

УДК 577.15:544.3

# Термодинамические параметры взаимодействия эндонуклеазы VIII с поврежденной ДНК

О. А. Кладова<sup>1</sup>, Н. А. Кузнецов<sup>1,2\*</sup>, О. С. Федорова<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

\*E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.10.2018

Принята к печати 28.01.2019

**РЕФЕРАТ** Проведен термодинамический анализ взаимодействия эндонуклеазы VIII (Endo VIII) с модельными ДНК, содержащими поврежденные нуклеотиды, такие, как 5,6-дигидроуридин и 2-гидрокси-3-гидрокситетрагидрофуран (F-сайт). Методом «остановленного потока» при разных температурах с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции остатка 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, расположенного в комплементарной цепи напротив специфического сайта, проведен анализ кинетики фермент-субстратного взаимодействия. Рассчитаны изменения стандартной свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии для последовательных стадий ферментативного процесса, а также образования переходного состояния в каталитической стадии. Совокупный анализ кинетических и термодинамических данных о конформационных превращениях фермента Endo VIII и ДНК, протекающих в ходе их взаимодействия, позволил детализировать природу молекулярных процессов, происходящих на стадиях связывания субстрата, узнавания поврежденного основания и его удаления из ДНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ДНК-гликозилаза, кинетический механизм, предстационарная кинетика, термодинамика.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** Endo VIII – эндонуклеаза VIII; AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; F-сайт – остаток (2R,3S)-2-(гидрокси-3-гидрокситетрагидрофурана); DHU – 5,6-дигидроуридин.

## ВВЕДЕНИЕ

Эндонуклеаза VIII (Endo VIII, или Nei) – одна из основных ДНК-гликозилаз *Escherichia coli*, удаляющих широкий набор окисленных или восстановленных пиримидиновых оснований [1, 2]. Продуктами окисления/восстановления пиримидиновых оснований ДНК являются тимингликоль, 5,6-дигидротимин, 5,6-дигидроурацил, мочевина, 5-формилурацил, 5-оксиметилурацил, 5-гидроксицитозин, 5-гидроксиурацил, урацилгликоль и др. Endo VIII катализирует гидролиз N-гликозидной связи поврежденного основания (N-гликозилазная активность) и последующие реакции β-элиминирования 3'- и 5'-фосфатных групп апуринового/апиримидинового сайта (AP-лиазная активность), приводящие к образованию одноцепочечного разрыва в ДНК (рис. 1) [3, 4].

Анализ рентгеноструктурных данных свободного фермента и его комплекса с ДНК показал, что взаимодействие Endo VIII с ДНК приводит к конформационным изменениям как в молекуле белка, так и в молекуле субстрата [5, 6]. В фермент-субстратном комплексе происходит изгибание рибозо-

фосфатного остова ДНК примерно на 45°, поврежденное основание выворачивается из ДНК-спирали и располагается в активном центре фермента, а в образующуюся полость встраиваются аминокислотные остатки Gln69, Leu70 и Tyr71 (рис. 2). Такие изменения структуры взаимодействующих молекул приводят к образованию специфических контактов, результатом которых является высокоэффективное узнавание и связывание поврежденных участков ДНК.

Ранее методом «остановленного потока» с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции

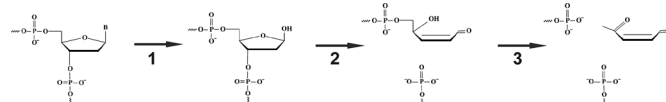


Рис. 1. Стадии процесса катализа Endo VIII. 1 – Гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием AP-сайта; 2 – β-элиминирование 3'-фосфатной группы; 3 – β-элиминирование 5'-фосфатной группы

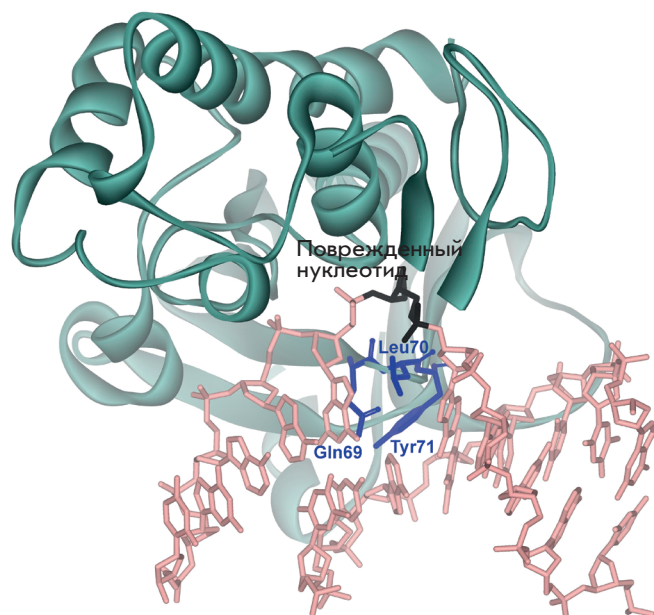
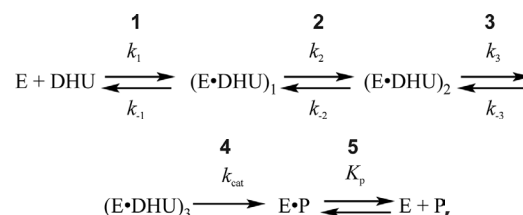


Рис. 2. Структура ковалентного комплекса фермента Endo VIII с дуплексом ДНК, содержащим AP-сайт (PDB ID 1K3W) [6]

