На правах рукописи

Алексеева Ирина Владимировна

Полиморфизмы белков-участников эксцизионной репарации оснований: влияние на активность отдельных ферментов и их взаимную регуляцию

1.5.4 – биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Новосибирск - 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН <u>Научный руководитель:</u>

Кузнецов Никита Александрович, д.х.н. Официальные оппоненты:

Моор Нина Александровна, д.х.н., доцент

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в.н.с.

Смирнов Иван Витальевич, д.х.н., чл.-корр. РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, зав. лабораторией **Кубарева Елена Александровна,** д.х.н., профессор

МГУ имени М.В. Ломоносова Отдел химии нуклеиновых кислот (Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского), г.н.с.

Защита состоится «___» ____ 202_ г. в 10:00

На заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

по адресу: 630090, проспект академика Лаврентьева, 8, Новосибирск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте ИАС <u>www.niboch.nsc.ru</u>

Автореферат разослан «__» ____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н.,

<u>____/Пестряков П.Е.</u>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Клеточная ДНК постоянно повреждается из-за воздействия различных факторов, включая активные формы кислорода и химически активные вещества. Клетки используют несколько ферментативных путей репарации ДНК для восстановления поврежденной ДНК и сохранения генетической стабильности. По пути эксцизионной репарации оснований (BER) происходит удаление необъемных повреждений ДНК. Эффективное функционирование всех участников ВЕR является залогом сохранения генетической информации и стабильности генома. Однако, на уровень репарационной активности могут оказывать влияние природные полиморфизмы (SNPs) в генах ферментов репарации, что может повлечь за собой риск развития заболеваний, связанных с накоплением мутаций в геноме. В связи с этим, влияние аминокислотных замен, вызванных SNPs, как на функциональную активность конкретных ферментов репарации ДНК, так и на эффективность белок-белковых взаимодействий между участниками репарационного процесса, остается актуальной областью исследований, а детальное изучение этих аспектов представляет собой важную фундаментальную задачу.

В связи с этим цель данной работы заключалась в установлении влияния на постадийный механизм функционирования ряда природных и искусственных замен аминокислотных остатков ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК человека на примере ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 и апуриновой/апиримидиновой (АП) эндонуклеазы APE1.

В ходе исследования решались следующие задачи:

• определить влияние замен аминокислотных остатков активного центра APE1 в составе мутантных форм D210N, N212A, T268D, M270A и D308A на скорость и эффективность узнавания, связывания и превращения модельных ДНК-субстратов;

 установить роль ионизованных аминокислотных остатков активного центра APE1
 в процессах образования каталитического комплекса и протекания реакции гидролиза фосфодиэфирной связи;

• провести анализ влияния замен аминокислотных остатков APE1 человека (R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q, P311S), ассоциированных с природными однонуклеотидными полиморфизмами (SNPs), на взаимодействие с ДНК;

 определить эффект замен, ассоциированных с природными SNPs, на регуляцию активности APE1 другими участниками процесса эксцизионной репарации оснований, а именно ДНК-гликозилазами OGG1, UNG2 и AAG, ДНК-полимеразой POLβ и белковыми факторами XRCC1 и PCNA;

• выявить влияние ряда природных SNP урацил-ДНК-гликозилаз человека SMUG1 (G90C, P240H, N244S и N248Y) и MBD4^{cat} (S470L, G507S, R512W и H557D) на процессы формирования фермент-субстратного комплекса, катализ и регуляцию их активности АП-эндонуклеазой APE1;

• провести апробацию методики определения активности ключевых ДНК-гликозилаз и АП-эндонуклеазы 1 человека в клеточных экстрактах раковых линий клеток человека.

Положения, выносимые на защиту

1) Аминокислотные остатки активного центра APE1 выполняют определенные функции в процессе связывания АП-сайт-содержащего ДНК-субстрата и каталитического гидролиза фосфодиэфирной связи: Thr268 критически важен на этапе связывания ДНК и формирования каталитически-компетентного комплекса; Asn212 имеет решающее значение для стадии изгибания ДНК и катализа; Asp210, помимо катализа, играет важную роль на этапе связывания ДНК-субстрата; Asp208, ответственный за координацию иона Mg²⁺, также принимает участие на этапе связывания ДНК-субстрата; Met270, участвующий в стабилизации вывернутого состояния поврежденного нуклеотида в активном центре фермента, важен на этапе формирования каталитического фермент-субстратного комплекса.

2) Скорость протекания стадий узнавания повреждения, формирования ферментсубстратного комплекса и катализа зависит от pH среды и увеличивается с увеличением значения pH. Ключевыми аминокислотными остатками АП-эндонуклеазы 1 человека, выполняющими каталитическую стадию гидролиза фосфодиэфирной связи в ДНКсубстрате, являются Tyr171 и His309. Функциональные роли His309 и Tyr171 находятся под контролем ионизированных состояний этих остатков, что может быть молекулярным переключателем между альтернативными каталитическими механизмами, включающими эти остатки в протонированной или депротонированной формах.

3) Ферментативная активность проверенных природных полиморфных вариантов APE1 может быть, как выше, так и ниже активности фермента дикого типа, но не может быть ниже порогового значения, необходимого для поддержания уровня репарации, достаточного для выживания организма. В то же время, природные полиморфизмы ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 могут приводить к практически полной потере ферментативной активности, что не приводит к негативным последствиям из-за того, что активность данных ДНК-гликозилаз может быть компенсирована за счет других ферментов.

4) Аминокислотные замены ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 и АП-эндонуклеазы APE1, ассоциированные с природными полиморфизмами, влияют как на их собственную ферментативную активность, так и на взаимную регуляцию их активности другими участниками процесса репарации.

5) Разработанный чувствительный флуоресцентный способ тестирования активности ДНКгликозилаз и АП-эндонуклеазы 1, как ключевых ферментов BER, может быть использован для определения уровня репарационной активности в белковых экстрактах раковых линий клеток человека.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В данной работе проведен систематический анализ природных полиморфных вариантов ряда ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК, а именно ДНКгликозилаз SMUG1 и MBD4 и АП-эндонуклеазы APE1 человека. Для этого на примере APE1 выполнен детальный анализ активности фермента дикого типа и ряда мутантных форм, содержащих замены потенциально важных аминокислотных остатков в активном центре, позволивший картировать их функциональную роль. Проанализированы данные об известных SNP-ассоциированных вариантах ферментов SMUG1, MBD4 и APE1. Информация об известных однонуклеотидных полиморфизмах была получена из базы данных NCBI dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). Особое внимание было уделено полиморфизмам, которые (1) приволили к смене класса аминокислотного остатка. (2) располагались в функционально-важных участках белковой глобулы и (3) встречались в опухолях. Используя эти критерии, в рамках данной работы впервые был отобран ряд SNPассоциированных замен аминокислотных остатков для дальнейшего экспериментального анализа каталитических свойств полиморфных вариантов ферментов. В ходе работы были получены рекомбинантные препараты 15 SNP-вариантов ферментов SMUG1, MBD4 и APE1, изучены их ферментативные свойства и проанализировано влияние других участников процесса BER на их активность, что позволило сделать заключение о роли SNPассоциированных замен во взаимной регуляции ферментов в процессе репарации ДНК. Разработан способ определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований в белковых экстрактах клеток человека, который был апробирован с использованием шести линий клеток опухоли яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV. SCOV3 и TOV21 и запатентован.

