheskiy-mehanizm-deystviya-apurinovoy-apirimidinovoy-endonu...>

7.45% <http://earthpapers.net/kineticheskiy-mehanizm-deystviya-apurinovoy-apirimidinovoy-end...>

6.1% <https://msd.com.ua/teoriya-svarochnyx-processov/kinetika-gomogennyx-processov/>
7.3% <http://chem21.info/info/1322047/>
5.2% <http://www.ngpedia.ru/id50661p1.html>
6.5% <https://megalektsii.ru/s1058t9.html>
5.6% <http://ru-ecology.info/term/12960/>

Оригинальность работы составляет ___90.54___ % , что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» на сайте www.antiplagius.ru
06.09.2018 г.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.б.н. К.В. Разум