остатков триптофана [7], входящих в состав фермента, и ряда флуоресцентных аналогов гетероциклических оснований в ДНК [8], расположенных с 5'-стороны или напротив поврежденного нуклеотида, был проведен кинетический анализ конформационных изменений в Endo VIII и ДНК-субстрате в ходе их взаимодействия. В дальнейшем [9] для уточнения природы последовательных стадий связывания ДНК мы использовали стратегию сайт-направленного мутагенеза. Совокупность кинетических данных, характеризующих конформационные изменения фермента и ДНК-субстратов, а также результатов мутационного анализа позволила предложить молекулярно-кинетический механизм узнавания повреждения ферментом Endo VIII (схема 1). Стадия 1 соответствует быстрому первоначальному связыванию ДНК и образованию неспецифического фермент-субстратного комплекса, в котором N- и C-домены фермента переходят в закрытое положение. На этой стадии остаток Leu70 вклинивается в ДНК-дуплекс, что является ключевым моментом узнавания поврежденного участка ДНК. Стадия 2 включает изгибание двойной спирали в месте поврежденного основания, выворачивание 5,6-дигидроурацила из дуплекса и встраивание остатка Tyr71 в ДНК-спираль, необходимое для стабилизации вывернутой конформации поврежденного основания. На стадии 3 происходит подстройка конформации активного центра для достижения каталитически-компетентного состояния. Остаток Tyr71 также принимает уча-

стие в стадии 3. На этой стадии образуются контакты между Phe121 и рибозо-фосфатным остовом ДНК. Формирование каталитического комплекса приводит к гидролизу N-гликозидной связи и последующей реакции β-элиминирования 3'- и 5'-фосфатных групп (стадия 4). Завершает ферментативный цикл диссоциация комплекса фермент-продукт (стадия 5).

Схема 1. Кинетический механизм взаимодействия Endo VIII с DHU-субстратом



где E – Endo VIII; DHU – DHU-субстрат;  $(E \cdot DHU)_n$  – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания 5,6-дигидроурацила; E · P – комплекс E с продуктом реакции P;  $k_j$  и  $k_{-j}$  – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Для подтверждения кинетического механизма (схема 1) и уточнения природы отдельных стадий мы определили термодинамические параметры быстропротекающих стадий процесса взаимодействия Endo VIII с ДНК и специфического узнавания поврежденного нуклеотида, основываясь на кинетических параметрах, получаемых при разных температурах.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (PRP-X500 Hamilton Company 3.9×300 мм, размер частиц 12–30 мкм) и последующей обращенно-фазовой хроматографии (Nucleoprep 100-20 C<sub>18</sub> 10×250 мм, Macherey-Nagel, Германия). Чистоту олигонуклеотидов проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 20% полиакриламидном геле (ПААГ). Концентрацию олигонуклеотидов определяли по оптической плотности растворов на длине волны 260 нм в электронных спектрах поглощения и коэффициентов молярной экстинкции, рассчитанных в приближении метода «ближайших соседей» [10].

В качестве ДНК-субстратов использовали 17-звенные ДНК-дуплексы (табл. 1), содержащие в комплементарной цепи напротив специфического сайта вместо остатка цитозина флуорофор 1,3-диаза-2-оксофеноксазин (tC<sup>o</sup>). Специфическим сайтом служил остаток 5,6-дигидроуридина, выступающий в качестве поврежденного основания, и F-сайт, ко-

Таблица 1. Последовательность олигодезоксирибонуклеотидов в составе ДНК-дуплексов

Название	Последовательность
DHU-DNA, X = DHU	5'-TCTCTCTCXCCTTCCTT-3' 3'-AGAGAGAG(tC <sup>o</sup> )GGAAGGAA-5'
F-DNA, X = F-сайт	
G-DNA, X = G	

торый является аналогом промежуточного продукта ферментативной реакции – апуринового/апиридинового сайта (AP-сайта). В качестве неповрежденной ДНК использовали дуплекс, не содержащий модифицированных нуклеотидов.

### Эндонуклеаза VIII

Endo VIII выделена из линии клеток *E. coli* Rosetta II (DE3), трансформированных плазмидой pET-24b, несущей ген фермента. Культуру клеток *E. coli* Rosetta II (DE3) наращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°C до оптической плотности 0.6–0.7 при длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 30°C, транскрипцию индуцировали добавлением изопропил-β-D-тиогаляктопиранозидом до 0.2 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали в течение 8 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 12000 об/мин), и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8, 40 мМ NaCl). Клетки лизировали при помощи френч-пресса (French Press Cell, Thermo Fisher Scientific, США). Все последующие процедуры проводили при 4°C. Лизат клеток центрифугировали (40 мин при 30 000 об/мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8, 40 мМ NaCl). Фракции, содержащие белок, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Heparin™, Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в линейном градиенте 40 → 1500 мМ NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Степень чистоты белка определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие белок Endo VIII, диализовали в буфере 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50% глицерин и хранили при –20°C. Концентрацию фермента рассчитывали из значения оптической плотности белка на длине волны 280 нм и коэффициента молярной экстинкции 32680 M<sup>-1</sup>×см<sup>-1</sup> [11].

### Кинетические исследования методом «остановленного потока»

Кинетические кривые регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции tC<sup>o</sup> на спектрометре

остановленной струи SX.20 (Applied Photophysics, Великобритания). Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 360 нм. Регистрацию флуоресценции проводили на длинах волн более 395 нм (Schott filter GG 395). Мертвое время прибора составляло 1.4 мс, максимальное время регистрации сигнала – 500 с. Все эксперименты выполнены в буферном растворе 50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 50 мМ KCl, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, 7% глицерин при температурах от 5 до 25°C. Каждую кинетическую кривую усредняли, как минимум, по трем экспериментальным кривым.

### Анализ кинетических кривых

Для расчета констант скорости конформационных переходов получали набор кинетических кривых для разных концентраций фермента при разных температурах. Интенсивность флуоресценции tC<sup>o</sup> регистрировали в условиях, близких к «одному обороту фермента», т.е. при концентрациях фермента и субстрата одного порядка. Для определения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстратом, и расчета констант скорости всех элементарных реакций, соответствующих данной схеме, использовали программу DynaFit (BioKin, США) [12]. Количественную обработку результатов проводили путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы, как описано ранее [13–16].

