

УДК 577.15:544.3

Термодинамика конформационных переходов AP-эндонуклеазы человека APE1 при взаимодействии с ДНК

А. Д. Мирошникова¹, А. А. Кузнецова¹, Н. А. Кузнецов^{1,2*}, О. С. Федорова^{1,2*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

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

Поступила в редакцию 01.07.2015

Принята к печати 12.11.2015

РЕФЕРАТ Одной из актуальных задач в изучении репарации ДНК остается выяснение механизма ферментативного процесса с участием эндонуклеазы APE1, который обеспечивает высокоточное узнавание апуриновых/апириимидиновых (AP) сайтов в ДНК и эффективный гидролиз 5'-фосфодиэфирной связи, играя тем самым важную роль в обеспечении стабильного функционирования ДНК и жизнедеятельности клетки. В настоящей работе проведен термодинамический анализ взаимодействия APE1 с ДНК-субстратом, содержащим аналог AP-сайта, у которого отсутствует ОН-группа в положении С1' 2'-дезоксирибозы (F-сайт). Методом «остановленного потока» с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции белка при разных температурах проведен анализ кинетики образования фермент-субстратных комплексов, каталитической стадии и диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Рассчитаны изменения стандартной свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии последовательных стадий ферментативного процесса, а также образования переходного состояния в каталитической стадии. Полученные данные позволили предположить, что на первой стадии процесса происходят образование контактов между ДНК-связывающим центром фермента и ДНК-субстратом, встраивание остатков Arg177 и Met270 в большую и малую бороздки ДНК соответственно и вытеснение из бороздок «кристаллической» воды. На второй стадии происходит выворачивание F-сайта в активный центр фермента и образование специфических контактов с 2'-дезоксирибозой и 5'-фосфатной группой. Показано, что основной вклад в термодинамические параметры процесса диссоциации комплекса фермент-продукт вносят неспецифические взаимодействия между ДНК-связывающим центром и рибозофосфатным остовом ДНК-дуплекса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апуриновый/апириимидиновый сайт, AP-эндонуклеаза человека, кинетический механизм, предстационарная кинетика, термодинамика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AP-сайт – апуриновый/апириимидиновый сайт; APE1 – AP-эндонуклеаза человека; ЭРО – эксцизионная репарация оснований; F-сайт – остаток (2R,3S)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана.

ВВЕДЕНИЕ

Одними из наиболее часто встречающихся повреждений ДНК являются апуриновые/апириимидиновые сайты (AP-сайты) [1, 2], которые образуются в ДНК при спонтанном или катализируемом ДНК-гликозилазами гидролизе N-гликозидных связей [3]. Ежедневно в каждой клетке организма человека может возникать до 10 000 AP-сайтов. Высокая мутагенность AP-сайтов связана как с отсутствием кодирующего азотистого основания, так и с их повышенной способностью вызывать одноцепочечные разрывы рибозофосфатного остова ДНК.

Ключевой фермент системы эксцизионной репарации оснований (ЭРО) – апуриновая/апириимиди-

новая эндонуклеаза человека APE1 – отвечает за поиск и иницирование процесса удаления AP-сайтов из ДНК [4, 5]. Основной физиологической функцией фермента является гидролиз фосфодиэфирной связи в ДНК с 5'-стороны от AP-сайта, в результате чего происходит разрыв рибозофосфатного остова с образованием фрагментов цепи, содержащих 3'-гидроксильную группу и 2'-дезоксирибозо-5'-фосфат [6, 7].

Анализ кристаллических структур свободного фермента APE1 [8–10] и его ковалентных комплексов с ДНК [11–13] показал, что для осуществления катализа в комплексе APE1 · ДНК образуются контакты, которые приводят к выворачиванию AP-сайта из двойной спирали. На *рис. 1* представлена

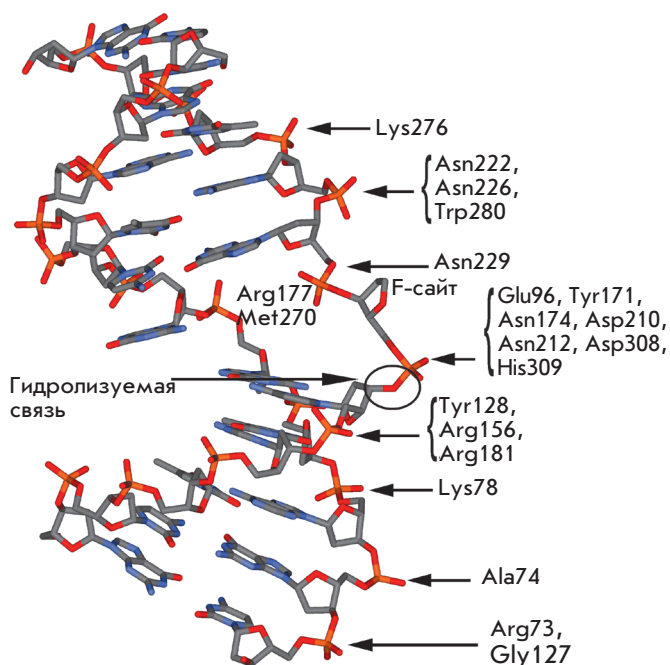
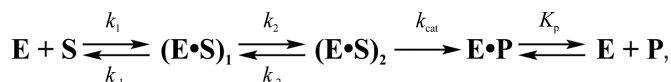


