

На правах рукописи

Deef

ДАВЛЕТГИЛЬДЕЕВА АНАСТАСИЯ ТИМУРОВНА

**КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АР-
ЭНДОНУКЛЕАЗ ИЗ РАЗНЫХ СТРУКТУРНЫХ СЕМЕЙСТВ**

1.5.4 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

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

Пометун Анастасия Александровна, д.х.н.

Федеральное государственное учреждение
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии» РАН, с.н.с.

Защита состоится «30» сентября 2022 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 www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «30» августа 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Большую часть модифицированных азотистых оснований, которые регулярно возникают в ДНК и способны как блокировать процессы репликации и транскрипции, так и приводить к возникновению мутаций, призвана удалять из генома система эксцизионной репарации оснований (BER). В этой системе одну из ключевых ролей играют апуриновые/апирииминовые (AP) эндонуклеазы. Основной биологической функцией этих ферментов считается гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от AP-сайта с образованием на 5'-конце 2'-дезоксирибозофосфатной группы и 3'-ОН группы (AP-эндонуклеазная активность). Известно также, что эти ферменты могут узнавать в качестве субстратов не только AP-сайты, но и ряд нуклеотидов, содержащих модифицированные азотистые основания. Кроме того, некоторые AP-эндонуклеазы обладают 3'-фосфодиэстеразной, 3'-5'-экзонуклеазной, 3'-фосфатазной и РНКазной активностями. Несмотря на большой интерес к выяснению механизмов, определяющих специфичность этих ферментов к широкому спектру различных поврежденных и неповрежденных нуклеотидов, вопрос о том, как конкретный нуклеотид распознается активным центром фермента, до сих пор остается неясным.

Целью данной работы было сравнительное исследование механизмов взаимодействия пяти AP-эндонуклеаз, принадлежащих к структурным семействам Xth и EndoQ, с модельными ДНК-субстратами, содержащими различные типы поврежденных нуклеотидов и обладающими неканонической структурой, методами предстационарной кинетики.

В ходе исследований решались следующие **задачи**:

- исследование кинетики конформационных изменений фермента hAPE1 человека и ДНК-субстратов, формирующих G-квадруплекс, а также содержащих выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи, в ходе осуществления ферментативного процесса для установления механизма взаимодействия hAPE1 с поврежденными ДНК-субстратами с неканонической структурой;
- исследование кинетики конформационных изменений ДНК-субстратов, содержащих различные поврежденные нуклеотиды, а также неповрежденной ДНК, в процессе взаимодействия с AP-эндонуклеазами, принадлежащими к структурному семейству Xth: Rrp1 из *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), xAPE1 из *Xenopus laevis* (*X. laevis*) и zAPE1 из *Danio rerio* (*D. rerio*), для определения общих закономерностей процессов узнавания поврежденных нуклеотидов ферментами структурного семейства Xth;
- анализ особенностей проявления субстратной специфичности фермента EndoQ из *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*) по отношению к таким повреждениям как остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофурана (синтетический аналог AP-сайта, F-сайт), уридин (U), остаток гипоксантина (Hx), 5,6-дигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина (α A) и этеноаденозин (ϵ A); исследование кинетики конформационных изменений ДНК-субстратов,

содержащих различные поврежденные нуклеотиды, а также неповрежденной ДНК, в процессе взаимодействия с EndoQ и выявление отличительных особенностей механизма узнавания поврежденных нуклеотидов ферментом EndoQ.

Научная новизна и практическая значимость работы. В представленной работе впервые было проведено кинетическое исследование взаимодействия AP-эндонуклеазы человека hAPE1 с ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой; AP-эндонуклеазы zAPE1 из *D. rerio*, хAPE1 из *X. laevis* и Rrp1 из *D. melanogaster*, принадлежащих к семейству Xth, и ДНК-эндонуклеазы EndoQ из *P. furiosus*, с ДНК-субстратами, содержащими различные типы повреждений, а также с неповрежденной ДНК. Показано, что ферменты структурного класса Xth схожим образом связывают F-содержащий ДНК-субстрат, в то время как связывание более объемных повреждений, таких как DHU, α A или ϵ A, требующее тонкой конформационной подстройки фермента и субстрата внутри активного центра, происходит с заметными отличиями в эффективности. В то же время характер взаимодействия фермента EndoQ с различными поврежденными ДНК-субстратами значительно отличается от ферментов семейства Xth, несмотря на перекрывающуюся субстратную специфичность. Сопоставление полученных в работе результатов с имеющимися литературными данными позволило установить механизм взаимодействия hAPE1 с поврежденными ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой, установить общие особенности механизма узнавания поврежденных нуклеотидов в ДНК ферментами, принадлежащими к структурным семействам Xth и EndoQ, и предложить модель кинетического механизма взаимодействия всех изученных ферментов с поврежденной ДНК.

Положения, выносимые на защиту

- 1) AP-эндонуклеаза hAPE1 катализирует гидролиз остатка тетрагидрофурана в петле или в ядре теломерного G-квадруплекса человека.
- 2) hAPE1 проявляет AP-эндонуклеазную активность по отношению к ДНК-субстратам с неканонической структурой, содержащим выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи; эффективность расщепления зависит от размера выпетливания поврежденной цепи и положения остатка тетрагидрофурана.
- 3) Механизм целевого распознавания нуклеотидов AP-эндонуклеазами, принадлежащими к семейству Xth, состоит из двух основных этапов: формирования первичного фермент-субстратного комплекса и его последующего скорость-лимитирующего превращения в каталитически компетентный комплекс.
- 4) Фермент Rrp1 обладает значительно более низкой скоростью каталитической реакции с ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана, а также более низкой скоростью образования комплексов с ДНК, содержащей альфа-аномер 2'-дезоксиаденозина, 2'-дезоксигуаноаденозин, 2'-дезоксигуанидин или 2'-дезоксигуано-5,6-дигидрогуанидин, и с неповрежденным ДНК-лигандом, в

сравнении с другими ферментами структурного семейства Xth, а именно hAPE1, zAPE1 и xAPE1.

5) Фермент EndoQ расщепляет одноцепочечную ДНК, содержащую остаток гипоксантина или урацила, более эффективно, чем двухцепочечную ДНК, содержащую те же повреждения; процесс взаимодействия EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими разные повреждения, имеет индивидуальные отличия, связанные с отдельными этапами последовательных взаимосогласованных конформационных перестроек в фермент-субстратном комплексе.

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

Апробация и публикация результатов. По материалам диссертации опубликовано 3 научных статьи, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты, изложенные в диссертации, были представлены на конференциях: 44^{ом} конгрессе FEBS (Краков, Польша, 2019), IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), конференции BGRS-SB (Новосибирск, 2020), 45^{ом} конгрессе FEBS (онлайн-конференция, 2021), конференции EEMGS (онлайн-конференция, 2021), III Объединенном Научном Форуме Физиологов, Биохимиков и Молекулярных Биологов (Дагомыс, 2021) и конференции BGRS-SB (Новосибирск, 2022).