Личный вклад автора. Все представленные в работе результаты получены лично автором или при непосредственном его участии. Автор принимал активное участие в анализе полученных результатов и написании статей.

Публикации и апробации работы. По материалам диссертации опубликовано 6 научных статей, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Получен 1 патент.

Результаты, изложенные в диссертации, были представлены на конференциях: 44^{ом} конгрессе FEBS (Прага, Чехия, 2018), IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), конференции BGRS-SB (Новосибирск, 2020), 45^{ом} конгрессе FEBS (онлайн-конференция, 2021), всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022), всероссийской конференции «От микробиологии к генетическим технологиям» (Новосибирск, 2023), V Всероссийской конференции «Физико-химическая биология» (Новосибирск, 2024).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 45 рисунков, 5 схем и 23 таблицы. Библиография включает в себя 278 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Структуры модельных ДНК-субстратов и методы исследований

Для изучения взаимолействий ЛНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 и АП-эндонуклеазы АРЕ1 с ЛНК были использованы олиголезоксирибонуклеотилы, приведенные в Таблице 1. качестве ЛНК-субстратов для АП-эндонуклеазы использовали в олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие стабильный аналог АП-сайта — остаток 2гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофурана (F-сайт, рис. 1). Для регистрации локальных конформационных изменений ДНК в комплементарную цепь напротив F-сайта вводили флуореспирующий аналог пуриновых оснований. 2-аминопурин (аРи, рис. 1). Для регистрации глобальных конформационных перестроек, происходящих со структурой ДНКсубстратов в процессе взаимодействия с ферментами, использовали FRET-пару красителей FAM/BHQ1 (рис. 1). В качестве специфических ДНК-субстратов для ферментов SMUG1, ААG, NEIL1 и OGG1 использовали олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие уридин (U), 1, N⁶-этеноаденозин (єА), тимидингликоль (Тg) и 8-оксогуанозин (охоG), соответственно. В качестве неспецифического субстрата использовали неповрежденный ДНК-дуплекс. Для предотвращения экзонуклеазной деградации олигодезоксирибонуклеотидов в клеточных экстрактах в состав ДНК-зондов вводили 3'-концевую тиофосфатную группу (Таблица 1).

Сокращение	Последовательность
E/C	5'-TCTCTCFCCTTCC-3'
1.0	3'-AGAGAGGGGAAGG-5'
E D	5'-TCTCTCFCCTTCC-3'
r\aPu	3'-AGAGAG(<i>aPu</i>)GGAAGG-5'
EDET E (1)	5'-FAM-GCTCAFGTACAGAGCTG-3'
$\Gamma K \Box I - \Gamma (I)$	3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-BHQ1-5'
EDET E (2)	5'-FAM-GCTCAFGTACAGAGCTG-3'
FKE1-F(2)	3'-BHQ1-CGAGTGCATGTCTCGAC-5'
UNC	5'-GCTCAUGTACAGAGCTG-3'
0/0	3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-5'
EDET U	5'-FAM-GCTCAUGTACAGAGCTG-3'
TKET-U	3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-BHQ1-5'
F-зонд	5' FAM GCTCAEGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCns BHO1 3'
(для APE1)	5-FAM-OCICAFOTACAOAOCIOTITICAOCICIOTACOTOAOCps-BIQI-5
U-зонд	
(для UNG2,	5' FAM GCTCALIGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCng BHO1 3'
SMUG1, MBD4,	5-raw-oereautaeaoaoerorrittieaoereroraeoeps-bilqi-5
TDG)	
εА-зонд	5'-FAM-GCTCAEAGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
(для AAG)	

Таблица 1. Олигодезоксирибонуклеотиды, входящие в модельные ДНК-субстраты

Tg-зонд	5'-FAM-GCTCATgGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
(для NEIL1,	
NTHL1)	
охоG-зонд	5'-FAM-GCTCAoxoGGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
(для OGG1)	
С-зонд	5'-FAM-GCTCACGTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
(для проверки	
неспецифического	
расщепления)	

ps - тиофосфатная группа



Рис. 1. Структуры модифицированных нуклеозидов и красителей, использованных в работе модельных субстратов: 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофуран (F), уридин (U), 2-аминопурин (aPu), $1, N^{6}$ -этеноаденозин (сA), тимидингликоль (Tg), 7,8-дигид ро-8-оксогуанозин (охоG), 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) и black hole quencher 1 (BHQ1).

Взаимодействие фермента с субстратом схематически можно представить в виде каскада последовательных превращений: образование первичного комплекса, взаимная подстройка, ведущая к образованию каталитически компетентного комплекса, необратимая каталитическая стадия с последующей диссоциацией комплекса фермента и продукта реакции для совершения следующего ферментативного цикла. Стадии узнавания и взаимной подстройки фермента и субстрата происходят на малых временах, поэтому для изучения кинетических характеристик этих процессов требуется использование «струевых» подходов, которые позволяют регистрировать процессы, начинающиеся в миллисекундном диапазоне времени. В настоящей работе использовали метод «остановленного потока», который сочетает в себе возможности быстрого смешения реагентов (мертвое время составляет ~ 1

мс) с возможностью регистрации конформационных переходов во взаимодействующих молекулах в режиме реального времени за счет изменения интенсивности флуоресценции. Конформационные переходы в молекуле фермента могут быть зарегистрированы по изменению интенсивности флуоресценции остатков триптофана, а в ДНК – путем введения в молекулу флуоресцентных аналогов оснований или FRET-пары.

Полученные кинетические кривые анализировали с помощью программ Origin 8.1. или DyanaFit (BioKin, Pullman, WA). Программа DynaFit осуществляет численное интегрирование дифференциальных уравнений, соответствующих кинетической схеме, с одновременной оптимизацией значений констант скорости и коэффициентов удельной флуоресценции всех флуоресцирующих частиц, входящих в данную схему (Кузнецов Н.А., дис. д-ра хим. наук, 2018).

2. Анализ влияния замен аминокислотных остатков активного центра APE1 в составе мутантных форм D210N, N212A, T268D, M270A и D308A на скорость и эффективность узнавания, связывания и превращения специфических субстратов

Аминокислотные остатки Asp210, Asp212, Thr268, Met270 и Asp308 (рис. 2a), важные для процессов связывания субстрата и катализа, путем сайт-направленного мутагенеза были заменены, чтобы получить следующие мутантные формы APE1: D210N, N212A, T268D, M270A и D308A. Относительную активность этих мугантных форм определяли, анализируя степень накопления продуктов реакции расщепления ДНК-субстрата методом гельэлектрофореза (рис. 26). Как видно из рис. 26, наиболее сильный эффект аминокислотной замены наблюдается в случае замен D210N и N212A, которые приводят к полной потере каталитической активности. Оба этих остатка, Asn212 и Asp210, координируют молекулу воды в активном центре фермента, которая действует как нуклеофил в реакции гидролиза АП-сайта в ДНК. Таким образом, полная потеря каталитической активности свидетельствует о разрушении сети контактов в активном центре фермента. В случае замены T268D происходило значительное (в 10 раз) снижение АП-эндонуклеазной активности по сравнению с ферментом дикого типа. Остаток Thr268 расположен в петле, взаимодействующей с ДНК со стороны малой бороздки рядом с АП-сайтом, а его боковая цепь координирует положение остатка Met270 относительно сахарофосфатного остова ДНК. Соответственно, аспартат в положении 268 должен влиять на связывание субстрата посредством стерических взаимодействий с боковой цепью Met270, которая в свою очередь встраивается в брешь, образовавшуюся в дуплексе ДНК после выворачивания поврежденного нуклеотида в активный центр фермента. При этом, показано, что активность мутантной формы М270А сходна с активностью фермента дикого типа. Кроме того, в экспериментальных условиях, использованных в наших исследованиях, мутантная форма АРЕ1 D308A проявляла активность практически идентичную активности фермента дикого типа.