Используя полученные значения констант скорости прямых и обратных реакций для отдельных обратимых стадий, рассчитывали константы равновесия K<sub>i</sub> этих стадий (K<sub>i</sub> = k<sub>i</sub>/k<sub>-i</sub>, где i – номер стадии) для разных температур. Стандартные термодинамические параметры i-й равновесной стадии определяли с помощью уравнения Вант-Гоффа (1) [17, 18] как описано ранее [19–23].

$$\ln(K_i) = -\Delta G_i^{\circ}/RT = -\Delta H_i^{\circ}/RT + \Delta S_i^{\circ}/R. \quad (1)$$

Анализ температурной зависимости константы скорости химической реакции k<sub>cat</sub> по уравнению Эйринга (2) позволил рассчитать стандартную энтакпию активации (ΔH<sup>o‡</sup>) и стандартную энтропию активации (ΔS<sup>o‡</sup>), соответствующих образованию переходного состояния [17].

$$\ln(k_{cat}/T) = \ln(k_B/h) + (\Delta S^{\circ‡}/R) - (\Delta H^{\circ‡}/RT), \quad (2)$$

где k<sub>B</sub> и h – постоянные Больцмана и Планка соответственно, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура в градусах Кельвина, k<sub>cat</sub> – константа скорости необратимой каталитической стадии.

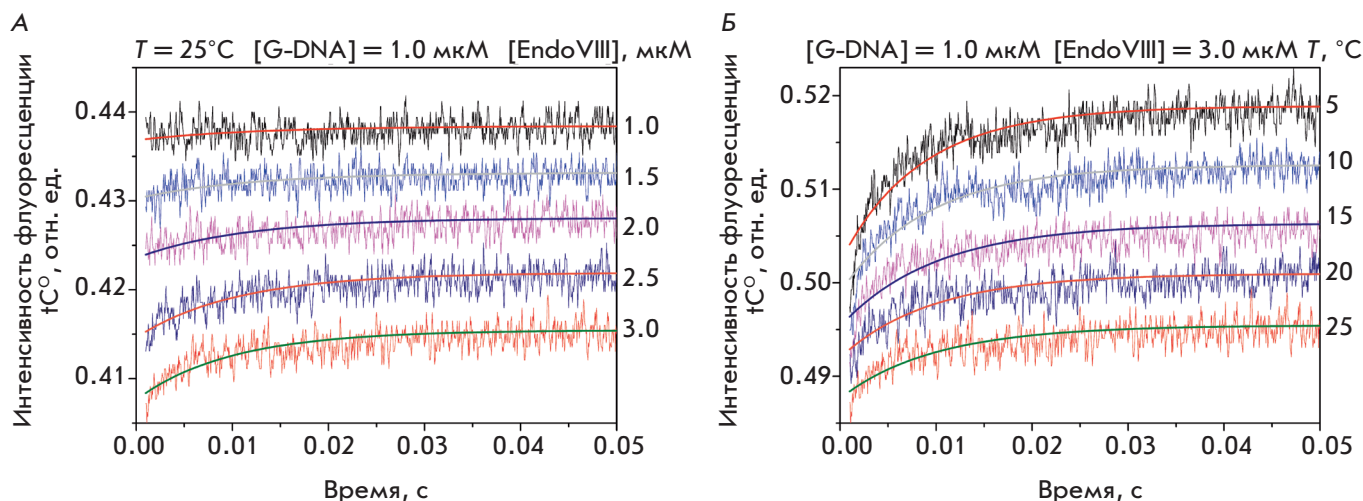


Рис. 3. Взаимодействие Endo VIII с неповрежденным дуплексом G-DNA. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме 2.  $[G-DNA] = 1.0 \text{ мкМ}$ , концентрация Endo VIII изменяется от 1.0 до 3.0 мкМ. Б – сравнение кинетических кривых, полученных при взаимодействии 1.0 мкМ G-DNA и 3.0 мкМ Endo VIII при разных температурах

Таблица 2. Константа равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие Endo VIII с неповрежденным дуплексом G-DNA

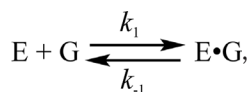
Константы	Температура, °C				
	5	10	15	20	25
$k_1, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$(16 \pm 7) \times 10^6$	$(16 \pm 8) \times 10^6$	$(15 \pm 9) \times 10^6$	$(14 \pm 6) \times 10^6$	$(9 \pm 2) \times 10^6$
$k_{-1}, \text{s}^{-1}$	$50 \pm 30$	$60 \pm 40$	$50 \pm 20$	$60 \pm 40$	$40 \pm 10$
$K_1, \text{M}^{-1}$	$(0.31 \pm 0.21) \times 10^6$	$(0.26 \pm 0.21) \times 10^6$	$(0.29 \pm 0.20) \times 10^6$	$(0.25 \pm 0.18) \times 10^6$	$(0.19 \pm 0.08) \times 10^6$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Взаимодействие Endo VIII с неповрежденным ДНК-дуплексом G-DNA

На рис. 3А представлены кинетические кривые для процесса взаимодействия Endo VIII с ДНК-дуплексом G-DNA, содержащим остаток гуанина напротив флуорофорной группы  $tC^\circ$ , полученные путем регистрации изменений интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  в ходе реакции. На кинетических кривых можно выделить одну фазу роста интенсивности флуоресценции, которая выходит на плато. При увеличении температуры выход на плато данного изменения сдвигается с  $\sim 30$  мс при 5 до  $\sim 20$  мс при 25°C (рис. 3Б). Полученные кинетические кривые удовлетворительно описываются одностадийной равновесной кинетической схемой 2. Константы скорости, характеризующие эту стадию, представлены в табл. 2.