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 183 страницах, содержит 48 рисунков, 9 схем и 9 таблиц. Библиография включает 347 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Структура модельных ДНК-субстратов и методы исследования

Для изучения взаимодействия фермента человека hAPE1 с ДНК-субстратами, обладающими неканонической структурой, в качестве модельных субстратов были использованы G-квадруплексы человека, а также поврежденные ДНК-дуплексы, содержащие выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи (табл. 1). В качестве повреждения, специфически расщепляемого ферментами в ходе AP-эндонуклеазной реакции, был использован остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофурана (синтетический аналог AP-сайта, F-сайт). Для регистрации локальных конформационных изменений ДНК-субстратов в ходе взаимодействия с ферментом в олигодезоксирибонуклеотиды была введена флуорофорная группа 2-аминопурин (aPu). Для регистрации «глобальных» конформационных изменений ДНК-субстратов в олигодезоксирибонуклеотиды вводили FRET-пару FAM/BHQ1. В качестве NIR-субстратов для ферментов типа APE1 были использованы ДНК-дуплексы, содержащие такие повреждения как U, DHU, αA, εA и Hx. Особенности неспецифического связывания были установлены при

анализе взаимодействий с неповрежденным ДНК-дуплексом. Структуры поврежденных нуклеотидов и флуорофорных групп, использованных в работе, представлены на рис. 1. Используемые в работе олигодезоксирибонуклеотиды приведены в табл. 1.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе		
Структура	Сокращение	Последовательность
1	2	3
G-квадруплекс	Q4	5' -TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-3'
	F14-Q4	5' -TTAGGGTTAGGGT F AGGGTTAGGGTT-3'
	F17-Q4	5' -TTAGGGTTAGGGTTAG F GTAGGGTT-3'
	FRET-Q4	5' - FAM -TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT- BHQ1 -3'
	FRET-F14-Q4	5' - FAM -TTAGGGTTAGGGT F AGGGTTAGGGTT- BHQ1 -3'
	F14-aPu13-Q4	5' -TTAGGGTTAGGG (aPu) F AGGGTTAGGGTT-3'
	F14-aPu15-Q4	5' -TTAGGGTTAGGGT F (aPu) GGGTTAGGGTT-3'
	FRET-F17-Q4	5' - FAM -TTAGGGTTAGGGTTAG F GTAGGGTT- BHQ1 -3'
	F17-aPu16-Q4	5' -TTAGGGTTAGGGTTA (aPu) F GTAGGGTT-3'
F17-aPu18-Q4	5' -TTAGGGTTAGGGTTAG F (aPu) TTAGGGTT-3'	
Структуры с выветливаниями	F/-Δ1	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGTA-TAGTCCCTTCACCC-5'
	F/-Δ2(5')	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGT--TAGTCCCTTCACCC-5'
	F/-Δ2(3')	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGTA--AGTCCCTTCACCC-5'
	F/-Δ3	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGT---AGTCCCTTCACCC-5'
	F/-Δ5	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCG-----GTCCCTTCACCC-5'
	F/+Δ3	5' - FAM -GCGCATACGGCAT- F -ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGTAGGGTAGTCCCTTCACCC-5'
	F/+Δ4	5' - FAM -GCGCATACGGCAT-- F -ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGTACGGGTAGTCCCTTCACCC-5'
	F/+Δ5	5' - FAM -GCGCATACGGCAT-- F --ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGTACGGGCTAGTCCCTTCACCC-5'
	F/+Δ7	5' - FAM -GCGCATACGGCAT--- F ---ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGTACCGGCCTAGTCCCTTCACCC-5'
Дуплекс	dsF/G28	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3' 3' -CGCGTATGCCGTAGTAGTCCCTTCACCC-5'
	F/G	5' -GCTCA F GTACAGAGCTG-3' 3' -CGAGTGCATGTCTCGAC-5'
	F-aPu	5' -GCTCA F (aPu) TACAGAGCTG-3' 3' -CGAGTG T ATGTCTCGAC-5'
	FRET-X/N X = F, U, Hx, αA, εA, DHU N = A, C, G, T	5' - FAM -GCTCA X GTACAGAGCTG-3' 3' -CGAGTNCATGTCTCGAC- BHQ1 -5'
	FRET-C/G	5' - FAM -GCTCACGTACAGAGCTG-3' 3' -CGAGTGCATGTCTCGAC- BHQ1 -5'
Одноцепоч. ДНК	ssF28	5' - FAM -GCGCATACGGCAT F ATCAGGGAAGTGGG- BHQ1 -3'
	FAM-X, X=F, Hx, U	5' - FAM -GCTCA X GTACAGAGCTG-3'
Экзо-субстрат	Exo-ДНК	5' -GTGTACCACCTGCTCACGTACAGAGCTG-3' 3' -CGAGTGCATGTCTCGAC- FAM -5'

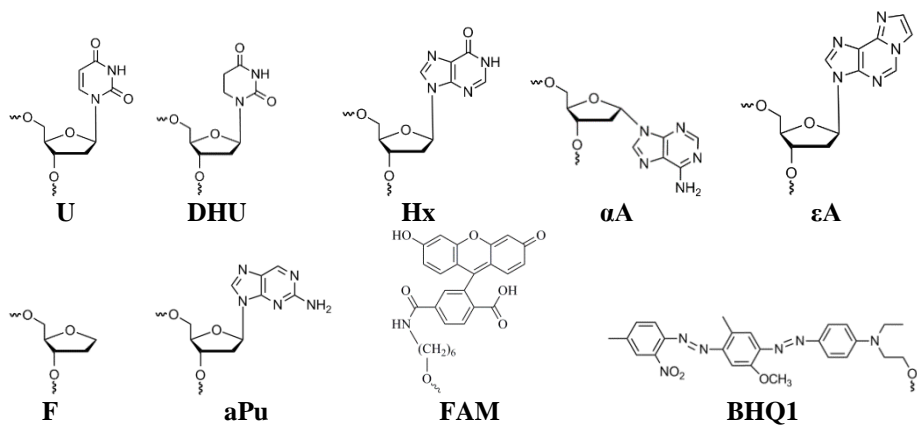


Рис. 1. Структуры поврежденных нуклеотидов и флуорофорных групп, использованных в работе: 2'-деоксиуридин (U), 2'-дезоксидигидроуридин (DHU), остаток гипоксантина (Hx), остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофурана (F), альфа-аномер 2'-деоксиаденозина (α A), 2'-дезоксиденозин (ϵ A), 2-аминопурин (aPu), 6-карбоксифлуоресцеин (FAM) и black hole quencher 1 (BHQ1).

Поскольку распознавание AP-эндонуклеазами специфического сайта в ДНК-субстрате происходит на малых временах и сопровождается конформационной подстройкой фермента и субстрата, для регистрации конформационных изменений исследуемых ферментов и ДНК-субстратов в ходе формирования комплекса был использован метод «остановленного потока» в сочетании с флуоресцентной детекцией сигналов FRET-пары или остатка aPu в субстрате. Кинетические кривые, характеризующие изменения FRET-сигнала в процессе реакции, свидетельствуют о последовательном формировании и превращении фермент-субстратного комплекса. Интенсивность флуоресценции aPu чувствительна к микроокружению этого остатка и позволяет регистрировать локальные конформационные изменения ДНК-субстрата в непосредственной близости от данного флуорофора. Полученные кинетические кривые анализировали с помощью программ Origin 8.1 или DynaFit (BioKin, Pullman, WA). Программа DynaFit осуществляет численное интегрирование системы 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 накопления продуктов расщепления поврежденных ДНК-субстратов с неканонической структурой методом гель-электрофореза

Для того чтобы установить активность фермента hAPE1 по отношению к поврежденным ДНК-субстратам, формирующим G-квадруплексные структуры,

регистрировали накопление продуктов расщепления 5'-FAM-меченых ДНК-субстратов FRET-Q4, FRET-F17-Q4 и FRET-F14-Q4. Топологическое строение G-квадруплексов, содержащих модифицированные нуклеотиды, было установлено методом кругового дихроизма. Показано, что фермент hAPE1 способен гидролизовать ДНК-квадруплексы с параллельной укладкой цепей, содержащих F-сайт в ядре или в петлевом участке квадруплекса. При этом установлено, что расщепление повреждения в ядре квадруплекса происходит в пять раз эффективнее, чем в петлевом участке (рис. 2А).