Рис. 1. Схема контактов, образующихся в фермент-субстратном комплексе APE1 с ДНК, содержащей F-сайт (PDB ID 1DE8 [11])

схема контактов в фермент-субстратном комплексе APE1 с ДНК, содержащей F-сайт, у которого отсутствует OH-группа в положении C1' дезоксирибозы (PDB ID 1DE8). Видно, что аминокислотные остатки фермента взаимодействуют преимущественно с одной цепью дуплекса, как правило, с образованием водородных связей и электростатических контактов между фосфатными группами ДНК и боковыми радикалами аминокислот, а также с амидными группами пептидных связей белка. Активный центр фермента образован остатками Asp308, His309, Glu96, Asp210, Tyr171, Asn212 и Asn174. Стабилизация внеспиральной конформации AP-сайта осуществляется остатками Met270 и Arg177. Met270 встраивается в малую бороздку ДНК, тем самым вытесняя основание, расположенное напротив AP-сайта. Остаток Arg177 встраивается со стороны большой бороздки ДНК и образует водородную связь с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от AP-сайта. В фермент-субстратном комплексе, находящемся в каталитически компетентном состоянии, остаток фосфата, расположенный с 5'-стороны от AP-сайта, координирован остатками Asn174, Asn212 и His309. Каталитическая реакция начинается с нуклеофильной атаки молекулы воды, координированной прямо или опосредованно через ион Mg^{2+} остатком Asp210 [11, 13], по 5'-фосфатной группе.

Ранее методом «остановленного потока» с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана [14, 15], входящих в состав фермента, и 2-аминопурина [16], расположенного с 3'- или 5'-стороны от AP-сайта, был установлен кинетический механизм взаимодействия APE1 с ДНК-субстратами (схема). В качестве субстратов использовали ДНК-дуплексы, содержащие нативный AP-сайт или его аналог (F-сайт) без OH-группы в положении C1' дезоксирибозы. Показано, что взаимодействие APE1 с субстратами включает, как минимум, две стадии связывания ДНК и узнавания AP-сайта, которые приводят к образованию каталитически компетентного комплекса. В этом комплексе происходит необратимая стадия каталитического гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи AP-сайта. Последняя стадия кинетического механизма характеризует равновесный процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции.

Схема. Кинетический механизм взаимодействия APE1 с ДНК-субстратом



где E – фермент, S – субстрат, $(E \cdot S)_1$ и $(E \cdot S)_2$ – комплексы фермента с субстратом, P – продукт превращения субстрата, E · P – комплекс фермента с продуктом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций равновесных стадий, k_{cat} – константа скорости каталитической стадии, K_p – равновесная константа диссоциации комплекса E · P.

Следует отметить, что согласно рентгеноструктурным данным связывание ДНК приводит лишь к незначительным структурным перестройкам APE1 (рис. 2). Сравнение структуры свободного APE1 (PDB ID 4LND) и комплекса APE1 с ДНК, содержащей F-сайт (PDB ID 1DE8), показывает, что один из семи остатков триптофана молекулы фермента, Trp280, расположен в ДНК-связывающем центре фермента и образует водородную связь с фосфатной группой ДНК. Таким образом, наблюдаемые изменения флуоресценции Trp, скорее всего, характеризуют конформационные изменения фермента в области Trp280.