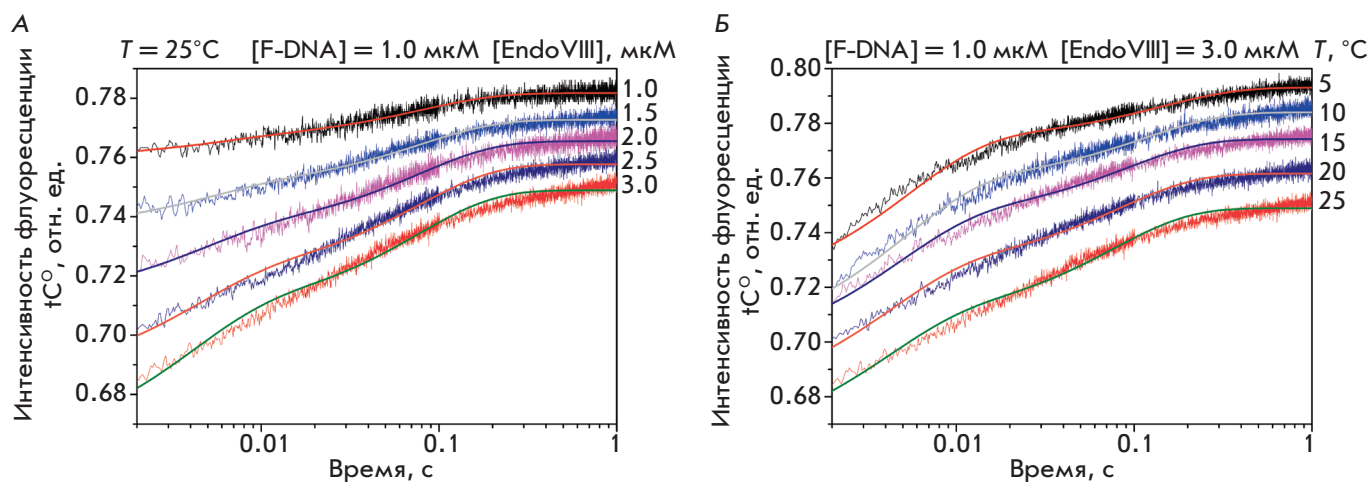
Схема 2. Кинетический механизм взаимодействия Endo VIII с неповрежденным ДНК-дуплексом



где E – фермент Endo VIII, G – ДНК-дуплекс, содержащий остаток гуанина напротив флуорофорной группы  $tC^\circ$ , E · G – комплекс Endo VIII с ДНК-дуплексом,  $k_1$  и  $k_{-1}$  – константы скорости прямой и обратной реакций.

### Взаимодействие Endo VIII с аналогом AP-сайта F-DNA

Взаимодействие Endo VIII с AP-сайтом в ДНК изучено с использованием ДНК-дуплекса, содержащего нерасщепляемый аналог AP-сайта (производное тетрагидрофурана F) и флуорофорную группу  $tC^\circ$  напротив повреждения в комплементарной цепи (рис. 4). На кинетических кривых, представленных на рис. 4, можно выделить две фазы роста интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$ . Первая фаза роста происходит в том же временном диапазоне (до  $\sim 20$  мс), как и в случае взаимодействия с неповрежденным G-DNA. По-видимому, в начальный момент времени в структуре ДНК-дуплексов, содержащих и G-, и F-сайт, происходит одно и то же конформационное превращение, вызванное связыванием с Endo VIII. Однако в случае F-лиганда имеется вторая стадия роста интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$ , которая завершается к 1-й секунде при всех температурах (рис. 4). Кроме того,



**Рис. 4.** Взаимодействие Endo VIII с F-DNA. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  и расчетные кривые, полученные в ходе обработки данных согласно схеме 3;  $[F-DNA] = 1.0 \mu M$ , концентрация Endo VIII изменяется от 1.0 до 3.0  $\mu M$ . Б – сравнение кинетических кривых, полученных при взаимодействии 1.0  $\mu M$  F-DNA и 3.0  $\mu M$  Endo VIII при разных температурах

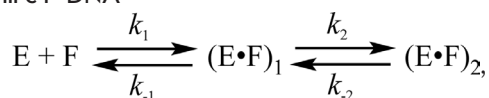
**Таблица 3.** Константы равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и F-DNA

Константы	Температура, °C				
	5	10	15	20	25
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(35 \pm 9) \times 10^6$	$(35 \pm 5) \times 10^6$	$(37 \pm 5) \times 10^6$	$(39 \pm 5) \times 10^6$	$(40 \pm 8) \times 10^6$
$k_{-1}, c^{-1}$	$89 \pm 22$	$99 \pm 18$	$109 \pm 28$	$129 \pm 43$	$144 \pm 46$
$K_1, M^{-1}$	$(0.4 \pm 0.1) \times 10^6$	$(0.35 \pm 0.08) \times 10^6$	$(0.3 \pm 0.1) \times 10^6$	$(0.3 \pm 0.1) \times 10^6$	$(0.3 \pm 0.1) \times 10^6$
$k_2, c^{-1}$	$0.3 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.2$	$3 \pm 1$	$3 \pm 1$
$k_{-2}, c^{-1}$	$7 \pm 2$	$8 \pm 1$	$10 \pm 1$	$11 \pm 1$	$12 \pm 1$
$K_2$	$0.04 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.03$	$0.13 \pm 0.02$	$0.24 \pm 0.09$	$0.26 \pm 0.08$

изменения на кинетических кривых взаимодействия F-содержащего ДНК-дуплекса с Endo VIII имеют большую амплитуду, чем в случае G-DNA, что может говорить как о большей эффективности образования комплекса между ферментом и ДНК, так и о более значительных конформационных перестройках в структуре ДНК-дуплекса, содержащего F-сайт.

В результате обработки полученных данных определена минимальная кинетическая схема реакции, включающая две обратимые стадии образования фермент-субстратного комплекса (схема 3). Рассчитанные константы скорости реакций и константы равновесия приведены в табл. 3.

**Схема 3.** Кинетический механизм взаимодействия Endo VIII с F-DNA



где E – фермент Endo VIII, F – ДНК-дуплекс, содержащий F-сайт напротив флуорофорной группы  $tC^\circ$ ,  $(E \cdot F)_i$  – комплексы Endo VIII с F-DNA,  $k_i$  и  $k_{-i}$  – константы скорости прямых и обратных реакции каждой стадии.