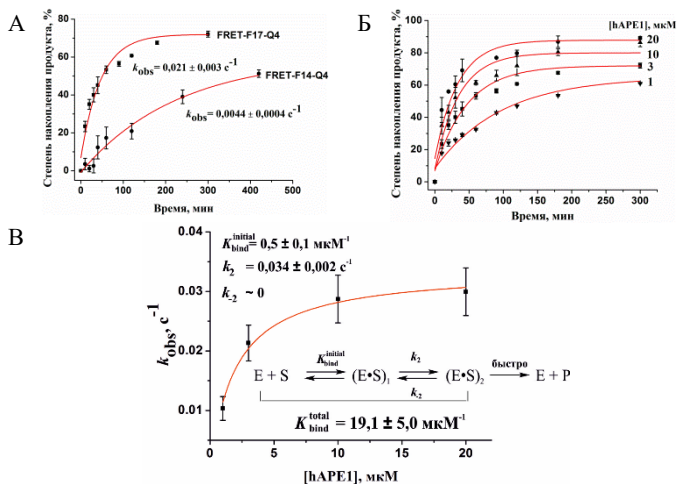


Рис. 2. Эндонуклеазная активность hAPE1 по отношению к поврежденным ДНК-субстратам с G-квадруплексной структурой. (А) Накопление продукта расщепления FRET-F17-Q4 или FRET-F14-Q4 во времени. [ДНК] = 1,0 мкМ, [hAPE1] = 3,0 мкМ. (Б) Влияние концентрации hAPE1 на эффективность расщепления субстрата FRET-F17-Q4. [FRET-F17-Q4] = 1,0 мкМ, итоговые концентрации hAPE1 указаны рядом с кривыми накопления продукта. (В) Зависимость наблюдаемых констант скорости k_{obs} от концентрации hAPE1.

Для количественной оценки параметров, характеризующих стадии связывания ДНК и катализ, были получены кинетические кривые накопления продуктов реакции при взаимодействии hAPE1 с FRET-F17-Q4-субстратом при различных концентрациях hAPE1 (рис. 2Б). Гиперболический тип зависимости значений наблюдаемых констант скорости k_{obs} накопления продукта от концентрации hAPE1 (рис. 2В) соответствует двухстадийной кинетической схеме, включающей быстрое первичное связывание субстрата. Значение равновесной константы K_{bind} , характеризующей формирование первичного фермент-субстратного комплекса ($0,5 \pm 0,1 \text{ мкМ}^{-1}$) указывает на эффективное связывание hAPE1 с поврежденным G-квадруплексом на ранней стадии взаимодействия. Константа скорости k_2 равна $0,034 \pm 0,002 \text{ c}^{-1}$, а значение

константы k_2 близко к нулю. Необходимо отметить, что константа скорости каталитической стадии, согласно литературным данным лежит в диапазоне 0,5-10 с^{-1} (Miroshnikova AD et al., Mol. Biosyst., 2016). А полученное значение константы скорости второй стадии k_2 , как минимум, в 10 раз меньше каталитической константы скорости, из чего можно сделать заключение о том, что константа скорости k_2 характеризует перестройки фермент-субстратного комплекса. Таким образом, формирование каталитически компетентного комплекса в случае G-квадруплексного субстрата является скоростью-лимитирующей стадией расщепления ДНК (рис. 2В).

Чтобы облегчить протекание второй скорость-лимитирующей стадии связывания субстрата с неканонической структурой и оценить влияние выворачивания целевого нуклеотида, был разработан ряд содержащих F-сайт ДНК-дуплексов с выпетливанием поврежденной (1-5 нуклеотидов) или неповрежденной (3-7 нуклеотидов) цепи. Было зарегистрировано накопление продуктов реакции расщепления в геле в ходе взаимодействия hAPE1 с ДНК-субстратами F/- Δ 1, F/- Δ 2(5'), F/- Δ 2(3'), F/- Δ 3, F/- Δ 5, F/+ Δ 3, F/+ Δ 4, F/+ Δ 5 или F/+ Δ 7, а также контрольными структурами: ДНК-дуплексом dsF/G28 и одноцепочечной ДНК ssF28. Начальную скорость расщепления оценивали как начальный наклон кинетической кривой, полученной в стационарных условиях (рис. 3).

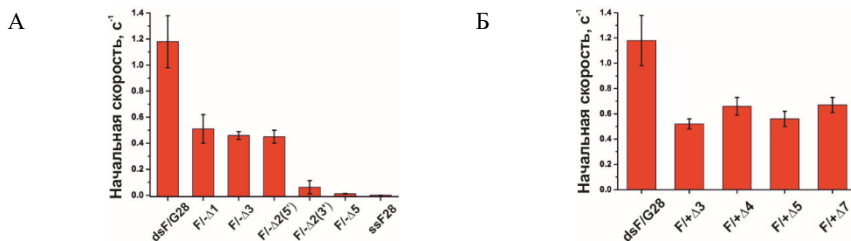


Рис. 3. Скорость расщепления ДНК-субстратов, содержащих выпетливание поврежденной (А) или неповрежденной (Б) цепи, ферментом hAPE1. Концентрации ДНК-субстратов и APE1 составляли 1,0 мкМ и 10,0 нМ, соответственно.

Было показано, что выпетливание 5-ти нуклеотидов поврежденной цепи в составе ДНК-дуплекса полностью блокирует формирование каталитически компетентного комплекса, в то время как эффективность расщепления ДНК не зависит от размера выпетливания неповрежденной цепи. Потеря активности в случае субстрата F/- Δ 2(3') указывает на то, что положение F-сайта в последовательности с выпетливанием двух нуклеотидов TF [F/- Δ 2(5')] или FA [F/- Δ 2(3')] также играет чрезвычайно важную роль в формировании каталитически компетентного комплекса.

3. Сравнительный анализ конформационных изменений G-квадруплексных ДНК-субстратов, содержащих FRET-пару или aPu

На основании сравнения чувствительности всех флуоресцентно-меченных вариантов G-квадруплексных ДНК-субстратов, содержащих FRET-пару или aPu (табл. 1), в качестве оптимальных моделей для анализа конформационных изменений поврежденного ДНК-квадруплекса в ходе взаимодействия с hAPE1 были выбраны структуры FRET-F17-Q4 и F17-aPu16-Q4. Кинетические кривые, характеризующие взаимодействие hAPE1 с данными субстратами, (рис. 4) соответствовали кинетической схеме, содержащей одну обратимую стадию связывания субстрата ферментом, и вторую скорость-лимитирующую стадию превращения фермент-субстратного комплекса в каталитически компетентный комплекс, в котором происходит быстрая реакция гидролиза (схема 1).

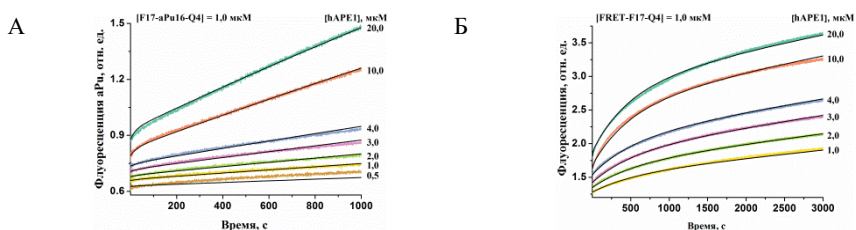


Рис. 4. Взаимодействие hAPE1 с повреждённым G-квадруплексом, содержащим F-сайт в 17^М положении. Кинетические кривые, зарегистрированные по изменению флуоресценции aPu (А) или FRET-пары (Б). [ДНК] = 1,0 мМ, концентрация hAPE1 указана на панели справа.