Цель нашей работы состояла в определении термодинамических параметров конформационных перестроек APE1 при специфическом узнавании поврежденного участка ДНК и осуществлении каталитической стадии ферментативной реакции в условиях эксцизионной репарации оснований с использованием кинетических данных ферментативного процесса, полученных для различных температур. Использованный подход позволил определить термодинамические параметры стадий образования каталитически активной формы фермента, включая

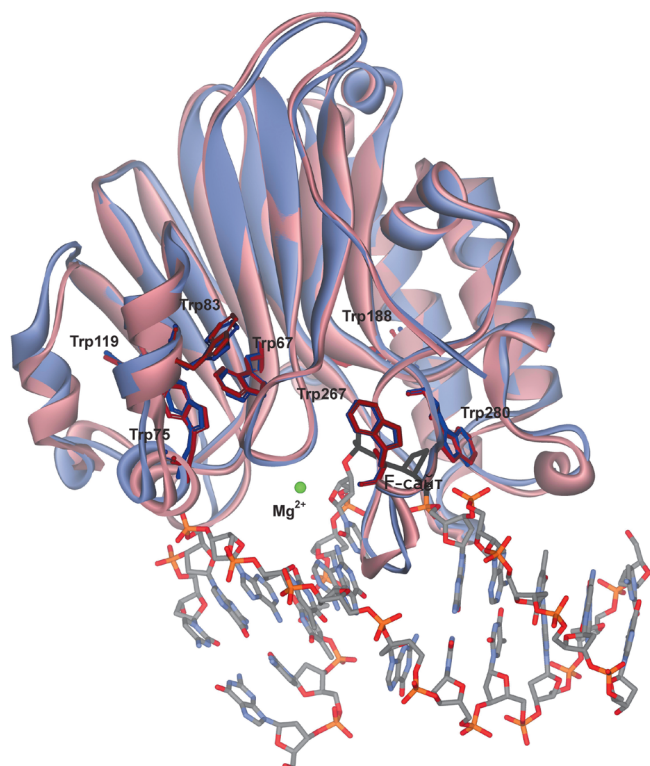


Рис. 2. Сравнение структуры свободного APE1 (розовый, PDB ID 4LND) и комплекса APE1 с ДНК, содержащей F-сайт (фиолетовый, PDB ID 1DE8)

промежуточный фермент-субстратный комплекс, в отличие от данных [17], полученных ранее для неактивной формы APE1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (PRP-X500 Hamilton Company 3.9×300 mm particle size 12–30 μm) и последующей обращенно-фазовой хроматографии (Nucleoprep 100-20 C₁₈ 10 \times 250 mm, Macherey-Nagel, Германия). Чистоту олигонуклеотидов проверяли с помощью денатурирующего электрофореза в 20% полиакриламидном геле (ПААГ). Концентрацию олигонуклеотидов измеряли по оптической плотности растворов на длине волны 260 нм в электронных спектрах поглощения и рассчитывали по закону Бугера–Ламберта–Бера, исходя из коэффициентов молярной экстинкции, определенных в приближении метода «ближайших соседей» [18]. ДНК-субстрат фермента APE1 (F-субстрат) представлял собой 17-звенный дуплекс, состоящий из дезоксирибоолигонуклеотидов

5'-TCTCTCTCFCCTTCCTT-3' и
3'-AGAGAGAGGGGAAGGAA-5'.

Фермент APE1

Фермент APE1 был выделен из линии клеток *Escherichia coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET11a, несущей ген AP-эндонуклеазы человека. Культуру клеток *E. coli* Rosetta 2 выращивали 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 20°C и индуцировали транскрипцию добавлением изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом до 0.2 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали в течение 16 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащего 40 мМ NaCl. Клетки лизировали при помощи френч-пресса. 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 I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащим 40 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок APE1, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Heparin™, Amersham Biosciences, Швеция). Хроматографию проводили в буферном растворе I и линейном градиенте 40 \rightarrow 600 мМ NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали на длине волны 280 нм. Степень чистоты белка APE1 определяли с помощью гелеэлектрофореза. Фракции, содержащие белок APE1, 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 значений оптической плотности белка на длине волны 280 нм и коэффициента молярной экстинкции 56818 M⁻¹cm⁻¹ [19].

Кинетические исследования методом «остановленного потока»

Кинетические кривые флуоресценции регистрировали с использованием спектрометра остановленной струи SX.20 (Applied Photophysics, Великобритания). Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 290 нм. Флуоресценцию регистрировали на длинах волн более 320 нм (Schott filter WG 320). Поскольку молекула APE1 содержит семь остатков Trp и 11 остатков Tyr, то в использованных условиях регистрации интенсивность флуоресценции белка более чем на 90% определялась остатками Trp. «Мертвое» время прибора составляло 1.1 мс, максимальное время регистрации сигнала равно 200 с. Все экспе-

рименты выполняли в буферном растворе, соответствующем условиям ЭРО: 50 мМ трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 7% глицерин при 10–37°C. Каждую кинетическую кривую усредняли, как минимум, по трем экспериментальным кривым.