Чтобы подробно охарактеризовать роль остатков Asp210, Asn212, Thr268, Met270 и Asp308 в образовании фермент-субстратного комплекса, был проведен кинетический анализ конформационных изменений фермента в ходе взаимодействия с субстратом в предстационарных условиях. Учитывая, что конформационные изменения фермента играют важную роль в распознавании повреждений и формировании каталитического комплекса, мы регистрировали флуоресценцию остатков Trp фермента для изучения процесса конформационной динамики белка при взаимодействии мутантных форм APE1 с F/G-субстратом (рис. 3а). Кинетику конформационных изменений ДНК, индуцированных взаимодействием с APE1 и его мутантными формами исследовали с использованием флуоресцентного аналога нуклеотида, aPu, расположенного напротив F-сайта (рис. 36), а также FRET-F(1)-субстрата, содержащего пару флуорофор/тушитель FAM/BHQ1 на разных концах дуплекса (рис. 3в).



Рис. 2. Рентгеноструктурные данные о контактах между аминокислотными остатками активного центра $A\Pi$ -эндонуклеазы 1 и ДНК-субстратом (а). Относительная активность APE1 дикого типа и его мутантных форм в расщеплении F-сайта FRET-F(1)-субстрата (б). Концентрация субстрата составляла 2 мкМ, фермента 0,05 мкМ, время реакции 30 с. Статистическая значимость отмечена * ($p \le 0,05$) и ** ($p \le 0,01$).



Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции Trp (a), аРи (б) и FAM (в) при взаимодействии APE1 WT и его мутантных форм D210N, N212A, T268D, M270A, D308A с ДНК-субстратами.

Для каждой мутантной формы были использованы все типы детекции и получены серии кинетических кривых при разных концентрациях взаимодействующих веществ. Математическая обработка экспериментальных данных методом нелинейной регрессии позволила определить минимальные кинетические схемы и рассчитать константы скорости для элементарных стадий, входящих в эти схемы. Так для неактивных мутантных форм D210N и N212A минимальная кинетическая схема содержит лишь стадии связывания ДНК-субстрата (стадии формирования комплексов (E•S)_i, Схема 1): двухстадийное в случае

регистрации изменения интенсивности флуоресценции Trp и FAM и одностадийное при взаимодействии с F/aPu-субстратом. Тогда как для активных мутантных форм M270A и D308A этот процесс дополнительно содержит необратимую каталитическую стадию с последующей диссоциацией комплекса фермент-продукт (Схема 1). При этом в процессе взаимодействия T268D с поврежденной ДНК изменение интенсивности флуоресценции остатков Trp и остатков aPu было незначительным, тогда как кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции FAM позволили предложить схему, включающую лишь одностадийное связывание ДНК-субстрата, каталитическую стадию и стадию диссоциации и рассчитать соответствующие кинетические параметры. Все полученные константы представлены в Таблицах 2-4.

Схема 1. Обобщенный кинетический механизм расщепления ДНК-субстрата APE1 WT и его каталитически активными мутантными формами

$$E + S \xrightarrow{k_1} (E \cdot S)_1 \xrightarrow{k_2} (E \cdot S)_2 \xrightarrow{k_{cat}} E \cdot P \xrightarrow{K_p} E + P$$

где Е — АРЕІ WT или его мутантные формы; S — ДНК-субстрат; (E•S)_i — комплексы фермент/субстрат; E•P-комплекс фермент/продукт; P — продукт реакции.

Таблица 2. Кинетические параметры стадий связывания и расщепления F/G -субстрата WT APE1 и его мутантными формами

Константы	WT	D210N	N212A	M270A	D308A
$k_1 \times 10^{-6}$, M ⁻¹ c ⁻¹	450±80	9,4±0,1	11,2±0,2	490±130	0,8±0,2
k_{-1}, c^{-1}	490±50	$1,00\pm0,04$	0,64±0,04	450±140	18±1
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,9	9,4	17,5	1,1	0,04
k_2, c^{-1}	150±30	1,8±0,1	0,12±0,06	59±3	_
k_{-2}, c^{-1}	16±3	0,43±0,01	1,5±0,1	5,31±0,32	—
K_2	9,4	4,2	0,08	11,1	_
$K_{\rm acc} \times 10^{-6}, {\rm M}^{-1}$	8,5	48,9	18,9	13,3	0,04
$k_{\rm cat},{\rm c}^{-1}$	1,0±0,1	—	_	0,35±0,01	2,3±0,5
$K_{\rm p} \times 10^6$, M	50±10	_	_	25±9	—

Таблица 3. Кинетические параметры стадий связывания и расщепления F/aPu-cy6cmpama WT APE1 или его мутантными формами

Константы	WT	D210N	N212A	M270A	D308A
$k_1 \times 10^{-6}$, M ⁻¹ c ⁻¹	55±7	36,6±0,8	6±2	5,2±1,2	2,5±1,0
k_{-1}, c^{-1}	5,9±0,9	$1,4\pm0,1$	3,6±1,2	50±20	20±3
$K_{\rm acc} \times 10^{-6}, {\rm M}^{-1}$	9,3±1,5	26,0±0,5	1,7±0,6	$0,10{\pm}0,07$	0,13±0,07
$k_{\rm cat},{\rm c}^{-1}$	1,5±0,04	_	_	3,7±2,4	4±2
$K_{\rm p} \times 10^6$, M	0,80±0,04	_	_	40±20	22±8

Таблица 4. Кинетические параметры стадий связывания и расщепления FRET-F(1)-субстрата WT APE1 и его мутантами

Константы	WT	D210N	T268D	M270A	D308A
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	64±3	71±1	1,02±0,34	5,1±0,3	38±1
k_{-1}, c^{-1}	7,2±0,5	5,9±0,3	40±3	11±1	15,6±0,4
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	9±1	12±1	0,02±0,01	0,46±0,12	2,4±0,1
k_2, c^{-1}	_	10,6±0,6	—	—	_
k_{-2}, c^{-1}	_	10,4±0,4	—	—	_
K_2	_	1±0,1	_	_	_
$K_{\rm acc} \times 10^{-6}, {\rm M}^{-1}$	9±1	24±2	0,02±0,01	0,46±0,12	2,4±0,1
$k_{\rm cat},{\rm c}^{-1}$	3,0±0,04		4,3±0,6	4,8±0,2	3,0±0,04
$K_{\rm p} \times 10^6, {\rm M}$	2,0±0,1		$1,4\pm0,8$	3,6±1,5	4,0±0,1