Различные типы регистрации приводили к различным значениям константы связывания $K_{bind}^{initial}$ (табл. 2), свидетельствуя о том, что первичный переходный комплекс (E•S), зарегистрированный различными способами, характеризует разную «глубину» процесса распознавания повреждения. В то же время константа скорости k_2 , характеризующая вторую медленную стадию связывания, приводящую к формированию каталитически компетентного комплекса, оставалась постоянной. Полученные данные указывают на то, что молекулярные процессы, которые протекают в ходе второго этапа формирования каталитического комплекса, являются ключевыми для распознавания поврежденного нуклеотида и, следовательно, облегчение их протекания значительно увеличит эффективность фермента. Более того, на этот этап процесса может оказывать влияние вторичная структура ДНК.

Схема 1



где E – фермент hAPE1, S – ДНК-субстрат, (E•S) – фермент-субстратный комплекс, P – продукт реакции.

Совокупность литературных данных и данных, полученных в ходе настоящего исследования, позволяет предложить общий механизм распознавания нуклеотидов-мишеней ферментом hAPE1. При связывании ДНК-субстратов, обладающих классической В-формой, в скорость-

лимитирующем этапе формирования каталитически активного комплекса важную роль играют последовательные конформационные изменения субстрата в ответ на индуцированные ферментом взаимодействия, такие как изгибание двойной спирали, выворачивание нуклеотида и локальное плавление ДНК. Облегчение некоторых из этих процессов при связывании с поврежденными и неповрежденными субстратами с неканонической структурой (квадруплексы, шпильки и другие) может приводить к увеличению эффективности расщепления таких субстратов.

Таблица 2. Константы скорости и равновесные константы, характеризующие взаимодействие hAPE1 с поврежденным G-квадруплексом

Константы	Метод		
	«Остановленный поток»		Гель-электрофорез
	FRET	aPu	
$K_{bind}^{initial}, \text{мкМ}^{-1}$	0,08±0,02	0,003±0,001	0,5±0,1
$k_2, \text{с}^{-1}$	0,03±0,01	0,03±0,01	0,034±0,002

4. Выбор AP-эндонуклеаз, обладающих высокой идентичностью С-концевого каталитического домена с hAPE1

Чтобы исследовать универсальность механизмов, обеспечивающих широкую субстратную специфичность hAPE1 для других ферментов структурного класса Xth, на основании высокой идентичности С-концевого каталитического домена с hAPE1 были выбраны три AP-эндонуклеазы из различных организмов: Rrp1 насекомого *D. melanogaster*, хAPE1 амфибии *X. laevis* и zAPE1 рыбы *D. rerio*. Сравнение последовательностей С-концевого каталитического домена отобранных AP-эндонуклеаз с ферментом человека показало, что почти все остатки аминокислот, участвующие в связывании ДНК, идентичны среди этих ферментов, за исключением замены Arg181Asn в случае Rrp1 (нумерация аминокислотных остатков соответствует последовательности hAPE1). Кроме того, интеркалирующие и каталитические остатки всех ферментов также идентичны, кроме единственной замены Asp70, координирующего ион Mg^{2+} , на Ala в случае Rrp1. Дополнительно у фермента хAPE1 два аминокислотных остатка, участвующих в связывании поврежденных оснований (Asn229 и Ala230), заменены на Thr и Pro.

5. Влияние концентрации одно- и двухвалентных ионов металлов на активность AP-эндонуклеаз

Проведен сравнительный анализ влияния одновалентных (K^+) и двухвалентных (Mg^{2+}) катионов металлов на AP-эндонуклеазную и 3'-5'-экзонуклеазную активности APE1-подобных ферментов (рис. 5). AP-эндонуклеазная активность всех четырех исследованных AP-эндонуклеаз имела зависимость от концентрации K^+ с широким диапазоном оптимальных концентраций (рис. 5А), что хорошо согласуется с ранее опубликованным исследованием связывания ДНК и катализа, осуществляемым ферментом hAPE1, в стационарных условиях (Miroshnikova AD et al., Mol Biosyst 2016).

Эффективность накопления продукта в присутствии Mg^{2+} для всех четырех ферментов росла вплоть до 1,0 мМ Mg^{2+} (рис. 5Б). Последующее ингибирование расщепления ДНК более высокими концентрациями Mg^{2+} , по-видимому, обусловлено неспецифическим связыванием ионов металла с ферментами, за исключением hAPE1, что приводит к дестабилизации каталитически активного состояния и уменьшению эффективности расщепления ДНК-субстрата. Интересно отметить, что несмотря на высокое сходство каталитических доменов всех ферментов 3'-5'-экзонуклеазную активность по отношению к модельной неповрежденной ДНК проявлял только hAPE1 (рис. 5В, Г).

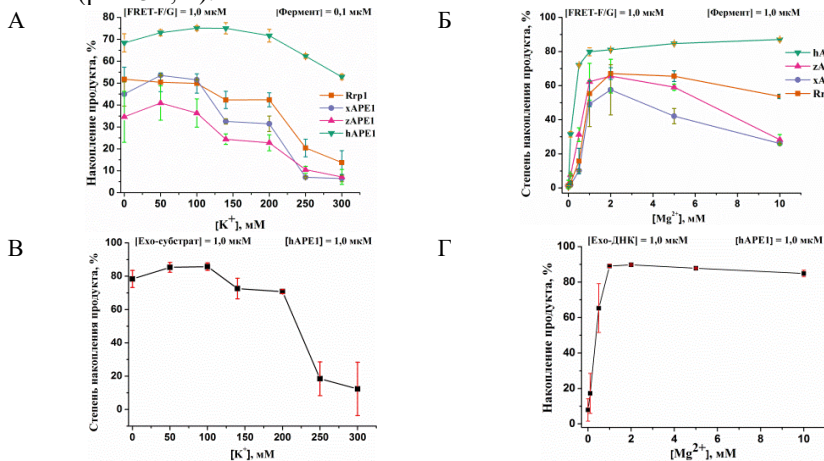


Рис. 5. Влияние концентрации K^+ (А) или Mg^{2+} (Б) на эффективность расщепления FRET-F/G-субстрата ферментами hAPE1, zAPE1, xAPE1 или Rrp1. [Фермент] = 0,1 мкМ (А), 1,0 мкМ (Б), [FRET-F/G] = 1,0 мкМ. Реакция проводилась в течение 20 с. Влияние концентрации K^+ (В) или Mg^{2+} (Г) на эффективность расщепления эхо-субстрата ферментом hAPE1. [hAPE1] = [эхо-ДНК] = 1,0 мкМ. Реакция проводилась в течение 30 мин.

6. Конформационные изменения F-содержащего ДНК-субстрата при взаимодействии с ферментами APE1-типа

На кинетических кривых, характеризующих взаимодействие zAPE1, xAPE1 или Rrp1 с F-содержащим ДНК-субстратом, можно наблюдать фазу быстрого и интенсивного роста FRET-сигнала, связанного с протеканием каталитической стадии ферментативного процесса, которой предшествовал короткий начальный участок без изменений сигнала (рис. 6). Далее все флуоресцентные кривые достигали плато. Ферментативное расщепление субстрата FRET-F/G при взаимодействии с ферментами zAPE1 и xAPE1 в целом завершалось к 1 с, а в случае взаимодействия с ферментом Rrp1 продолжалось вплоть до 100 с. Флуоресцентные кривые, полученные для всех трех AP-эндонуклеаз, были обработаны ур. (1), содержащим две экспоненты с амплитудами A_1 и A_2 , и константами скорости первого порядка k_{obs1} и k_{obs2} , соответственно:

$$y = A_1 \exp(-k_{\text{obs}1}t) + A_2 \exp(-k_{\text{obs}2}t) + \text{офсет} \quad (1)$$

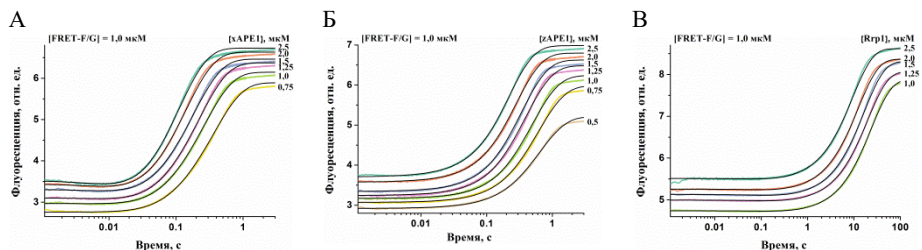


Рис. 6. Изменения интенсивности FRET-сигнала в ходе взаимодействия ферментов хAPE1 (А), zAPE1 (Б) или Rrp1 (В) с FRET-F/G. [FRET-F/G] = 1,0 мкМ, концентрации ферментов указаны на графиках.