Анализ степени гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи в AP-сайте

Для получения зависимостей степени гидролиза 5'-фосфодиэфирной связи в AP-сайте от времени смешивали растворы фермента и меченого ³²P субстрата. Метку вводили по 5'-концу F-содержащего олигонуклеотида с помощью T4-полинуклеотидкиназы («СибЭнзим», Новосибирск) и [^γ-³²P]АТР («Биосан», Новосибирск) согласно [20, 21]. Далее из реакционной смеси отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые помещали в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 3 мкл раствора 7 М мочевины, 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленианола FF. Электрофорез в ПААГ проводили при напряжении 50 В/см. Гель радиоавтографировали на рентгеновскую пленку Agfa CP-BU New (Agfa-Geveart, Бельгия) в течение 12–60 ч при –20°C.

Анализ кинетических кривых

Для расчета констант скорости конформационных переходов получали набор кинетических кривых для разных концентраций субстрата при разных температурах. Регистрацию проводили 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 стадий данной схемы использовали программу DynaFit (BioKin, США) [22]. Количественную обработку результатов экспериментов проводили путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы, как описано ранее [23–25].

Используя полученные значения констант скорости отдельных стадий, рассчитывали константы равновесия (K_i) этих стадий (k_i/k_{-i} , где i – номер стадии) при разных температурах. Стандартные термодинамические параметры i -й равновесной стадии определяли с помощью уравнения Вант-Гоффа (1) [26, 27]

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

Зависимости $\ln(K_i)$ от $1/T$ имели линейный вид.

Анализ температурной зависимости константы скорости химической реакции k_{cat} по уравнению

Эйринга (2) позволил рассчитать стандартную энтальпию активации (ΔH^\ddagger) и стандартную энтропию активации (ΔS^\ddagger) переходного состояния [26]

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

где k_B и h – постоянные Больцмана и Планка соответственно, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура в градусах Кельвина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для уточнения природы процессов, происходящих на последовательных стадиях узнавания F-сайта в ДНК-субстрате, катализа и диссоциации комплекса фермента с продуктом, был выполнен постадийный термодинамический анализ взаимодействия APЕ1 с F-субстратом. Методом «остановленного потока» с регистрацией интенсивности флуоресценции остатков Trp в APЕ1 получены кинетические кривые, характеризующие взаимодействие APЕ1 с 17-звенным F-субстратом в условиях одного оборота фермента при температуре от 10 до 37°C (рис. 3). Видно, что взаимодействие APЕ1 с F-субстратом приводит к многофазным изменениям интенсивности флуоресценции Trp. Согласно полученным ранее данным [14, 15], уменьшение интенсивности флуоресценции на начальном участке кинетических кривых характеризует образование каталитически компетентного комплекса. Каталитическая стадия процесса, приводящая к образованию продуктов и последующей диссоциации комплекса фермент–продукт, сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции Trp на более поздних временах (начиная примерно от 1 с). Как видно из кинетических кривых (рис. 4), обе фазы изменения интенсивности флуоресценции зависят от температуры.

Анализ кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции белка показал, что минимальный кинетический механизм взаимодействия APЕ1 с ДНК-субстратом, содержащим в качестве повреждения F-сайт, включает двухстадийное равновесное связывание, необратимое образование комплекса фермент–продукт и равновесную диссоциацию этого комплекса, который, как и ранее [14–16], описывается *схемой*.

Константы скорости прямых и обратных реакций, характеризующие взаимодействие APЕ1 с ДНК-субстратом при разных температурах, рассчитывали методом нелинейной регрессии, включающим численное интегрирование дифференциальных уравнений, соответствующих *схеме*, как описано ранее [28, 29]. Используя полученные константы скорости, определяли константы равновесия K_1 и K_p (табл. 1).