 $K_{\rm i} = k_{\rm i}/k_{\rm -i}, K_{\rm acc} = K_1 + (K_1 \times K_2)$

Анализ полученных кинетических параметров позволяет выявить влияние рассматриваемых аминокислотных остатков на отдельные стадии фермент-субстратного взаимодействия. Можно заключить, что замена T268D значительно нарушает этап связывания ДНК и формирования каталитически компетентного комплекса, Asn212 имеет решающее значение для стадии изгибания ДНК и катализа, замена D210N увеличивает эффективность связывания ДНК и полностью блокирует каталитическую функцию фермента, замена D308A снижает эффективность связывания ДНК, по-видимому, за счет нарушения координации иона Mg²⁺ и, наконец, что остаток Met270, участвующий в стабилизации вывернутого состояния поврежденного нуклеотида в активном центре фермента, играет важную роль на этапе образования каталитического фермент-субстратного комплекса.

3. Анализ функциональной роли заряженных аминокислотных остатков активного центра APE1

В комплексе APE1-ДНК присутствует множество контактов, образованных между ДНК и заряженными группами аминокислотных остатков ДНК-связывающего и активного центров. Для расчета значений р*Ка* всех аминокислотных остатков, входящих в состав APE1, д.ф.-м.н. Воробьевым Ю.Н. было проведено молекулярно-динамическое моделирование, которое показало, что микроокружение аминокислотных остатков в белке может существенно изменить их состояние ионизации, тем самым влияя на эффективность связывания ДНК и катализ.

Спектры кругового дихроизма, зарегистрированные при разных pH показали, что увеличение pH с 5,5 до 9,0 не приводит к значительным изменениям вторичной структуры белка. Однако, используя метод «остановленного потока», было обнаружено, что увеличение pH, приводящее к депротонированию ионогенных групп аминокислотных остатков, приводит к росту интенсивности флуоресценции Trp. И, наоборот, при переходе в более кислые значения pH, сопровождаемое протонированием фермента, интенсивность флуоресценции Trp снижается. Эти данные указывают на изменения в микроокружении остатков Trp, индуцированные изменением степени ионизации аминокислотных остатков и/или локальными конформационными перестройками этих участков в белке.

Чтобы определить эффективность связывания APE1 с ДНК-дуплексом, содержащим F-сайт, при различных значениях pH, была изучена кинетика образования ферментсубстратного комплекса и катализа с использованием метода «остановленного потока». Изменение интенсивности флуоресценции Trp в реакции APE1 с F/G-субстратом содержало несколько характерных фаз (рис. 4а), которые на основании ранее опубликованных данных, были идентифицированы как стадии связывания ДНК и катализа. Как видно из кинетических кривых (рис. 4а), эти стадии зависят от pH.

Для анализа конформационных изменений, происходящих в ДНК в ходе расщепления F-сайта, использовали субстрат, содержащий FRET-пару FAM/BHQ1. Как видно на рис. 46, интенсивность флуоресценции FAM при взаимодействии APE1 с FRET-F(1)-субстратом снижается на временном отрезке до 1 с (для рН 5,5) и растет на более поздних временах. Первоначальное уменьшение интенсивности сигнала отражает уменьшение расстояния между флуорофором (FAM) и тушителем (BHQ1), вызванное изгибанием ДНК при взаимодействии с APE1. При этом повышение рН вызывало визуальное исчезновение этой фазы из-за ускорения второй фазы процесса, приводящей к увеличению интенсивности FRET-сигнала. Рост интенсивности флуоресценции FAM в этой фазе, скорее всего, отражает высвобождение продукта расщепления из комплекса фермента с ДНК. Действительно, анализ накопления продукта в ПААГ показал, что скорость каталитической реакции сильно увеличивается с увеличением рН (рис. 4в). Кинетические кривые, полученные при анализе накопления продукта в ПААГ (рис. 4в), регистрации изменения флуоресценции Trp (рис. 4а) и FAM (рис. 4б) были обработаны с использованием экспоненциальных уравнений для вычисления наблюдаемых констант скорости, характеризующих зарегистрированные процессы. Зависимости полученных констант скорости от концентрации [H⁺] имеют гиперболический вид, свидетельствующий о равновесии протонированного и депротонированного состояний фермента. Гиперболический характер этих зависимостей позволил рассчитать значения р*Ka* фермента, которые влияют на различные этапы взаимодействия, а именно связывание ДНК и катализ (рис. 5).



Рис. 4. Влияние pH на взаимодействие APE1 с F/G- и FRET-F(1)-субстратом. Конформационные изменения APE1 (a) и ДНК-субстрата (б) в процессе их взаимодействия при разных значениях pH. (в) Кинетика накопления продукта реакции, зарегистрированная методом гель-электрофореза [pH 5,5 (\blacksquare), 6,0 (\bullet), 7,0 (\bullet), 7,5 (\star), 8,0 (\bigtriangledown), 8,5 (\checkmark) и 9,0 (\bullet)].



Рис. 5. Значения pKa фермента, рассчитанные из зависимостей концентрации $[H^+]$ от констант скорости, полученных при регистрации изменения интенсивности флуоресценции FAM, Trp и при анализе накопления продукта в ПААГ (в левой части рисунка в качестве примера представлена зависимость концентрации $[H^+]$ от констант скорости, полученных при анализе накопления продукта в ПААГ).

Было обнаружено, что стадия связывания ДНК, зарегистрированная с помощью FRET-анализа, происходит при значениях pH, близких к нейтральным (pKa 6,4-7,0). С другой стороны, связывание ДНК, исходя из данных изменения интенсивности флуоресценции Trp, вызванных конформационными изменениями в самом белке, протекает более эффективно при небольшом сдвиге в щелочную область pH (pKa 7,9). Следует отметить, что ДНК-связывающая область фермента содержит много основных аминокислотных остатков, таких как Lys и Arg, которые имеют более высокие значения pKa. Эти данные означают, что эффективность связывания ДНК не контролируется зарядом боковых радикалов аминокислотных остатков и, скорее всего, зависит от образования водородных связей, которые нарушаются с увеличением концентрации [H⁺]. Однако, наблюдаемая константа скорости каталитической стадии, рассчитанная из данных для изменения интенсивности флуоресценции FAM и Trp, имеет значение pKa от 8,5 до 9,0, демонстрируя сдвиг в ещё более щелочной диапазон значений pH.

По данным, полученным при молекулярно-динамическом моделировании, р*Ka* His309 в составе белка резко увеличена по сравнению с р*Ka* свободной аминокислоты (10,3 против 6,6), что может свидетельствовать о ключевой роли His309 в процессе катализа, как и предлагалось ранее в литературе. Тем не менее, другой щелочной аминокислотный остаток, Tyr171 (р*Ka* = 9,6), который может атаковать гидролизуемый фосфат в форме фенолята, также может отвечать за эффективность каталитической стадии.