### Взаимодействие Endo VIII с DHU-DNA

На рис. 5А представлены кинетические кривые, полученные при взаимодействии Endo VIII с ДНК-субстратом, содержащим 5,6-дигидроуридин (DHU-DNA). Они имеют более сложный вид, чем в случае G-DNA и F-DNA. Во всех концентрационных сериях, полученных при разных температурах (5–25°C), можно выделить сходные изменения интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  (рис. 5Б).

Анализ кинетических кривых, полученных при 5–15°C, показал, что на начальном участке (до 10 мс) происходит быстрый рост интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  (фаза 1). При увеличении температуры это изменение интенсивности флуоресценции практически пропадает. Вслед за 1-й фазой роста можно выделить дальнейшее увеличение флуоресцентного сигнала при всех температурах. Длительность 2-й фазы роста снижалась с ростом температуры от ~300 мс при 5°C до ~80 мс при 25°C.

Известно, что при связывании Endo VIII с ДНК происходит нарушение структуры двойной спирали ДНК, выворачивание поврежденного нуклеотида и встраивание нескольких аминокислотных остатков

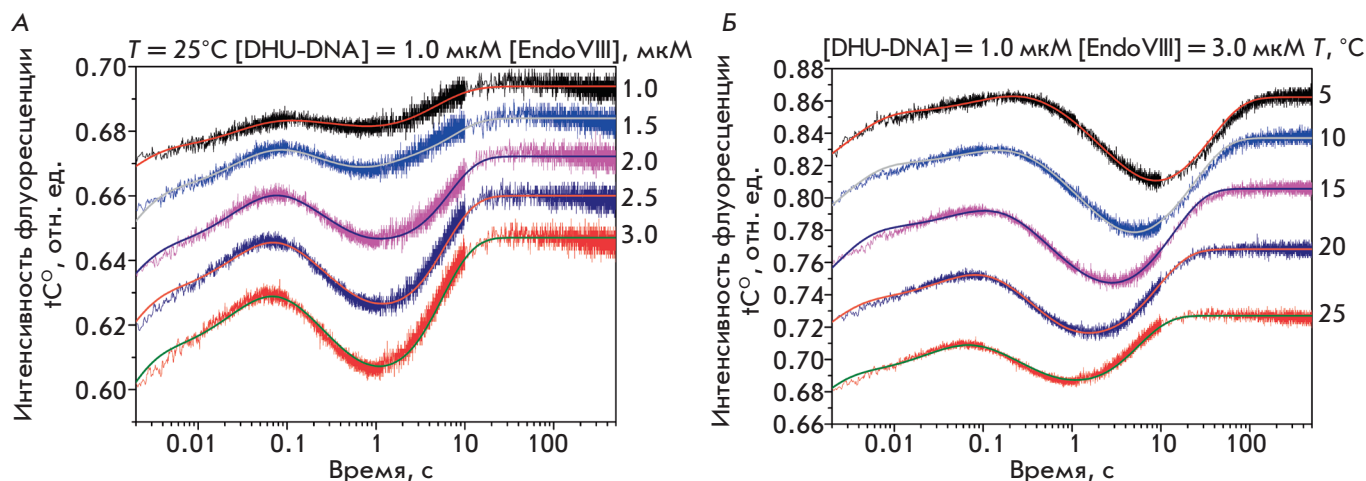


Рис. 5. Взаимодействие Endo VIII с DHU-DNA. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме 1; [DHU-DNA] = 1.0 мкМ, концентрация Endo VIII изменяется от 1.0 до 3.0 мкМ. Б – сравнение кинетических кривых, полученных при взаимодействии 1.0 мкМ DHU-DNA и 3.0 мкМ Endo VIII при разных температурах

фермента в двойную цепь ДНК [6]. Endo VIII формирует обширную сеть контактов с ДНК, но при узнавании поврежденного нуклеотида наиболее значимы контакты, образуемые аминокислотными остатками триады Gln69–Leu70–Tyr71.

На всех полученных кривых можно выделить фазу падения интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  (фаза 3). Эта фаза имеет выраженную зависимость от температуры. Так, при 5°C фаза падения интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  длится до 10 с, а при 25°C лишь до 1 с. Такое изменение соответствует еще одной стадии, протекающей при образовании фермент-субстратного комплекса. Поскольку снижение интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  указывает на изменение микроокружения данной флуорофорной группы, можно предположить, что в этот момент времени происходит подстройка конформаций фермента и ДНК для образования каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса.

Вслед за падением интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$  наблюдается увеличение флуоресцентного сигнала (фаза 4), сопровождающееся выходом на плато (фаза 5). Скорее всего, 4-я фаза изменения интенсивности флуоресценции отражает каталитические стадии ферментативного процесса, а 5-я – диссоциацию комплекса фермента с продуктом реакции.

Таким образом, в кинетических кривых взаимодействия эндонуклеазы VIII с ДНК-субстратом, содержащим остаток 5,6-дигидроуридина, выявлены пять фаз изменения интенсивности флуоресценции  $tC^\circ$ . Минимальная кинетическая схема, описывающая кинетические кривые, включает три обратимые стадии, ведущие к образованию фермент-субстрат-

ного комплекса, одну необратимую стадию, которую можно соотнести со стадией каталитической реакции, и одну обратимую стадию диссоциации комплекса фермент-продукт (схема 1). Рассчитанные значения констант скорости отдельных стадий и констант равновесия приведены в табл. 4.

#### Термодинамические параметры взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами

Константы скорости отдельных стадий взаимодействия Endo VIII со всеми ДНК-субстратами при разных температурах использовали для расчета констант равновесия этих стадий ( $K_i$ ). Константы равновесия отдельных стадий использовали для получения зависимости  $\ln(K_i)$  от  $1/T$  (уравнение Вант-Гоффа (1)) (рис. 6). Также получена зависимость  $\ln(k_{cat}/T)$  от  $1/T$  (уравнение Эйринга (2)), характеризующая необратимую каталитическую стадию в случае DHU-субстрата. Все зависимости имели линейный вид и позволили рассчитать изменения энтальпии и энтропии для обратимых стадий ( $\Delta H_i^\circ$  и  $\Delta S_i^\circ$ ) и образования переходного состояния каталитической стадии ( $\Delta H^{o,\ddagger}$  и  $\Delta S^{o,\ddagger}$ ) (табл. 5).