На основании результатов математической обработки полученных данных была предложена кинетическая модель, отраженная в схеме 2. Все константы скорости и равновесные константы, соответствующие данному механизму, приведены в табл. 3. Необходимо отметить, что равновесная константа образования фермент-субстратного комплекса K_1 имела близкое значение для всех APE1-подобных ферментов. Каталитические константы скорости k_{cat} , характеризующие активность фермента хAPE1 ($3,7 \pm 0,1 \text{ c}^{-1}$) и zAPE1 ($2,2 \pm 0,1 \text{ c}^{-1}$), также имели близкое значение. При этом константа скорости k_{cat} , характеризующая каталитическое расщепление F-содержащего ДНК-субстрата ферментом Rrp1 оказалась примерно на два порядка меньше ($0,040 \pm 0,001 \text{ c}^{-1}$). Таким образом, несмотря на то, что полученные данные указывают на схожую эффективность связывания FRET-F/G-субстрата ферментами zAPE1, хAPE1 и Rrp1, они значительно отличаются между собой по способности катализировать расщепление целевого нуклеотида в ДНК.

7. Конформационные изменения неповрежденной ДНК при взаимодействии с ферментами APE1-типа

Чтобы исследовать стадию неспецифического связывания ДНК-дуплекса, не содержащего повреждений, были зарегистрированы изменения FRET-сигнала в процессе связывания FRET-C/G-лиганда в тех же условиях, которые использовали для анализа взаимодействия с FRET-F/G-субстратом. На начальном участке полученных кривых (рис. 7) происходило падение FRET-сигнала, за которым в случае ферментов zAPE1, hAPE1 и Rrp1, но не хAPE1 следовала фаза роста. Анализ флуоресцентных кривых, характеризующих связывание ДНК-лиганда AP-эндонуклеазами zAPE1 (рис. 7А), hAPE1 (рис. 7Б) и хAPE1 (рис. 7В), показал, что этот процесс в целом, завершается в течение 1 с. В то же время кривые, характеризующие взаимодействие с Rrp1 (рис. 7Г), достигали плато за временной промежуток более 10 с, что означает более медленное протекание процесса связывания ДНК этим ферментом, по

сравнению с остальными ферментами APE1-типа. Двухстадийное связывание неповрежденной ДНК ферментами hAPE1, zAPE1 и Rrp1 описывали кинетической схемой 3. Связывание ДНК, осуществляемое xAPE1, описывали схемой 4, которая содержит одну обратимую стадию. Константы скорости прямых и обратных реакций, соответствующих схемам 3 и 4, а также равновесные константы и суммарные константы ассоциации представлены в табл. 4.

Сравнение полученных констант скорости показывает, что формирование первичного фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_1$ было наиболее эффективным для фермента zAPE1, поскольку константа прямой реакции k_1 имеет самое большое значение среди исследуемых ферментов ($790 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$), а также ввиду того, что значение константы скорости обратной реакции k_{-1} [характеризующей стабильность комплекса $(E \cdot S)_1$] было относительно низким ($7,0 \text{ c}^{-1}$). Другим ферментом, имеющим низкое значение k_{-1} ($5,0 \text{ c}^{-1}$), был xAPE1. Тем не менее, константа прямой реакции k_1 в случае xAPE1 ($70 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) была примерно на один порядок меньше, чем для zAPE1, что дало константу ассоциации K_1 со значением $14 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для xAPE1, в то время как K_1 в случае zAPE1 была почти в восемь раз выше ($110 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Значения констант прямой реакции k_1 для Rrp1 и hAPE1 оказались довольно близки (120×10^6 и $180 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, соответственно), что привело к самым низким значениям констант первичного связывания ДНК, равным $2,0 \times 10^6$ и $6,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, соответственно.

8. Взаимодействие ферментов APE1-типа с ДНК-субстратами, содержащими NIR-повреждения

Эффективность расщепления ДНК-субстратов, содержащих αA , ϵA , DHU или U, AP-эндонуклеазами xAPE1, zAPE1 и Rrp1 была проанализирована методом гель-электрофореза (рис. 8). Полученные данные свидетельствуют о том, что все ферменты типа APE1 способны расщеплять ДНК-субстраты, содержащие ϵA , DHU или U. Неожиданно, было обнаружено, что Rrp1 не проявляет активности по отношению к ДНК, содержащей αA , в то время как xAPE1 и zAPE1 способны распознавать это повреждение в качестве субстрата. Эти данные указывают на то, что, несмотря на высокую идентичность аминокислотных остатков активного центра среди всех исследованных ферментов типа APE1, они обладают индивидуальными особенностями распознавания субстратов.

Для понимания индивидуальных отличий между AP-эндонуклеазами была исследована динамика конформационных превращений ДНК-субстратов FRET-DHU/G, FRET- $\epsilon\text{A}/\text{T}$, FRET- $\alpha\text{A}/\text{T}$ и FRET-U/G в процессе взаимодействия с xAPE1, zAPE1 и Rrp1 (рис. 9).

Таблица 3. Значения констант скорости и равновесных констант, характеризующих взаимодействие AP-эндонуклеаз с ДНК-субстратом FRET-F/G

Константа	zAPE1	xAPE1	Rrp1
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	3,8±0,4	15±2	3,3±0,2
k_{-1}, c^{-1}	5,6±0,7	32±3	3,6±0,4
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}^*$	0,7±0,2	0,5±0,1	0,9±0,2
$k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$	2,2±0,1	3,7±0,1	0,040±0,001

Приведенная ошибка является результатом математической обработки; значение $r^2 > 0,92$. * $K_1 = k_1/k_{-1}$

Таблица 4. Значения констант скорости и равновесных констант, характеризующих взаимодействия AP-эндонуклеаз с неповрежденным ДНК-лигандом FRET-C/G

Константа	zAPE1	xAPE1	Rrp1	hAPE1
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	790±60	70±5	120±30	180±20
k_{-1}, c^{-1}	7,0±0,8	5,0±2,0	60±20	30±7
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	110±20	14±7	2,0±1,0	6,0±2,0
k_2, c^{-1}	0,18±0,03	-	0,02±0,01	0,08±0,01
k_{-2}, c^{-1}	4,1±0,2	-	0,8±0,1	2,3±0,1
K_2	0,04±0,01	-	0,03±0,01	0,04±0,01
$K_{\text{ass}} \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	5,0±2,0	-	0,06±0,05	0,2±0,1

Значения представлены в виде: среднее значение ± стандартное отклонение (SD).

* $K_1 = k_1/k_{-1}$, $K_{\text{ass}} = K_1 \times K_2$

Схема 2

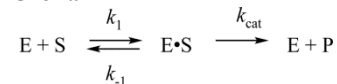


Схема 3

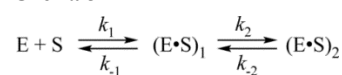
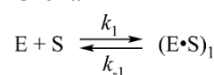


Схема 4



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_i$ – формы фермент-субстратного комплекса, P – продукт реакции.