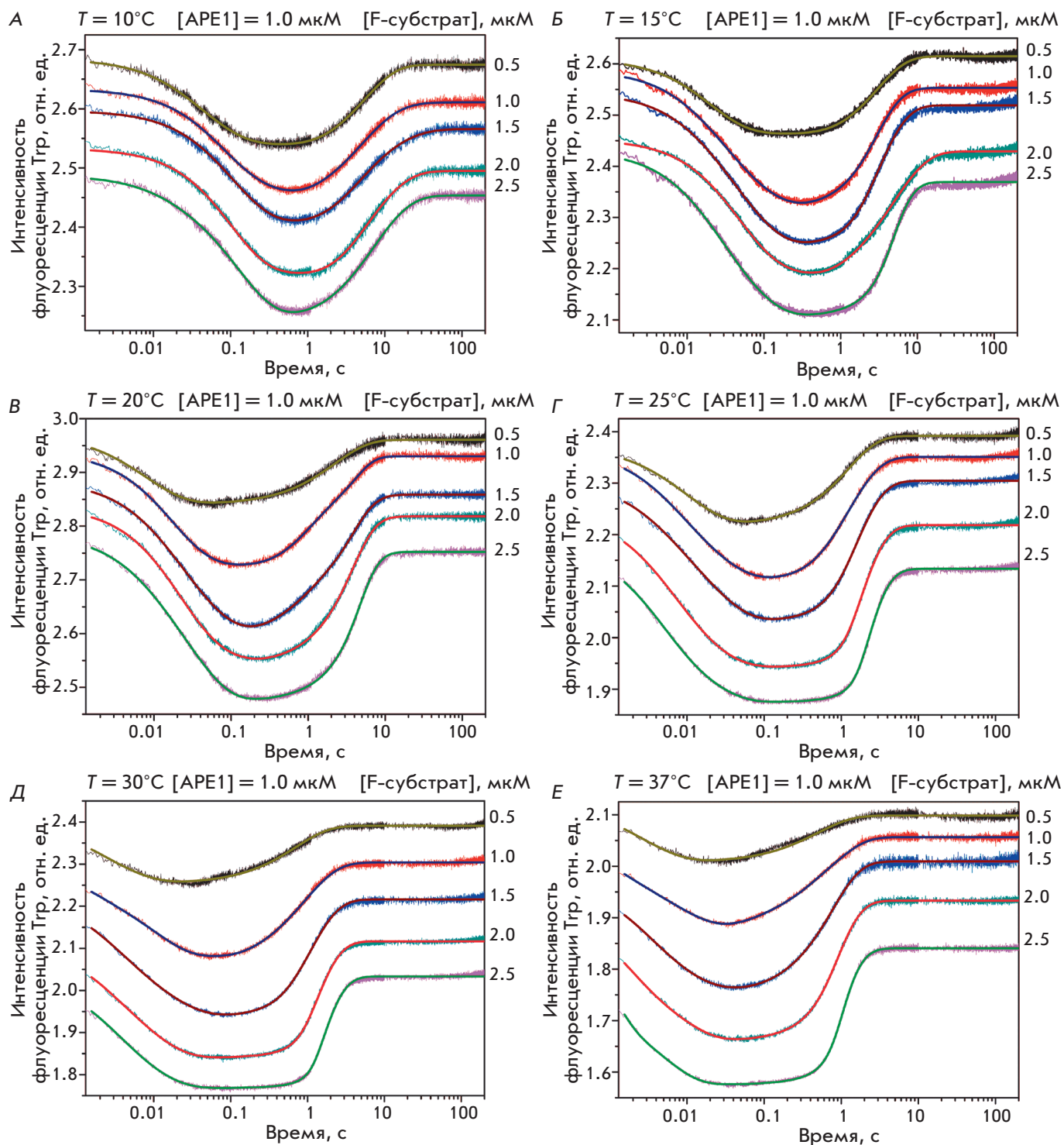


Рис. 3. Экспериментальные кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения APE1 при взаимодействии с F-субстратом при 10°C (А), 15°C (Б), 20°C (В), 25°C (Г), 30°C (Д) и 37°C (Е), и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме. [APE1] = 1.0 мкМ, концентрация F-субстрата варьирует в диапазоне от 0.5 до 2.5 мкМ

Таблица 1. Константы скорости отдельных стадий взаимодействия APE1 с F-субстратом в условиях ЭРО и константы диссоциации комплекса фермент–продукт

Температура	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C
Константа						
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(5.1 \pm 2.1) \times 10^6$	$(16.0 \pm 3.4) \times 10^6$	$(46.0 \pm 12.0) \times 10^6$	$(100 \pm 12) \times 10^6$	$(190 \pm 32) \times 10^6$	$(520 \pm 20) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	3.3 ± 0.4	7.3 ± 3.6	12.0 ± 5.1	11.0 ± 2.5	19.0 ± 5.2	47.0 ± 13.0
K_1^*, M	0.65×10^{-6}	0.47×10^{-6}	0.26×10^{-6}	0.11×10^{-6}	0.10×10^{-6}	0.09×10^{-6}
k_2, c^{-1}	4.2 ± 2.6	3.7 ± 1.2	8.2 ± 3.9	8.8 ± 4.4	15.0 ± 1.8	24.0 ± 9.0
k_{-2}, c^{-1}	5.7 ± 1.9	5.5 ± 2.9	19.0 ± 3.7	27.0 ± 4.2	40.0 ± 6.6	93.0 ± 17.4
K_2	1.27	0.51	0.68	0.81	0.79	0.52
k_{cat}, c^{-1}	1.4 ± 0.6	2.0 ± 0.7	2.5 ± 1.2	4.6 ± 2.2	6.6 ± 2.2	9.2 ± 1.0
K_p, M	$(13.5 \pm 3.9) \times 10^{-6}$	$(10.6 \pm 1.9) \times 10^{-6}$	$(7.2 \pm 1.8) \times 10^{-6}$	$(6.6 \pm 2.3) \times 10^{-6}$	$(6.9 \pm 1.2) \times 10^{-6}$	$(4.2 \pm 0.6) \times 10^{-6}$

*Константы равновесия для стадий связывания рассчитаны по формуле $K_i = k_{-i}/k_i$.