При анализе термодинамических параметров взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами удалось выделить некоторые общие особенности. Так, первичное связывание всех использованных ДНК-субстратов с ферментом сопровождается небольшим уменьшением энтальпии и повышением энтропии. Это приводит к отрицательному значению изменения энергии Гиббса  $\Delta G_1^\circ$  для первой стадии образования фермент-субстратного комплекса. При этом величина  $\Delta G_{1,298}^\circ$  имеет близкое значение (от -7.0 до -7.4 ккал/моль) как для поврежденной, так и неповреж-

Таблица 4. Константы равновесия и константы скорости, характеризующие взаимодействие фермента Endo VIII и DHU-DNA

Константы	Температура, °C				
	5	10	15	20	25
$k_{12}, M^{-1}c^{-1}$	35±7	40±6	45±7	61±4	80±13
$k_{-1}, c^{-1}$	230±30	270±40	320±10	440±70	580±50
$K_1, M^{-1}$	$(0.149±0.038)×10^6$	$(0.147±0.032)×10^6$	$(0.140±0.023)×10^6$	$(0.140±0.025)×10^6$	$(0.138±0.027)×10^6$
$k_{23}, c^{-1}$	1.0±0.2	1.7±0.1	2.6±0.4	3.6±0.6	4±1
$k_{-23}, c^{-1}$	0.34±0.08	0.62±0.03	0.9±0.7	1.2±1	1.3±0.3
$K_2$	2.72±0.94	2.76±0.24	2.83±2	3.0±2.7	3.0±1
$k_{34}, c^{-1}$	6.5±1.4	8.1±0.6	12±2	18±4	29±3
$k_{-34}, c^{-1}$	1.6±0.3	1.9±0.6	2.5±0.6	3±1	4.4±1.6
$K_3$	4±1	4.3±1.4	4.6±1.3	5.3±1.9	6.6±2.5
$k_{cat}, c^{-1}$	0.06±0.02	0.09±0.05	0.15±0.05	0.22±0.08	0.34±0.02
$K_5, M^{-1} c^{-1}$	$(0.06±0.03)×10^6$	$(0.047±0.019)×10^6$	$(0.042±0.016)×10^6$	$(0.038±0.010)×10^6$	$(0.034±0.18)×10^6$

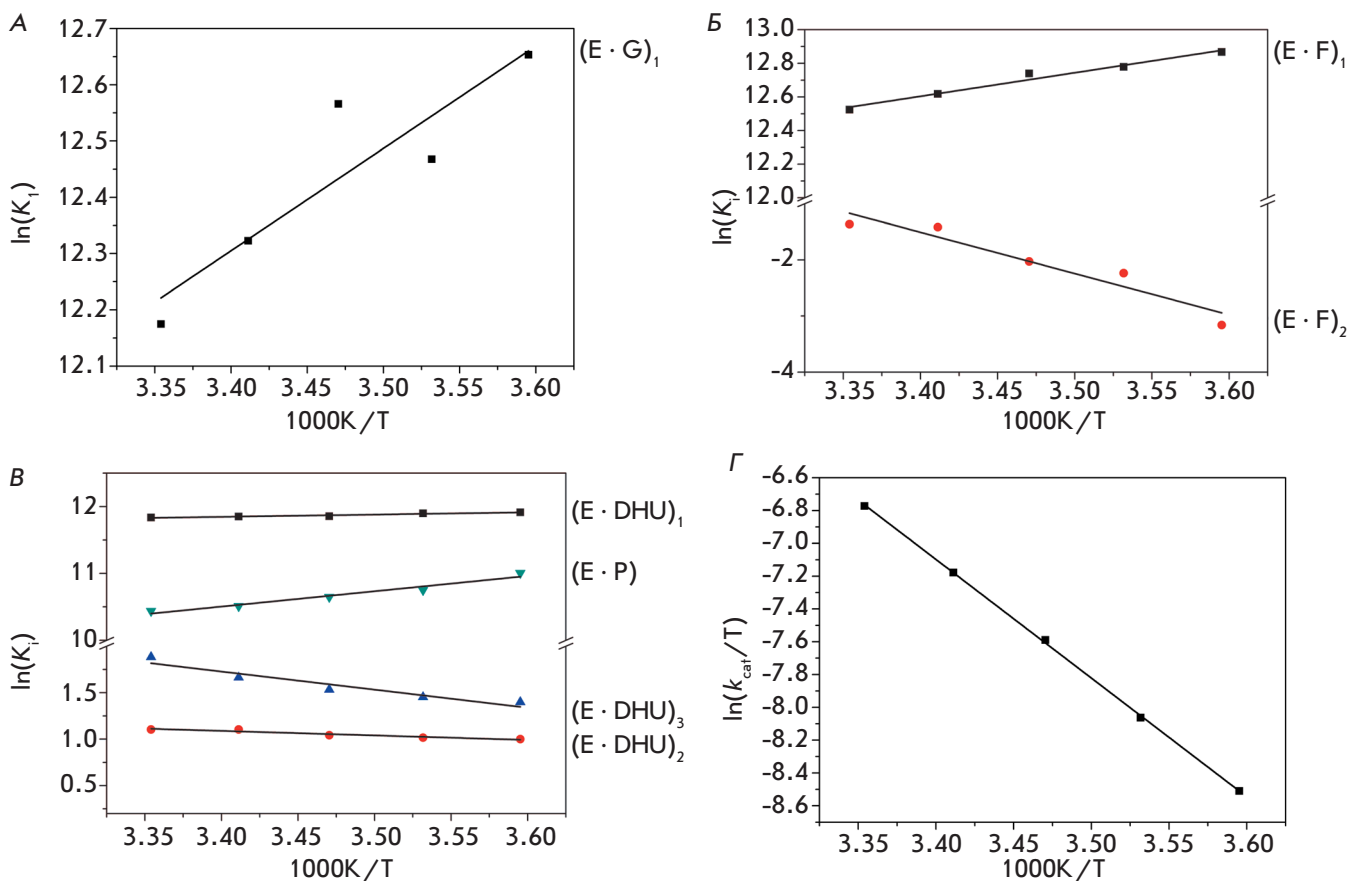


Рис. 6. Зависимость  $\ln(K_i)$  от  $1/T$ , характеризующая различные стадии взаимодействия Endo VIII с неповрежденной G-DNA (A), F-DNA (Б) и DHU-DNA (B). Зависимость  $\ln(k_{cat}/T)$  от  $1/T$ , характеризующая образование переходного состояния каталитической стадии при взаимодействии Endo VIII с DHU-субстратом (Г)

денной ДНК, что указывает на выгодное в энергетическом плане взаимодействие фермента с ДНК.