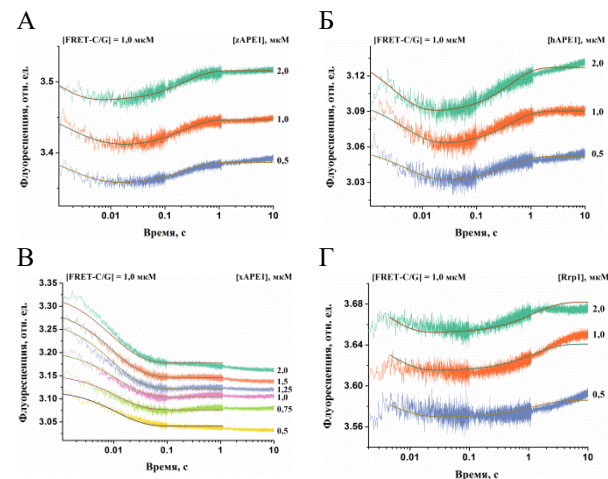


Рис. 7. Изменения FRET-сигнала в процессе взаимодействия фермента zAPE1 (А), hAPE1 (Б), xAPE1 (В) или Rrp1 (Г) с неповрежденной ДНК. [FRET-C/G] = 1,0 мкМ, концентрации ферментов показаны на графиках справа.

Рис. 8. Сравнение эффективности расщепления модельных ДНК-субстратов ферментами типа APE1. [Фермент] = [ДНК-субстрат] = 1,0 мкМ. T = 25°C, время реакции составляло 2 ч.

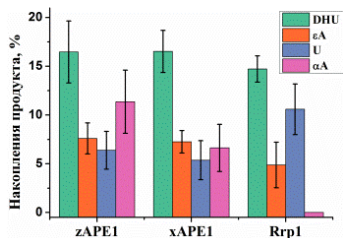
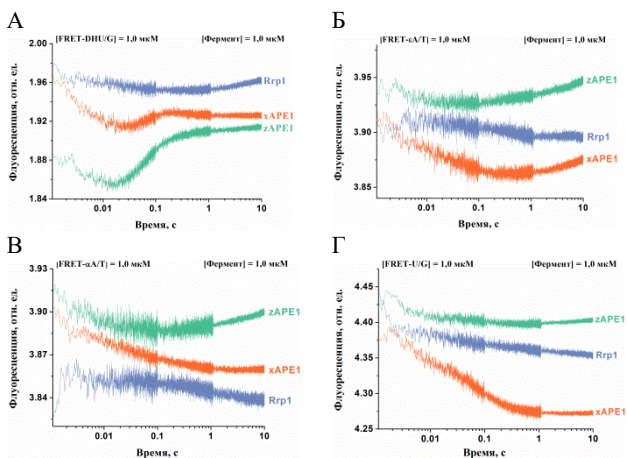


Рис. 9. Связывание ферментов типа APE1 с FRET-DHU/G (А), FRET-εA/T-субстратом (Б), FRET-αA/T-субстратом (В) или FRET-U/G-субстратом (Г). [Фермент] = [ДНК-субстрат] = 1,0 мкМ.



Все кинетические кривые, полученные в диапазоне времени до 10 с, отражают только процесс связывания ДНК и последующие конформационные превращения фермент-субстратного комплекса, но не каталитическую реакцию, поскольку, как было продемонстрировано с помощью гель-электрофореза, за данный временной интервал не происходило какого-либо значительного расщепления этих ДНК-субстратов.

Кинетические кривые, характеризующие конформационную динамику субстрата FRET-DHU/G, содержали фазу начального падения сигнала в интервале времени до 0,02 с в случае взаимодействия с zAPE1 и xAPE1, и до 0,3 с в случае Rrp1 (рис. 9А). Далее следовала фаза роста, причем для zAPE1 и xAPE1 изменения сигнала были более выражены. Ввиду низкой скорости формирования первичного фермент-субстратного комплекса, вторая стадия роста FRET-сигнала также оказалась значительно медленнее для Rrp1, по сравнению с xAPE1 и zAPE1. Флуоресцентные кривые, полученные для взаимодействия zAPE1 и xAPE1 с ДНК-субстратом, содержащим εA (рис. 9Б), также содержали фазу падения FRET-сигнала на начальном участке до 0,02 и 0,4 с, соответственно, с последующим ростом сигнала в случае zAPE1 и xAPE1. Взаимодействие Rrp1 с FRET-εA/T субстратом приводило только к падению

FRET-сигнала до 10 с. Полученные данные свидетельствуют, что основание ϵ A, будучи более объемным, чем DHU, распознается ферментами типа APE1 с разной эффективностью. Более того, данные, полученные для ДНК-субстратов, содержащих α A и U (рис. 9B, Г), показали более медленное формирование первичного комплекса для хAPE1 по сравнению с zAPE1.

Сложность полученных кинетических кривых и низкое соотношение сигнала к шуму в некоторых случаях не позволили провести математическую обработку кривых. Однако полученные данные по конформационной динамике меченых FRET-парой ДНК-субстратов, содержащих различные повреждения, а также неповрежденного ДНК-дуплекса, в процессе взаимодействия с ферментами zAPE1, хAPE1 и Rrp1, позволили детализировать модель распознавания субстратов ферментами типа APE1, предложенную для hAPE1. Константы связывания ДНК-субстрата, содержащего F-сайт, оказались близкими по значению для всех исследуемых AP-эндонуклеаз, что позволяет предположить, что распознавание AP-сайта данными ферментами, скорее всего, основывается на трех «китах»: пластичности ДНК, способности F-сайта выворачиваться из дуплекса и отсутствии стерических затруднений на пути выворачивания повреждения в активный центр фермента. Сравнительно низкая скорость каталитического расщепления F-сайта ферментом Rrp1 может быть связана с утратой остатка Asp70, участвующего в координации иона Mg^{2+} в активном центре фермента. Это предположение согласуется с данными об умеренном снижении AP-эндонуклеазной активности мутантной формы hAPE1, содержащей замену Asp70Ala (*Erzberger and Wilson, JMB, 1999*). Процесс связывания, приводящий к изменениям FRET-сигнала в ходе взаимодействия с неповрежденной ДНК и ДНК-субстратами, содержащими поврежденные основания, оказался наиболее быстрым в случае фермента zAPE1, при этом скорости этих процессов сравнимы с указанными ранее для hAPE1 (*Bulygin et al., Molecules, 2020; Kuznetsova et al., NAR, 2018*). Замены Asn229Thr и Ala230Pro в связывающем центре хAPE1 приводят к значительным различиям в скорости формирования первоначального комплекса с ДНК, содержащей α A, ϵ A или U, но не с ДНК, содержащей менее жесткий F-сайт или непланарное основание DHU. В случае с Rrp1, связывание неповрежденной ДНК и ДНК-субстратов, содержащих поврежденные основания, оказалось наиболее медленным. Несмотря на то, что замена Arg181Asn в ДНК-связывающем центре не оказывает влияния на формирование каталитически компетентного комплекса в случае ДНК, содержащей F-субстрат, можно предположить, что эта замена нарушает процессы неспецифического связывания и распознавания более крупных повреждений.

В целом, полученные данные, подкрепляют идею, согласно которой NIR-активность AP-эндонуклеаз является общей функцией этого класса ферментов. При этом, можно предположить, что индивидуальные отличия между ферментами связаны с тем, что в процессе распознавания различных

поврежденных нуклеотидов, ДНК-связывающий сайт ферментов типа APЕ1 должен претерпевать конформационные изменения для того чтобы разместить нуклеотид, содержащий поврежденное основание, и этот процесс зависит от структуры поврежденного нуклеотида, а положение различных оснований в связывающем кармане, стабилизированное индивидуальными контактами, может отклоняться от оптимального положения, в котором расстояние между расщепляемой фосфатной группой и каталитическими аминокислотными остатками достаточно для эффективного катализа.

9. Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза EndoQ из *Pyrococcus furiosus*

Недавно у гипертермофильных архей *P. furiosus* была обнаружена новая ДНК-эндонуклеаза EndoQ. Субстратная специфичность и природа каталитического расщепления поврежденной ДНК для EndoQ имеют много общего с другими ДНК-эндонуклеазами, а именно AP-эндонуклеазами из семейств Xth и Nfo (*Shiraishi et al., NAR, 2015; Shiraishi and Iwai, JB, 2020*). С учетом того, что новый фермент не обладает структурным сходством с какими бы то ни было известными AP-эндонуклеазами (*Miyazono et al., 2018*), семейство ферментов EndoQ, возможно, представляет собой новый класс мультифункциональных AP-эндонуклеаз. В связи с этим в данной работе выполнено исследование механизма взаимодействия фермента EndoQ с модельными поврежденными и неповрежденными ДНК-субстратами и проведено сравнение с данными о механизме действия представителей структурного семейства Xth.

Чтобы определить влияние природы основания комплементарной цепи на эффективность расщепления ДНК, содержащей в качестве повреждения F-сайт, Hx или U, ферментом EndoQ, были выполнены эксперименты по регистрации накопления продуктов реакции с использованием 17-звенных ДНК-дуплексов, содержащих одно из перечисленных повреждений напротив A, C, G или T. Полученные данные свидетельствуют о том, что эффективность расщепления субстратов ферментом EndoQ, визуализированная в геле, уменьшалась в следующем порядке: FRET-F/A > FRET-F/T > FRET-F/C > FRET-F/G > FAM-F(о.ц.); FAM-Hx(о.ц.) > FRET-Hx/G > FRET-Hx/T > FRET-Hx/A > FRET-Hx/C и FAM-U(о.ц.) > FRET-U/G ≈ FRET-U/C > FRET-U/T > FRET-U/A (рис. 10). Установлено, что Hx и U в о.ц. ДНК оказались наиболее эффективно расщепляемыми субстратами для EndoQ, по сравнению со всеми четырьмя вариантами в д.ц. ДНК, в то время как о.ц. ДНК, содержащая F-сайт, оказалась крайне неподходящим субстратом, что согласуется с данными, полученными ранее (*Shiraishi et al., NAR, 2015; Shiraishi and Iwai, JB, 2020*). Данные, полученные для FRET-F/N-субстратов, позволяют заключить, что основание, расположенное напротив поврежденного нуклеотида, оказывает влияние на эффективность расщепления ДНК даже в случае отсутствия поврежденного основания, которое может образовать комплементарные контакты.

Чтобы оценить влияние комплементарного нуклеотида на кинетику взаимодействия EndoQ с поврежденными ДНК-субстратами, была исследована

динамика конформационных превращений ДНК-субстратов, содержащих F-сайт (рис. 11А), Hx (рис. 11Б) или U (рис. 11В), напротив одного из четырех нуклеотидов. Полученные кинетические кривые были обработаны экспоненциальным уравнением (2), в котором A_i – амплитуда, а k_{obsi} – наблюдаемая константа скорости первого порядка, при этом число экспоненциальных членов зависело от кривой и составляло от 2 до 4.

$$y = \sum_{i=1}^n A_i \exp(-k_{obsi}t) + C \quad (2)$$

Наблюдаемые константы скорости, полученные в результате математической обработки, позволили провести сравнительный анализ влияния комплементарного нуклеотида на кинетику взаимодействия и выбрать субстраты FRET-F/G, FRET-Hx/A и FRET-U/A в качестве оптимальных моделей для дальнейшего исследования кинетики взаимодействия EndoQ с поврежденными ДНК-субстратами.

Рис. 10. Эффективность расщепления модельных одно- и двуцепочечных ДНК-субстратов, содержащих различные нуклеотиды напротив повреждения. [EndoQ] = [ДНК-субстрат] = 1,0 мкМ. T = 40°C, время реакции составляло 3 мин. Значения степени накопления продукта представлены как среднее от трех экспериментальных значений \pm SD.

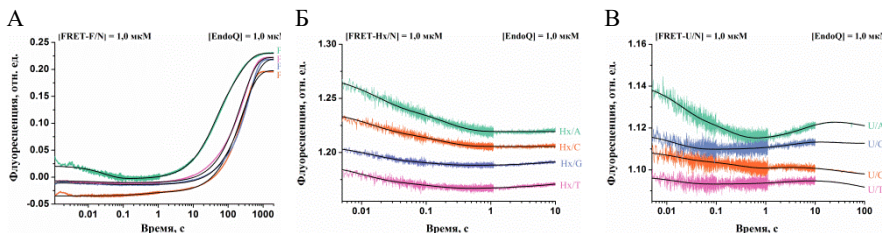
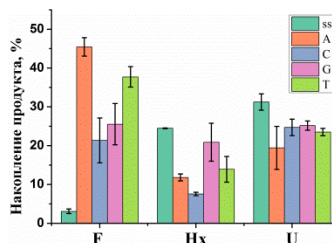


Рис. 11. Изменения интенсивности FRET-сигнала в процессе взаимодействия фермента EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими F-сайт (А), Hx (Б) или U (В) напротив А, С, G или Т. [EndoQ] = [ДНК] = 1,0 мкМ, температура составляла 40°C. Индивидуальные кривые были обработаны уравнением, в котором, в зависимости от кривой, было 2, 3 или 4 экспоненты.

10. Кинетические параметры изменений конформации ДНК-субстратов, содержащих F-сайт, U или Hx, в процессе их взаимодействия с EndoQ

Кинетические кривые, характеризующие взаимодействие фермента EndoQ с поврежденными ДНК-субстратами, содержат начальное падение флуоресценции и последующий высокоамплитудный рост, который заканчивается к 1300 с для F-сайта, и длится вплоть до 4000 с для Hx и U (рис.

12). Начальный участок кинетических кривых включает две фазы падения FRET-сигнала в случае Hx (рис. 12Б), а для U-содержащего ДНК-субстрата дополнительно содержит фазу падения и последующего роста FRET-сигнала (рис. 12В).

Конформационные изменения субстрата FRET-F/G в процессе взаимодействия с ферментом EndoQ соответствовали трехстадийному механизму реакции (схема 5, табл. 5). Первая и вторая стадии схемы 5 соответствуют процессам связывания ДНК-субстрата и формирования каталитически активного фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_2$. Последующая необратимая стадия отражает комбинацию процесса каталитического расщепления субстрата и диссоциации комплекса фермента с продуктом. Необходимо отметить, что значение константы скорости k_{cat} , полученное для FRET-F/G-субстрата в данной серии экспериментов, имеет близкое значение с наблюдаемой константой скорости, полученной для этого же субстрата путем экспоненциальной обработки ($0,008 \text{ с}^{-1}$ и $0,0031 \text{ с}^{-1}$, соответственно).

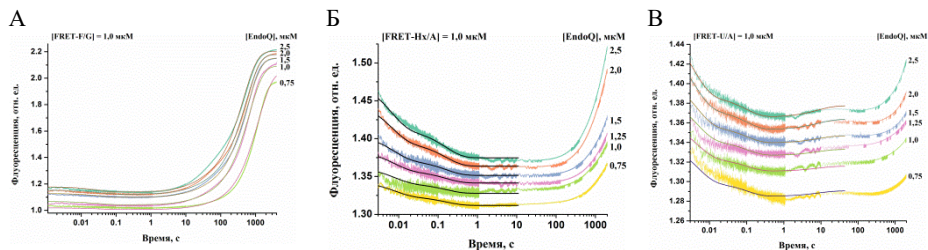


Рис. 12. Изменения FRET-сигнала в ходе взаимодействия фермента EndoQ с ДНК-субстратами FRET-F/G (А), FRET-Hx/A (Б) или FRET-U/A (В). $[ДНК] = 1,0 \text{ мкМ}$, концентрации фермента указаны на панели справа.