Прямой анализ накопления продуктов реакции методом гель-электрофореза в ПААГ, который отражает суммарный процесс, включающий как этап связывания ДНК, так и катализ, демонстрирует среднее значение pKa = 7,9, что является оптимальным для эффективного протекания обеих стадий взаимодействия APE1 с ДНК. Поэтому совокупность полученных данных позволяет сделать заключение о том, что функциональные роли His-309 и Туг-171 на протяжении всей реакции находятся под контролем ионизированного состояния этих остатков. Можно предположить, что ионизированное состояние His-309 и Туг-171 может выступать в роли молекулярного переключения между альтернативными каталитическими механизмами, включающими эти остатки в протонированных или депротонированных формах.

4. Анализ влияния полиморфизмов APE1 на процессы узнавания, связывания и катализа

Выбор потенциально значимых полиморфных вариантов APE1 был осуществлен с использованием базы данных NCBI dbSNP. Критериями отбора SNP были такие параметры, как изменение химической природы боковой группы аминокислотного остатка; пространственное расположение этого остатка в области ДНК-связывающего и/или

активного центров фермента; и обнаружение данных SNP в опухолях. В соответствии с этими принципами было выбрано семь SNP (R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q и P311S) для изучения их влияния на активность APE1. Оценка степени изменения конформации белковой глобулы SNP-вариантов APE1 методом кругового дихроизма показала. что введенные аминокислотные замены не вносят значительных изменений в структуру. Для определения активности полиморфных вариантов АРЕ1 проводили анализ кинетики накопления продукта реакции в ПААГ. Результаты, полученные при взаимодействии ³²Р-меченого F/G-субстрата с мутантными формами фермента, позволили рассчитать значения наблюдаемой константы скорости (k_{obs}), которые представлены в виде гистограммы на рис. 6. Видно, что наиболее сильное влияние на ферментативную активность оказывает замена R237A (Arg237 коорлинирует расположение двух α-спиралей в белковой глобуле, $k_{obs} = 0.013$ с⁻¹ по сравнению с $k_{obs} = 0.08$ с⁻¹ для WT). Тогда как, замена G241R ведет к ~ 50% увеличению наблюдаемой константы скорости расшепления ДНК. Это увеличение активности может быть связано с появлением дополнительного положительного заряда на поверхности фермента, что приводит к более быстрому образованию первичного комплекса между белком и ЛНК. Все остальные варианты АРЕ1 обладали ферментативной активностью на 30-40% ниже, чем у дикого типа.

Для выяснения того, на какие этапы ферментативного процесса в большей степени влияет аминокислотная замена, ассоциированная с SNP, был проведен анализ конформационных изменений фермента и ДНК-субстрата при их взаимодействии. Конформационные переходы, происходящие в молекулах APE1 WT и его SNP-вариантов при взаимодействии с F/G-субстратом, регистрировали по изменениям собственной флуоресценции остатков Trp в белке. Чтобы определить влияние аминокислотных замен в APE1 на конформационные изменения ДНК-субстрата, проводили регистрацию изменения интенсивности флуоресценции остатка aPu, расположенного напротив F-сайта в F/aPuсубстрате. Кинетические кривые, представленные на рис. 7, свидетельствуют о многостадийности процесса.



Рис. 6. Относительная активность APE1 дикого типа и его SNP-вариантов в отношении F/Gсубстрата. Концентрация фермента была 0,1 мкМ, ДНК-субстрата 1 мкМ. Статистическая значимость отмечена * ($p \le 0,05$) и ** ($p \le 0,01$).

Анализ кинетических кривых, характеризующих взаимодействие SNP-вариантов APE1 с F/G-субстратом, показал, что минимальный кинетический механизм соответствует предложенному ранее (схема 1). А для взаимодействия с F/aPu-субстратом минимальный кинетический механизм описывается схемой 2. Константы скоростей из схемы 1 и 2, а также константы равновесия представлены в Таблицах 5 и 6.



Рис. 7. Изменения интенсивности флуоресценции Trp (a) и аРи (б) в процессе взаимодействия WT APE1 и его SNP-вариантов (R221C APE1, N222H APE1, R237A APE1, G241R APE1, M270T APE1, R274Q APE1, P311S APE1 с F/G- и F/aPu-субстратом, соответственно.

Схема 2. Кинетический механизм расщепления F/aPu-субстрата диким типом APE1 и его SNPвариантами

$$E + S \xrightarrow{k_1} (E \cdot S)_1 \xrightarrow{k_{cat}} E \cdot P \xrightarrow{K_p} E + P$$

 $E - APE1; S - F/aPu-субстрат; (E•S)_1 - комплекс фермент/субстрат; E•P - комплекс фермент/продукт; P - продукт реакции.$

Пошаговый анализ кинетических кривых, характеризующих взаимодействие фермента дикого типа или его SNP-вариантов с ДНК, позволяет заключить, что замена R221C влияет на стадию, которая ведет к образованию каталитического комплекса. В случае замены остатка Asn222, расположенного вблизи сайта связывания ДНК, наблюдается незначительное влияние на общую эффективность действия в следствии небольшого замедления скорости образования первичного комплекса. Замена R237A влияет не только на сталии узнавания и формирования каталитически-компетентного комплекса, но и ведет к 2х кратному снижению скорости каталитической стадии. Для фермента, несущего замену G241R, обнаружено увеличение константы скорости образования первичного комплекса между ферментом и субстратом, а также ускорение каталитической стадии, что и приводит к 50% увеличению активности, показанной методом гель-электрофореза. Замена Met270, функция которого заключается во встраивании в двойную спираль для стабилизации вывернутого состояния поврежденного нуклеотида, в меньшей степени оказывает влияние на связывание ДНК и катализ, но значительно стабилизирует комплекс фермент-продукт. А замены R274Q и P311S оказывали существенное влияние на формирование каталитически компетентного комплекса, приводя к снижению ферментативной активности этих SNPвариантов.

В целом полученные данные позволяют предположить, что природные варианты APE1 должны обладать каталитической активностью не ниже порогового значения, достаточного для полноценной ферментативной активности в клетке, так как нормальное функционирование APE1 жизненно важно для выживания организма.

Таблица 5. Кинетические параметры расщепления F/G-субстрата диким типом APE1 и его SNPвариантами

Константы	WT	R221C	N222H	R237A	G241R	M270T	R274Q	P311S
$k_1 \times 10^{-6}$, M ⁻¹ s ⁻¹	450±80	280±100	520±30	560±150	730±180	360±90	510±60	300±50
<i>k</i> ₋₁ , s ⁻¹	490±50	260±80	230±40	390±80	250±100	500±180	380±50	450±70
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,9±0,3	1,1±0,7	2,3±0,5	1,4±0,7	2,9±1,8	0,7±0,4	1,3±0,3	0,7±0,2
k ₂ , s ⁻¹	150±30	26±2	70±25	70±20	70±25	30±4	8,2±1,4	23±9
<i>k</i> ₋₂ , s ⁻¹	16±3	13±1	13±1	15±4	45±10	7,5±1,7	28±10	19±4
K_2	9,4±3,6	2,0±0,3	5,4±2,3	4,7±2,6	1,6±0,9	4,0±1,4	0,3±0,1	1,2±0,7
$K_{\rm acc}, { m M}^{-1}$	8,5×10 ⁶	2,2×10 ⁶	12,4×10 ⁶	6,6×10 ⁶	4,6×10 ⁶	2,8×10 ⁶	0,4×10 ⁶	0,8×10 ⁶
$k_{\rm cat},{ m s}^{-1}$	1,0±0,1	1,1±0,2	1,2±0,1	0,6±0,1	1,6±0,3	1,2±0,2	1,0±0,4	0,9±0,2
$K_{\rm p} \times 10^{6}$, M	50±10	25±10	8,9±1,3	580±170	110±40	2,0±0,2	480±80	130±80
$K_{\rm i} = k_{\rm i}/k_{\rm -i}$	$K_{\rm acc} = K_1 \times$	K_2						

in whether the second second

Таблица 6. Кинетические параметры расщепления F/aPu-субстрата диким типом APE1 и его SNPвариантами