Величины термодинамических параметров первой стадии, полученные для G-DNA, F-DNA и DHU-DNA, свидетельствуют о том, что начальная стадия взаимодействия (до 10 мс) Endo VIII со всеми

ДНК-дуплексами представляет собой один и тот же процесс. На стадии первичного связывания не образуются специфические контакты с поврежденным нуклеотидом. Узнавание поврежденного нуклеотида происходит позднее – при его выворачивании из спирали ДНК и внедрении в спираль аминокис-

Таблица 5. Термодинамические параметры взаимодействия Endo VIII с ДНК-субстратами

ДНК-субстрат	Номер стадии	$\Delta H_i^\circ$ , ккал/моль	$\Delta S_i^\circ$ , ккал/(моль×К)	$\Delta G_{i,298}^\circ$ , ккал/моль	Описание стадии <sup>a</sup>
G/tC <sup>o</sup>	1	-3.6 ± 0.9	12 ± 3	-7.2	Первичное связывание, попытка вклинивания остатка Leu70, увеличение полярности окружения tC <sup>o</sup>
F/tC <sup>o</sup>	1	-2.8 ± 0.3	16 ± 1	-7.4	Первичное связывание, вклинивание остатка Leu70, увеличение полярности окружения tC <sup>o</sup>
	2	15 ± 3	47 ± 9	0.8	Изгибание двойной спирали, увеличение полярности окружения tC <sup>o</sup>
	$\sum_{i=1}^{i=2}$	12.2±3.3	60 ± 10	-6.6	
DHU/tC <sup>o</sup>	1	-0.7 ± 0.1	21.3 ± 0.4	-7.0	Первичное связывание, увеличение полярности окружения tC <sup>o</sup>
	2	1.0 ± 0.2	5.5 ± 0.6	-0.65	Изгибание двойной спирали, увеличение полярности окружения tC <sup>o</sup>
	3	3.9 ± 0.7	17 ± 2	-1.1	Образование каталитического комплекса, уменьшение полярности окружения tC <sup>o</sup>
	$\sum_{i=1}^{i=3}$	4.2	43.8	-8.75	
	4 <sup>b</sup>	14.4 ± 0.1	-12.4 ± 0.5	18	Катализ, увеличение полярности окружения tC <sup>o</sup>
	5	-4.5 ± 0.6	5 ± 2	-6.2	Образование комплекса с продуктом реакции, увеличение полярности окружения tC <sup>o</sup>

<sup>a</sup>На основании данных [7–9].

<sup>b</sup>Параметры, рассчитанные по уравнению Эйринга (2).

лотных остатков «триады» Gln69–Leu70–Tyr71. Тем не менее, установлено [9], что Endo VIII использует Leu70 в качестве «сенсора» повреждений, и его интеркаляция в структуру дуплекса происходит на ранних этапах специфического фермент-субстратного взаимодействия. Поэтому можно предположить, что рост интенсивности флуоресценции tC<sup>o</sup> на начальном участке всех кинетических кривых отражает локальные конформационные изменения ДНК-дуплекса при вклинивании остатка Leu70 в двойную спираль.

Термодинамический анализ второй стадии связывания Endo VIII с ДНК-дуплексами, зарегистрированной в случае F- и DHU-содержащих дуплексов, выявил различие в протекании этой стадии. Положительное значение  $\Delta G_{2,298}^\circ$  в случае F-DNA говорит о невыгодности этого процесса, который, по видимому, не протекает при низких температурах. В случае DHU-содержащего субстрата вторая стадия образования фермент-субстратного комплекса является энергетически нейтральной, значение  $\Delta G_{2,298}^\circ$  составляет -0.65 ккал/моль. У обоих ДНК-дуплексов эта стадия сопровождается увеличением  $\Delta H^\circ$  и  $\Delta S^\circ$ . Согласно полученным ранее данным, на этой стадии происходит изгибание дуплекса, которое должно сопровождаться выворачиванием поврежденного нуклеотида в активный центр фер-

мента и полным встраиванием всех остатков триады Gln69–Leu70–Tyr71 в двойную спираль ДНК [8].

На третьей стадии взаимодействия Endo VIII с DHU-субстратом, которая предшествует каталитической реакции, происходит окончательная подстройка структуры активного центра для осуществления каталитической стадии. Значительный рост энтропии на этой стадии, скорее всего, связан с десольватацией полярных групп в области контакта фермент–ДНК, а также вытеснением молекул воды из бороздок ДНК-субстрата. Положительная величина изменения энтальпии  $\Delta H^\circ$  свидетельствует о затратах энергии для создания каталитически активной конформации. Затем следует необратимая каталитическая стадия (стадия 4), в ходе которой гидролизуется N-гликозидная связь с поврежденным основанием и в сахарофосфатном остове ДНК с 3'- и 5'-стороны от поврежденного нуклеотида образуется разрыв. Каталитическая стадия протекает с большими затратами энергии, на что указывают положительные значения  $\Delta G_{298}^{\circ,\ddagger} = 18.0$  ккал/моль и  $\Delta H^{\circ,\ddagger} = 14.4$  ккал/моль. Последняя стадия взаимодействия Endo VIII с DHU-содержащим субстратом – диссоциация комплекса фермента с продуктом. Необходимо отметить, что  $\Delta G_{298}^\circ$  (-6.2 ккал/моль) этой стадии имеет близкое значение с  $\Delta G_{298}^\circ$  первичного связывания ДНК (от -7.0 до -7.4 ккал/моль).