Таблица 2. Термодинамические параметры взаимодействия APE1 с F-субстратом

Стадия (номер)	Параметр	$\Delta G_{i,298}^\circ$, ккал/моль	ΔH_i° , ккал/моль	ΔS_i° , кал/(моль×К)
Первичное связывание ДНК (1)		-9.2	14.3 ± 2.2	79.0 ± 7.6
Специфическое узнавание F-сайта (2)		0.5	-6.8 ± 1.2	-24.6 ± 4.0
Суммарное значение параметров для стадий связывания $\sum_{i=1}^{i=2}$		-8.7	7.5 ± 3.4	54.4 ± 11.7
Переходное состояние каталитической стадии (3)		16.6	12.2 ± 0.8	-14.8 ± 2.8
Образование комплекса фермент–продукт (4)		-7.0	6.8 ± 1.0	46.6 ± 3.5

Как показано на рис. 5, зависимости $\ln(K_i)$ и $\ln(k_{cat}/T)$ от $1/T$ имеют линейный вид, что позволяет рассчитать термодинамические параметры равновесных стадий по уравнению Вант-Гоффа (1) и параметры переходного состояния каталитической стадии по уравнению Эйринга (2) (табл. 2).

Согласно полученным данным, образование первичного фермент-субстратного комплекса (первая стадия в схеме) характеризуется положительным значением стандартной энтальпии (14.3 ккал/моль) и положительным значением энтропии (79.0 кал/(моль × К)). Известно, что увеличение энтропии при взаимодействии ДНК-связывающих белков с ДНК, как правило, обусловлено двумя факторами: десольватацией полярных групп в области контакта белок–ДНК [30] и вытеснением высокоупорядоченных «кристаллических» молекул воды из бороздок ДНК [31]. Можно предположить, что на этой стадии происходит образование связей между аминокислотными остатками ДНК-связывающего центра и ДНК-дуплексом. Среди них можно отметить взаимодействие между фосфатными группами ДНК-дуплекса с 5'- и 3'-стороны от F-сайта и остатками Arg73, Ala74, Lys78, Trp280, Asn222, Asn226 и Asn229 (рис. 1). Кроме того, в этот момент времени, вероятно, происходят встраивание остатка Arg177 в ДНК-

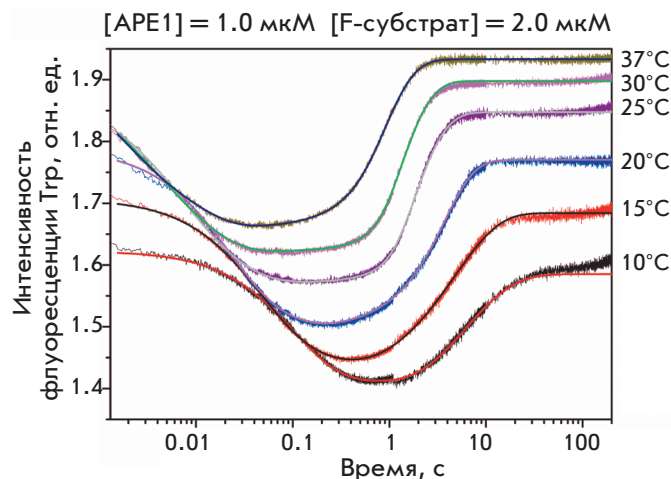


Рис. 4. Изменения интенсивности флуоресценции Trp в процессе взаимодействия APE1 и F-субстрата при различных температурах. [APE1] = 1.0 мкМ, [ДНК] = 2.0 мкМ

дуплекс со стороны большой бороздки и образование водородной связи с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от F-сайта. Остаток Met270 встраивается в ДНК-дуплекс со стороны малой бороздки и также может вытеснить «кристаллическую» воду.