Константы	WT	R221C	N222H	R237A	G241R	M270T	R274Q	P311S
$k_1 \times 10^{-6}$, M ⁻¹ s ⁻¹	55±7	12±5	42±7	17±5	36±2	15±5	6±2	5±2
k_{-1}, s^{-1}	5,9±0,9	26±17	9,6±2,9	4,3±0,8	16±2	2,4±0,4	20±3	19±7
$K_{\rm acc}, \mathrm{M}^{-1}$	9,3×10 ⁶	0,5×10 ⁶	4,4×10 ⁶	3,9×10 ⁶	2,2×10 ⁶	6,2×10 ⁶	0,3×10 ⁶	0,26×10 ⁶
$k_{\text{cat}}, \mathrm{s}^{-1}$	$1,49{\pm}0,04$	1,2±0,4	$1,8\pm0,1$	1,1±0,1	2,0±0,1	1,0±0,1	1,8±0,4	1,3±0,4
$K_{\rm p} \times 10^6$, M	0,80±0,04	50±25	2,8±1,2	220±80	2,2±0,6	9±2	1,4±0,2	60±15

Поскольку APE1, как известно, взаимодействует с другими ферментами пути BER, то следующим этапом наших исследований было изучение влияние SNP-ассоциированных замен в APE1 на процессы взаимодействия с другими участниками пути BER.

5. Анализ влияния SNP-ассоциированных замен APE1 на регуляцию активности фермента другими участниками BER

WT APE1 и семь его SNP-вариантов были использованы для выявления влияния ряда участников процесса BER, а именно ДНК-гликозилаз ААG, OGG1 и UNG2, ДНКполимеразы РОLВ и белковых факторов PCNA и XRCC1 (далее по тексту эффекторы) на эффективность расщепления F-сайта. Выбор эффекторов был обусловлен тем, что мы хотели проанализировать возможное влияние ферментов BER, стоящих как «выше» по цепи реакций (ДНК-гликозилазы), так и «ниже» (POLβ), а также белков-помощников (PCNA и XRCC1), для которых имеются литературные данные, свидетельствующие о взаимодействии с APE1, на активность дикого типа фермента и его SNP-вариантов. Для определения активности WT APE1 и его SNP-вариантов, использовали FRET-F(2)-субстрат (Таблица 1), содержащий F-сайт в качестве специфического поврежденного нуклеотида и красители FAM и BHQ1 на одном конце дуплекса. После расщепления, FRET-меченного ДНК-дуплекса ферментом АРЕ1 и последующей диссоциации комплекса фермент-продукт происходит разрушение пары FAM-BHQ1, которое ведет к росту интенсивности флуоресценции FAM до ~500 с. Наблюдаемые константы скорости kobs фазы роста были рассчитаны с использованием экспоненциальных уравнений. Наблюдаемые константы скорости, полученные в присутствии и в отсутствие эффекторного белка, использовали для расчета по

уравнению (1) относительной активности, характеризующей влияние дополнительного белка на активность в расщеплении F-сайта. Результаты сравнения представлены в виде гистограммы на рис. 8.

 $f = k_{\rm obs}^{\rm p} / k_{\rm obs}^{\rm o}$

(1)

где k_{obs}^p – наблюдаемая константа скорости в присутствии белка-эффектора, k_{obs}^o – наблюдаемая константа скорости расщепления субстрата ферментом APE1 в отсутствие белкаэффектора.

Для WT APE1 наибольший эффект стимуляции ($f \ge 2$) наблюдался в присутствии ОGG1, РОL^β или XRCC1. Сравнение данных, полученных для WT и SNP-вариантов, позволяет предположить возможную роль каждого измененного (в следствие возникновения SNP) аминокислотного остатка во взаимодействии с другими участниками пути BER. Снижение или усиление стимулирующего эффекта для каждого SNP-варианта может указывать на то, вовлечен исследуемый аминокислотный остаток во взаимодействие с другими белками или нет. При этом некоторые SNP-варианты проявляли устойчивую тенденцию стимулирующего эффекта независимо от того, какой из белков-эффекторов был задействован. Например, замена Arg237, расположенного на поверхности APE1, на Ala вызывает значительное увеличение активности расщепления F-сайта независимо от того, какой эффектор используется. Интересно отметить, что данные, полученные для R237A, свидетельствуют о том, что этот SNP-вариант обладает наименьшей каталитической активностью среди протестированных, но, с другой стороны, является одним из наиболее стимулируемых ферментов другими участниками пути BER. Анализ полученных результатов для варианта G241R показал, что появление остатка Arg на поверхности фермента вызывает заметное снижение влияния белков-эффекторов на относительную активность, что свидетельствует о том, что положительный заряд в этой области АРЕ1 негативно влияет на взаимолействие с другими белками. Лля варианта R221C, измененный аминокислотный остаток которого расположен на поверхности фермента вблизи сайта связывания ЛНК, наблюдается сниженный эффект воздействия по сравнению с WT APE1 в случае всех используемых белков-эффекторов. Тогда как при замене соседнего аминокислотного остатка N222H существенные отличия от WT были получены лишь в случаях с РОLВ, XRCC1 и PCNA, что может указывать на то, что Asn222 играет важную роль во взаимодействиях именно с этими ферментами. Все эти наблюдения подтверждают идею о том, что положительно заряженные остатки Arg. расположенные на поверхности белковой глобулы в разных областях АРЕ1, могут участвовать в белок-белковых взаимодействиях, но оказывают различное влияние на активность APE1. По сравнению с WT вариант P311S эффективно стимулировался AAG и PCNA ($f \ge 2$), но в меньшей степени другими эффекторами. Оба варианта фермента и M270T, и R274Q, несущие замены в сайте связывания ДНК, оказались наименее чувствительны к стимуляции белками BER по сравнению с другими SNP-вариантами. По-видимому, возможности стимулирующего эффекта белков BER в данном случае ограничиваются в следствие изменения сети контактов в области ДНК-связывающего сайта, вызванного этими заменами.



Рис. 8. Относительная активность фермента APE1 дикого типа и его SNP-вариантов в присутствии белков BER. Значение относительной активности рассчитывали по ур. (9), активность фермента в отсутствие белков-эффекторов соответствует 1. Эффекты, обнаруженные для дикого типа APE1 и его мутантных форм в присутствии белков BER, которые статистически отличались от таковых в отсутствие белков BER, отмечены * ($p \le 0,05$).