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для всех использованных в работе ДНК-субстратов ДНК-гликозилазы Endo VIII зарегистрированы изменения интенсивности флуоресценции 1,3-диаза-2-оксофеноксазина  $tC^O$  в составе пары  $X:tC^O$  ( $X = G, F, DNU$ ). Показано, что первая фаза роста интенсивности флуоресценции  $tC^O$  присутствует на кинетических кривых, полученных со всеми использованными субстратами. Согласно полученным термодинамическим параметрам, эта стадия отражает одну и ту же стадию первичного связывания Endo VIII с ДНК. По данным [7–9], эта стадия представляет собой закрытие доменов фермента и попытку встраивания Leu70 в двойную спираль ДНК. Вторая фаза роста интенсивности флуоресценции зарегистрирована только в случае ДНК-дуплексов, несущих поврежденный нуклеотид F или DNU. Это изменение соответствует стадии образования второго фермент-субстратного комплекса. Вероятно, на этой стадии происходит выворачивание поврежденного нуклеотида в активный центр Endo VIII и встраивание аминокислотных остатков фермента Endo VIII в двойную спираль ДНК. У DNU-DNA эта стадия продолжается вплоть до 1 с. Интересно отметить, что при этом происходит рост и энтальпии, и энтропии, однако изменение энергии Гиббса  $\Delta G_{1,298}^{\circ}$  на этой стадии близко к нулю (0.8 и -0.65 ккал/моль для F-DNA и DNU-DNA соответственно). Следовательно, энергетические затраты на изменение структуры молекул фермента и ДНК-субстрата компенсируются за счет роста энтропии системы. На кинетических кривых (рис. 5), полученных для DNU-

содержащего дуплекса, видно, что за двумя фазами роста интенсивности флуоресценции  $tC^O$  следует фаза падения, отражающая образование третьего фермент-субстратного комплекса. На этой стадии осуществляется окончательная проверка строения поврежденного нуклеотида и формирование каталитически активного комплекса. Интенсивность флуоресценции  $tC^O$  при этом становится минимальной, что говорит о формировании наиболее гидрофобного окружения флуорофорной группы. Кроме того, эта стадия сопровождается ростом энтропии, свидетельствующим, вероятно, о вытеснении молекул воды из области контакта фермент-субстрат и, следовательно, компактизации фермент-субстратного комплекса. Значения термодинамических параметров быстропротекающих стадий процесса взаимодействия Endo VIII с ДНК согласуются с ранее полученными данными о механизме узнавания и превращения специфического сайта ферментом [7–9]. Относительные изменения термодинамических параметров отдельных быстропротекающих стадий ферментативного процесса, катализируемого ДНК-гликозилазой Endo VIII, согласуются с величинами, полученными нами ранее для других ДНК-гликозилаз Fpg [19], hOGG1 [20] и Nth [22]. ●

*Работа выполнена при поддержке бюджетного финансирования (№ VI.57.1.2, 0309-2016-0001).*

*За счет средств гранта РФФ № 18-14-00135 выполнен предстационарный кинетический анализ взаимодействия фермента с ДНК-субстратами.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jiang D., Hatahet Z., Melamede R.J., Kow Y.W., Wallace S.S. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 51. P. 32230–32239.
- Melamede R.J., Hatahet Z., Kow Y.W., Ide H., Wallace S.S. // Biochemistry. 1994. V. 33. № 5. P. 1255–1264.
- Burgess S., Jaruga P., Dodson M.L., Dizdaroglu M., Lloyd R.S. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 25. P. 2938–2944.
- Kropachev K.Y., Zharkov D.O., Grollman A.P. // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 12039–12049.
- Golan G., Zharkov D.O., Feinberg H., Fernandes A.S., Zaika E.I., Kycia J.H., Grollman A.P., Shoham G. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 15. P. 5006–5016.
- Zharkov D.O., Golan G., Gilboa R., Fernandes A.S., Gerchman S.E., Kycia J.H., Rieger R.A., Grollman A.P., Shoham G. // EMBO J. 2002. V. 21. № 4. P. 789–800.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // DNA Repair. 2012. V. 11. № 11. P. 884–891.
- Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Barthes N.P.F., Michel B.Y., Burger A., Fedorova O.S. // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. P. e100007.
- Kladova O.A., Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. // Genes (Basel). 2017. V. 8. № 5. P. 1–13.
- Fasman G.D. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd Ed. // Cleveland: CRC Press, 1975.
- Gill S.C., von Hippel P.H. // Anal. Biochem. 1989. V. 182. P. 319–326.
- Kuzmic P. // Anal. Biochem. 1996. V. 237. P. 260–273.
- Yakovlev D.A., Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 1. P. 88–98.
- Kuznetsova A.A., Iakovlev D.A., Misovets I.V., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Mol. Biosyst. 2017. V. 13. № 12. P. 2638–2649.
- Kuznetsov N.A., Kiryutin A.S., Kuznetsova A.A., Panov M.S., Barsukova M.O., Yurkovskaya A.V., Fedorova O.S. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2017. V. 35. № 5. P. 950–967.
- Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Mol. BioSyst. 2016. V. 12. № 5. P. 1527–1539.
- Atkins P., Paula J. Atkins' Physical Chemistry. 8th Ed. // Oxford university press, 2006.
- Ragone R., Colonna G., Ambrosone L. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. № 34. P. 13050.
- Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. № 15. P. 7384–7392.
- Kuznetsov N.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. P. e98495.
- Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Acta Naturae. 2016. V. 8. № 1. P. 103–110.
- Kladova O.A., Krasnoperov L.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Genes (Basel). 2018. V. 9. № 4. E190.
- Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Biochem. 2016. V. 81. № 10. P. 1136–1152.