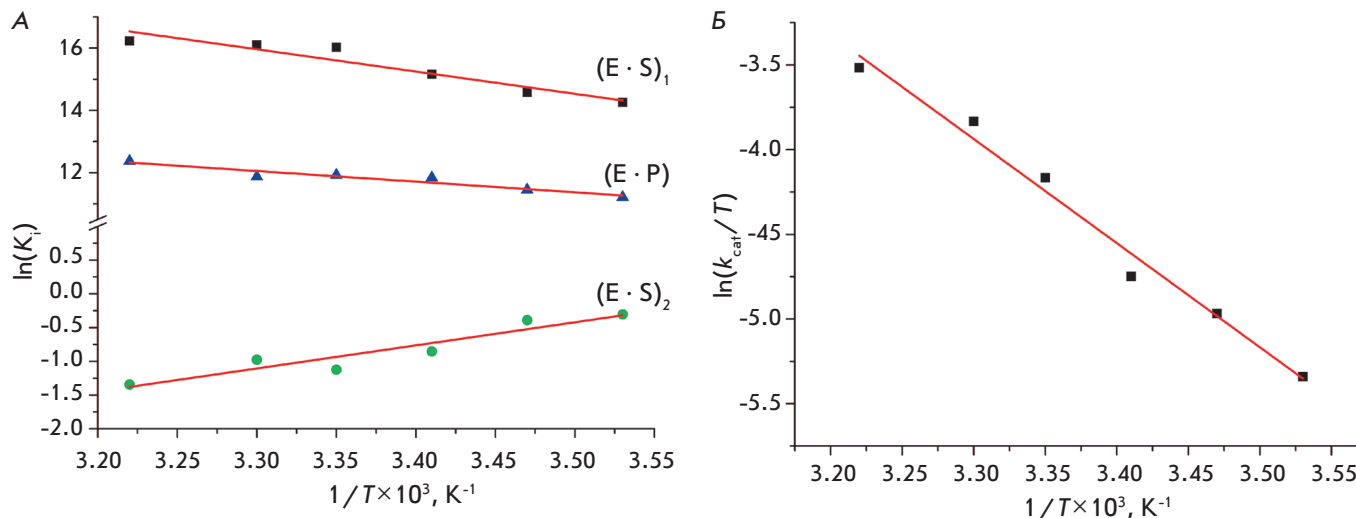


Рис. 5. Зависимости $\ln(K_i)$ (А) и $\ln(k_{cat}/T)$ (Б) от $1/T$

Ранее, на примере ДНК-гликозилаз Fpg *E. coli* [28] и hOGG1 человека [29], принадлежащих к разным структурным классам и, как следствие, образующих с ДНК отличающиеся по своей природе контакты, было показано, что стадии образования фермент-субстратного комплекса и его изомеризации в каталитически компетентное состояние характеризуются значительным ростом энтропии, также, по-видимому, вызванному десольватацией взаимодействующих поверхностей белка и ДНК.

Вторая стадия взаимодействия APE1 с F-субстратом, представляющая собой специфическую перегруппировку комплекса $(E \cdot S)_1$, характеризуется отрицательным значением изменения как энтальпии ($\Delta H_2^\circ = -6.8$ ккал/моль), так и энтропии (-24.6 ккал/(моль \times К)). Отрицательное значение ΔH_2° свидетельствует о стабилизации комплекса при образовании новых, энергетически выгодных связей между взаимодействующими атомами, а отрицательное значение ΔS_2° – об увеличении его жесткости, т.е. об уменьшении внутренних степеней свободы. Эта стадия, по-видимому, включает процесс выворачивания F-сайта в активный центр фермента и стабилизации этого состояния с помощью остатков Arg177 и Met270, которые встраиваются в большую и малую бороздки ДНК соответственно. Кроме того, в этот момент происходит, вероятно, образование связей между фосфатной группой, расположенной в 5'-направлении от F-сайта (рис. 1), остатками Asn174, Asn212 и His309 и ионом Mg^{2+} , расположенными в активном центре фермента.

Для третьей, каталитической, стадии были рассчитаны значения энтальпии (ΔH°) и энтропии (ΔS°) активации процесса образования переходного комплек-

са. Полученное значение энтальпии активации равно 12.2 ккал/моль. Необходимо отметить, что это значение относится к стадии гидролиза фосфодиэфирной связи ферментом APE1 и лежит в диапазоне величин 6.0–18.6 ккал/моль, полученных ранее для каталитических стадий реакций разрыва N-гликозидной связи и β -элиминирования фосфатных групп, осуществляемых ДНК-гликозилазами Fpg и hOGG1 [28, 29].

Термодинамические параметры образования комплексов APE1 с AP-содержащей ДНК были определены ранее методом SPR, т.е. в гетерофазных условиях, для каталитически неактивной формы фермента в отсутствие ионов Mg^{2+} [17]. Используемый же нами подход [28, 29] позволяет получать термодинамические данные для процессов, протекающих в водном растворе, т.е. в гомофазных условиях, с участием каталитически активных форм ферментов, в том числе короткоживущих фермент-субстратных промежуточных комплексов.