Схема 5

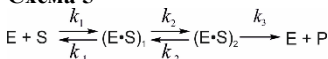


Схема 6

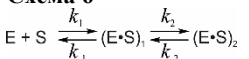
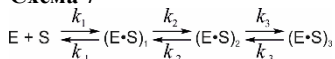


Схема 7



где E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_i$ – формы фермент-субстратного комплекса, P – продукт реакции.

Минимальный кинетический механизм, соответствующий конформационным изменениям ДНК-субстрата FRET-Hx/A при взаимодействии с EndoQ, содержал две обратимые стадии (схема 6, табл. 5), а конформационным изменениям FRET-U/A соответствовал трехстадийный механизм (схема 7, табл. 5). Сравнение констант скорости показывает, что формирование первичного фермент-субстратного комплекса $(E \cdot S)_1$ было менее эффективным для субстрата FRET-Hx/A, по сравнению с FRET-U/A. При этом значения константы K_1 были меньше $1 \times 10^6 \text{ М}^{-1}$ для всех трех исследуемых повреждений, что указывает на нестабильность первичного фермент-субстратного комплекса. Формирование второго комплекса $(E \cdot S)_2$ происходило

примерно в пять раз быстрее для FRET-U/A-субстрата, по сравнению с FRET-Nx/A, хотя общая стабильность этого комплекса была довольно низкой для обоих субстратов. При этом стабильность комплекса (E•S)₂ в случае FRET-F/G-субстрата оказалась существенно выше, и значение равновесной константы K_2 составило 5. Кроме того, в отличие от всех остальных ДНК-субстратов, взаимодействие EndoQ с FRET-U/A-субстратом характеризовалось наличием третьей стадии роста FRET-сигнала, протекающей в период с 1 с по 40 с, и соответствовавшей формированию фермент-субстратного комплекса (E•S)₃. Эта стадия, скорее всего, отражает «релаксационный» процесс, связанный с увеличением расстояния между флуорофором и тушителем.

Таблица 5. Константы скорости прямых и обратных реакций, а также равновесные константы, характеризующие взаимодействие фермента EndoQ с ДНК-субстратами FRET-F/G, FRET-Nx/A или FRET-U/A, полученные в результате обработки соответствующих кинетических кривых методом (рис. 12) нелинейной регрессии

Константы	F/G	Nx/A	U/A
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	$1,4 \pm 0,5$	17 ± 3	74 ± 7
k_{-1}, c^{-1}	26 ± 7	99 ± 7	100 ± 20
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	$0,05 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,04$	$0,8 \pm 0,2$
k_2, c^{-1}	$0,17 \pm 0,04$	$0,8 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,5$
k_{-2}, c^{-1}	$0,032 \pm 0,005$	$6,2 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,3$
K_2	5 ± 2	$0,13 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,08$
k_3, c^{-1}	-	-	$0,10 \pm 0,02$
k_{-3}, c^{-1}	-	-	$0,096 \pm 0,004$
K_3	-	-	$1,0 \pm 0,3$
$k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$	$0,008 \pm 0,001$	-	-

Значения представлены в виде: среднее значение \pm стандартное отклонение. * $K_i = k_i/k_{-i}$

Таким образом, данные конформационной динамики ДНК-субстратов в процессе взаимодействия с EndoQ позволили предложить постадийный кинетический механизм реакции и указывают на формирование не менее двух фермент-субстратных комплексов, необходимых для достижения каталитически-компетентного состояния. На первой стадии происходит формирование неспецифического фермент-субстратного комплекса, в котором ДНК в значительной мере изгибается и создается структурное напряжение, необходимое для выворачивания целевого нуклеотида в активный центр. Эта стадия, судя по всему, является универсальной для всех исследованных ДНК-субстратов, в том числе нерасщепляемых. Вторая стадия механизма характеризует процесс размещения целевого нуклеотида в специфическом распознающем кармане, и образование водородных связей между аминокислотными остатками, формирующими карман, и поврежденным нуклеотидом. При этом структурные особенности EndoQ и специфика его взаимодействия с ДНК-субстратами, содержащими F-сайт или дезаминированные основания, такие как Nx и U, указывают на то, что, в отличие от AP-эндонуклеаз структурного семейства Xth субстратная

специфичность нового класса ферментов является более строгой и во многом зависит от формирования специфических контактов с поврежденным азотистым основанием в кармане, связывающем повреждение.

ВЫВОДЫ

1) Показано, что AP-эндонуклеаза hAPE1 расщепляет теломерный G-квадруплекс человека, содержащий синтетический аналог AP-сайта (остаток тетрагидрофурана) в петле или в G-ядре квадруплексной структуры. Расщепление повреждения в петлевой области G-квадруплекса происходит менее эффективно, чем в G-ядре.

2) Установлено, что активность hAPE1 по отношению к ДНК-субстратам с неканонической структурой, содержащим выпетливание поврежденной или неповрежденной цепи зависит от размера выпетливания поврежденной цепи и положения остатка тетрагидрофурана. Впервые показано, что выпетливание 5-ти нуклеотидов поврежденной цепи в составе ДНК-дуплекса блокирует формирование каталитически компетентного комплекса, в то время как зависимость эффективности расщепления ДНК от размера выпетливания неповрежденной цепи отсутствует, что подтверждает способность фермента размещать большие нуклеотидные фрагменты за пределами своего активного центра.

3) Предложен и верифицирован механизм целевого распознавания нуклеотидов AP-эндонуклеазами, принадлежащими к семейству Xth, который состоит из двух основных этапов: формирования первичного фермент-субстратного комплекса и его последующего скорость-лимитирующего превращения в каталитически компетентный комплекс. При сравнительном анализе четырех гомологичных ферментов структурного семейства Xth установлено, что Rrp1 обладает значительно более низкой скоростью каталитической реакции с ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана, а также более низкой скоростью образования комплексов с ДНК, содержащей альфа-аномер 2'-дезоксаденозина, 2'-дезокситеноаденозин, 2'-дезоксигуанидин или 2'-дезоксигуанидин, и с неповрежденным ДНК-лигандом, в сравнении с hAPE1, zAPE1 и xAPE1.

4) Впервые для фермента EndoQ, структурно отличающегося от ферментов типа APE1, предложена кинетическая модель взаимодействия с ДНК-субстратом, характеризующая стадии распознавания поврежденных нуклеотидов. Показано, что взаимодействие EndoQ с ДНК-субстратами, содержащими остаток тетрагидрофурана, урацила или гипоксантина, протекает со значительными различиями в характере конформационных изменений модельных ДНК-субстратов в зависимости от типа повреждения. Установлено, что EndoQ расщепляет одноцепочечную ДНК, содержащую остаток гипоксантина или урацила, более эффективно, чем двухцепочечную ДНК, содержащую те же повреждения. В то же время EndoQ практически не проявляет каталитической активности по отношению к одноцепочечной ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана.

Список основных публикаций по теме диссертации

- 1. Davletgildeeva A.T.,** Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 toward damaged DNA and native RNA with non-canonical structures // *Front. cell Dev. Biol.* – 2020. – V. 8. – P. 590848.
- 2. Davletgildeeva A.T.,** Ishchenko A.A., Saparbaev M., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The Enigma of substrate recognition and catalytic efficiency of APE1-like enzymes // *Front. cell Dev. Biol.* – 2021. – V. 9. – P. 617161.
- 3. Davletgildeeva A.T.,** Kuznetsova A.A., Novopashina D.S., Ishchenko A.A., Saparbaev M., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Comparative analysis of exo- and endonuclease activities of APE1-like enzymes // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – № 5. – P. 2869.