6. Анализ влияния полиморфизмов ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat} на процессы взаимодействия с ДНК-субстратом

Проведен анализ влияния SNP-ассоциированных аминокислотных замен в ДНКгликозилазах SMUG1 и MBD4^{cat} на ферментативную активность этих белков и белокбелковое взаимодействие выбранных SNP-вариантов с APE1. Стратегия выбора мутантных форм ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat} была такая же, как и в случае с APE1.

Анализ данных, полученных с помощью метода разделения продуктов реакции в ПААГ показал, что для двух полиморфных вариантов SMUG1 N244S и N248Y происходит увеличение активности (рис. 9), а для замен G90C и P240H значительно снижается эффективность удаления урацила. Замена аминокислотного остатка Pro240 играющего роль «клина», который встраивается в двойную спираль ДНК в районе поврежденного нуклеотида, на His, приводит к практически полной потере каталитической активности фермента. Согласно данным молекулярного моделирования такие последствия природной замены могут быть обусловлены тем, что в фермент-субстратном комплексе His240 образует сеть контактов с остатками Arg140 и Trp251, что может приводить к ограничению конформационной подвижности петли His239-Lys249 и тем самым препятствовать формированию каталитически компетентного состояния фермента.

Анализ SNP-вариантов ДНК-гликозилазы MBD4^{cat} выявил, что активность вариантов, содержащих замены S470L, G507S или R512W составляла не более 30% от активности фермента дикого типа, а замена H557D приводила к снижению активности на ~50% (рис. 9). Таким образом, для всех протестированных вариантов MBD4^{cat} наблюдается значительное снижение активности за счет нарушения локальных взаимодействий в области ДНК-связывающего сайта.



Рис. 9. Эффективность удаления урацила из FRET-U-субстрата под действиемSMUG1 и MBD4^{cat}. Сравнительный анализ полученных результатов представлен относительно активности соответствующего фермента дикого типа, принятой за 1. Статистические отличия эффектов, обнаруженных для мутантных форм SMUG1 и MBD4^{cat}, отмечены* ($p \le 0,05$) и ** ($p \le 0,01$).

Анализ конформационной динамики SNP-вариантов SMUG1 и MBD4^{cat} в комплексах с ДНК-субстратами позволил выявить, что повышенная ферментативная активность полиморфных вариантов SMUG1 N248Y и N244S обусловлена ускорением лимитирующей стадии процесса, а именно диссоциацией комплекса фермент-продукт. Для всех других SNP вариантов выявлена сниженная активность, либо за счет нарушения стадии связывания, либо уменьшения эффективности каталитической реакции.



Рис. 10. Степень расщепления, ³²Р-меченного U/G-субстрата ферментами SMUG1 (a) и MBD4^{cat} (б) дикого типа (WT) и их полиморфными вариантами в отсутствие или присутствии в реакционной смеси каталитически неактивной формы фермента APE1 D210N. ([U*/G-субстрата] = 200 нМ, [ДНКгликозилазы] = 80 нМ, [APE1 D210N] = 200 нМ, время реакции 30 мин). Статистические отличия эффектов, обнаруженных в присутствие APE1 D210N, отмечены * ($p \le 0,05$), ** ($p \le 0,01$), *** ($p \le 0,001$).

Для проверки эффекта АП-эндонуклеазы APE1 на SMUG1 и MBD4^{cat} была использована каталитически неактивная мутантная форма APE1 D210N, так как эксперименты с WT APE1 показали, что АП-эндонуклеаза способна расщеплять U-субстрат даже в отсутствие урацил-ДНК-гликозилаз. С использованием метода разделения реакционной смеси в ПААГ было установлено, что эффективность удаления урацила ферментами дикого типа и их полиморфными вариантами в присутствии и отсутствие APE1

отличается. Так, анализ накопления продуктов реакции, полученных при взаимодействии ³²P-меченного U/G-субстрата с ДНК-гликозилазой SMUG1 и его SNP-вариантами, прединкубированным с каталитически неактивной мутантной формой APE1 D210N показал, что для фермента дикого типа и варианта SMUG1 N248Y наблюдается увеличение скорости накопления продукта примерно на 25% (рис. 10а). Для полиморфных вариантов N244S, P240H и G90C достоверно значимых изменений не наблюдается.

При этом на активность фермента MBD4^{cat} дикого типа и SNP-варианта MBD4^{cat} H557D присутствие в реакционной смеси APE1 D210N оказывало еще больший стимулирующий эффект (рис. 10б). Как видно на рис. 10б скорость накопления продукта реакции увеличивается примерно в 4 и в 2,5 раза, соответственно для MBD4^{cat} дикого типа и MBD4^{cat} H557D. Для остальных протестированных мутантных форм MBD4^{cat} (R512W, S470L и G507S) изменения активности в присутствии APE1 D210N не наблюдалось.

Таким образом, показано, что присутствие в реакционной смеси АП-эндонуклеазы 1 может оказывать различное действие на полиморфные варианты ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat}, как стимулирующее, так и нейтральное.

7. Апробация тест-системы определения активности ключевых ферментовучастников BER в клеточных экстрактах

ДНК-зонды, используемые в данной работе для оценки активности некоторых ферментов процесса BER (рис. 11), представляли собой самокомплементарные олигодезоксирибонуклеотиды, несущие FRET-пару FAM/BHQ1 на концах цепи, а также содержащие в своем составе повреждение, специфичное для определенного фермента или группы ферментов (Таблица 1). В качестве поврежденных нуклеотидов использовали 7,8дигидро-8-оксогуанозин (охоG), тимидин-гликоль (Tg), 2'-дезоксиуридин (U), 1,N6этеноаденозин (єА) и F-сайт. Для предотвращения 3'-5'-экзонуклеазной деградации ДНКзондов в клеточном экстракте 3'-концевой межнуклеотидный фосфатный остаток был заменен на тиофосфатную группу (рѕ). Специфическое узнавание поврежденного нуклеотида и его удаление ДНК-гликозилазой с последующим расщеплением сахарофосфатного остова сопровождается значительным ростом сигнала флуоресценции FAM.



Рис. 11. Схематичное изображение подхода, используемого в тест-системе анализа активности ферментов BER в клеточных экстрактах (× - повреждение, специфичное для анализируемого фермента).

На примере нескольких линий клеток опухоли яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21 проведен сравнительный анализ активности тестируемых ферментов репарации (см. Таблицу 1) в общих клеточных экстрактах. Для каждой клеточной линии были получены кинетические кривые, характеризующие

расщепление ДНК-зондов, и определена начальная скорость. На основании полученных начальных скоростей расщепления ДНК-зондов и калибровочных кривых, полученных на очищенных препаратах ферментов, была проведена оценка концентраций целевых ферментов в исследуемых экстрактах (Таблица 7, рис. 12).