Интересно отметить, что термодинамические параметры стадии образования комплекса фермента с продуктом реакции коррелируют с параметрами образования первичного комплекса. Как и первая стадия, этот процесс характеризуется положительными значениями изменений стандартных значений энтальпии и энтропии (6.8 ккал/моль и 46.6 ккал/(моль \times К) соответственно). Это свидетельствует о том, что основной вклад в термодинамические параметры этой стадии вносят те же взаимодействия, которые происходят на первой стадии связывания APE1 с ДНК-субстратом – неспецифические контакты между ДНК-связывающим центром и рибозофосфатным остовом ДНК-дуплекса. Однако комплекс фермента с продуктом $E \cdot P$ можно

считать истинным неспецифическим комплексом, тогда как образование первичного комплекса $(E \cdot S)_1$ в случае короткого ДНК-субстрата включает некоторые элементы специфического узнавания F-сайта. Поэтому образование комплекса $(E \cdot S)_1$ по сравнению с комплексом $E \cdot P$ энергетически более выгодно ($\Delta\Delta G_{298}^\circ = -2.2$ ккал/моль, $\Delta\Delta H^\circ = 7.5$ ккал/моль, $\Delta\Delta S^\circ = 32.4$ кал/(моль \times К)).

Таким образом, нами получены термодинамические параметры конформационных перестроек фермента АРЕ1 в процессе специфического узнавания поврежденного участка ДНК и осуществления ка-

талитической стадии, которые позволили сделать вывод о молекулярной природе отдельных стадий кинетического механизма, описывающего функционирование фермента. ●

Работа поддержана ФАНО, грантом РАН 6.11 по программе «Молекулярная и клеточная биология», грантом ведущих научных школ НШ-7564.2016.4, грантами РФФИ № 16-04-00037, 15-34-20121 и 15-04-00467. Часть работы, включающая анализ экспериментальных данных, поддержана грантом РФФИ № 14-14-00063.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindahl T. // Nature. 1993. V. 362. P. 709–715.
- Wilson III D.M., Barsky D. // Mutat. Res. 2001. V. 485. P. 283–307.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. DNA Repair and Mutagenesis. Washington: ASM Press, 2006.
- Mol C.D., Parikh S.S., Putnam C.D., Lo T.P., Tainer J.A. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1999. V. 28. P. 101–128.
- David S.S., Williams S.D. // Chem. Rev. 1998. V. 98. P. 1221–1261.
- Demple B., Sung J.-S. // DNA Repair (Amst.). 2005. V. 4. P. 1442–1449.
- Dyrkheeva N.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. // Mol. Biol. (Mosk.). 2007. V. 41. P. 450–466.
- Gorman M.A., Morera S., Rothwell D.G., de La Fortelle E., Mol C.D., Tainer J.A., Hickson I.D., Freemont P.S. // EMBO J. 1997. V. 16. P. 6548–6558.
- Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson D.M., 3rd, Rupp B. // J. Mol. Biol. 2001. V. 307. P. 1023–1034.
- Manvilla B.A., Pozharski E., Toth E.A., Drohat A.C. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. P. 2555–2562.
- Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. // Nature. 2000. V. 403. P. 451–456.
- Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A. // Mutat. Res. 2000. V. 460. P. 211–229.
- Tsutakawa S.E., Shin D.S., Mol C.D., Izumi T., Arvai A.S., Mantha A.K., Szczesny B., Ivanov I.N., Hosfield D.J., Maiti B., et al. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 8445–8455.
- Timofeyeva N.A., Koval V.V., Knorre D.G., Zharkov D.O., Saparbaev M.K., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2009. V. 26. P. 637–652.
- Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Zharkov D.O., Strauss P.R., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2010. V. 49. P. 6451–6461.
- Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2012. V. 51. P. 1306–1321.
- Adhikari S., Uren A., Roy R. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 1334–1339.
- Fasman G.D. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3ed. Cleveland: CRC Press, 1975.
- Gill S.C., von Hippel P.H. // Anal. Biochem. 1989. V. 182. P. 319–326.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // DNA Repair (Amst.). 2012. V. 11. P. 884–891.
- Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Koval V.V., Buckle M., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 11335–11343.
- Kuzmic P. // Anal. Biochem. 1996. V. 237. P. 260–273.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 1029–1038.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Vorobjev Y.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 424–435.
- Koval V.V., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. // Mutat. Res. 2010. V. 685. P. 3–10.
- Atkins P., Paula J., Atkins' Physical Chemistry. 8th Edition. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2006.
- Ragone R., Colonna G., Ambrosone L. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. P. 13050–13050.
- Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. P. 7384–7392.
- Kuznetsov N.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e98495.
- Jen-Jacobson L., Engler L.E., Jacobson L.A. // Structure. 2000. V. 8. P. 1015–1023.
- Privalov P.L., Dragan A.I., Crane-Robinson C. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. P. 2483–2491.