Таблица 7. Оценка концентраций целевых ферментов в клеточных экстрактах линий рака яичников человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21

Линия		Концентрация ферментов BER, нМ								
клеток	APE1	UDG	AAG	NEIL1/NTH1	OGG1					
TOV112	47 ± 5	$5,1 \pm 0,9$	$10,3 \pm 0,7$	42 ± 3	$12,6 \pm 1,5$					
TOV21	16 ± 3	$2,2 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,9$	$3,3 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,5$					
79	26 ± 4	$14,5 \pm 4,3$	$7,7 \pm 1,2$	19 ± 5	$5,8 \pm 1,2$					
SCOV3	20 ± 4	$3,7 \pm 0,9$	$8,0\pm0,5$	15 ± 3	$6,0\pm0,8$					
MESOV	33 ± 7	$5,5 \pm 1,4$	$7,3 \pm 0,8$	12 ± 5	$4,8 \pm 0,9$					
OVCAR3	31 ± 8	$4,1 \pm 0,8$	$6,8\pm0,6$	21 ± 5	$7,4 \pm 1,7$					



Рис. 12. Оценка концентрации целевых ферментов репарации в экстракте клеточных линий рака яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21.

Сравнение полученных ланных выявило значительную вариабельность концентрации ферментов репарации в различных клеточных линиях. Так, например, концентрация APE1 более чем в два раза выше в линии TOV112 по сравнению с линиями TOV21 и SCOV3. Необходимо также отметить, что клетки линии TOV112 содержали существенно более высокую концентрацию ферментов, отвечающих за удаление окисленных пиримидинов (Тд-зонд). При этом эффективность удаления алкилированных нуклеотидов на примере єА-зонда была примерно одинакова среди всех использованных клеточных линий. Однако, как было отмечено ранее, эффективность репарации алкилированных азотистых оснований, включая єА, может проходить по двум независимым путям, что осложняет интерпретацию полученных данных. Было обнаружено, что клетки линии TOV21 обладают пониженной репарационной активностью.

Полученные данные продемонстрировали перспективность предложенного метода, ввиду простоты его применения и анализа выходных результатов. Итоги данной работы могут стать основой для создания тест-системы анализа эффективности функционирования системы эксцизионной репарации оснований ДНК в живых организмах. Учитывая множество преимуществ флуоресцентных методов, существует большой потенциал для расширения данной области, предоставляющей столь необходимые инструменты для определения индивидуального репарационного статуса как организма в целом, так и отдельных органов и/или тканей.

выводы

- 1. Аминокислотные остатки активного центра АП-эндонуклеазы APE1 выполняют определенные функции в процессах формирования каталитически компетентного комплекса и гидролиза фосфодиэфирной связи в поврежденном ДНК-субстрате: Thr268 критически важен на этапе связывания ДНК и формирования каталитически-компетентного комплекса; Asn212 имеет решающее значение для стадии изгибания ДНК и катализа; Asp210, помимо катализа, играет важную роль на этапе связывания ДНК-субстрата; Asp308, ответственный за координацию иона Mg²⁺ в активном центре, также принимает участие на этапе связывания ДНК-субстрата; Met270 стабилизирует вывернутое состояние поврежденного нуклеотида в активном центре и важен на этапе формирования каталитического фермент-субстратного комплекса.
- 2. Скорость протекания стадий узнавания повреждения, формирования ферментсубстратного комплекса и катализа зависит от pH среды и увеличивается с ростом значения pH. Ионизация остатков Туг171 и His309, выполняющих каталитическую стадию гидролиза фосфодиэфирной связи, может играть роль молекулярного переключателя между альтернативными каталитическими механизмами, включающими эти остатки в протонированных или депротонированных формах.
- 3. Ферментативная активность протестированных природных полиморфных вариантов APE1 может быть, как выше (G241R), так и значительно ниже активности фермента дикого типа (R237A), но не может быть ниже порогового значения, необходимого для поддержания уровня репарации, достаточного для выживания организма. В то же время, природные полиморфизмы ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 могут приводить к значительному уменьшению ферментативной активности (SMUG1 G90C и P240H, MBD4cat S470L, G507S и R512W), что не приводит к негативным последствиям, вследствие того, что субстратная специфичность ДНК-гликозилаз может дублироваться другими ферментами этого класса.
- 4. Впервые выявлено влияние природных полиморфизмов АП-эндонуклеазы 1 на регуляцию её активности другими участниками BER: ДНК-гликозилазами OGG1, UNG2, AAG, ДНК-полимеразой POLβ и белковыми факторами XRCC1 и PCNA. Показано, что аминокислотные остатки, располагающиеся как на поверхности (Arg221, Arg237 и Gly241), так в глубине белковой глобулы APE1 (Pro311) оказывают влияние на эффективность стимулирования активности APE1; тогда как аминокислотные остатки, располагающиеся в ДНК-связывающем центре (N222, M270 и R274), наименее вовлечены в функциональные взаимодействия с протестированными белками-эффекторами. Влияние полиморфных замен R221C, R237A, G241R, N222H, M270T, R274Q и P311S на эффективность стимулирования APE1 может быть связано, как с изменением эффективности белок-белковых взаимодействий в случае поверхностных аминокислотных остатков, так и с изменением сродства APE1 к ДНК-субстрату и/или продукту.
- 5. Разработан и апробирован способ определения активности ДНК-гликозилаз и АПэндонуклеазы 1 в клетках человека с использованием флуоресцентно-меченных ДНК-зондов. Показано, что активность ферментов репарации в клеточных линиях рака яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21 значительно варьирует, что в перспективе может быть использовано в качестве прогностического маркера устойчивости отдельных типов опухолей к химиотерапевтическим препаратам.

Список публикаций по теме диссертации:

- Alekseeva I.V., Davletgildeeva A.T., Arkova A.T., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. The impact of single-nucleotide polymorphisms of human apurinic / apyrimidinic endonuclease 1 on specific DNA binding and catalysis // Biochimie. – 2019. – V. 163. – P. 73-83.
- Alekseeva I.V., Bakman A.S., Vorobiev I.N., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Role of ionizing amino acid residues in the process of DNA binding by human AP endonuclease 1 and in its catalysis // J. Phys. Chem. B. – 2019. – V. 123. - P. 9546-9556.
- Alekseeva I.V., Kuznetsova A.A., Bakman A.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The role of active-site amino acid residues in the cleavage of DNA and RNA substrates by human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // Biochim. Biophys. Acta - General Subjects. – 2020. –V. 1864. – P. 129718.
- Kladova O.A., Alekseeva I.V., Saparbaev M.K., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Modulation of the apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of human APE1 and of its natural polymorphic variants by base excision repair proteins // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21. – P. 7147.
- 5. Алексеева И.В., Бакман А.С., Яковлев Д.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Сравнительный анализ активности полиморфных вариантов урацил-ДНКгликозилаз человека SMUG1 и MBD4 // Молекулярная биология. – 2021. - Т. 55. - № 2. - С. 277-288.
- Алексеева И.В., Кузнецова А.А., Кладова О.А., Шендер В.О., Шнайдер П.В., Федорова О.С., Кузнецов Н.А. (2023) Разработка и апробация ДНК-зондов для определения активности ключевых ферментов пути эксцизионной репарации оснований ДНК в клетках человека // Молекулярная биология. - 2023. - Т. 57. - № 2. - С. 316-329.
- Алексеева И.В., Кузнецова А.А., Кладова О.А., Шендер В.О., Шнайдер П.В., Федорова О.С., Кузнецов Н.А. Способ определения активности ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК в клетках человека // (Патент № 2789867). – 2023.