УДК 577.15: 544.3

Влияние структуры субстрата и ионов металлов на эффективность гидролиза неповрежденной РНК апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой человека APE1

А. А. Кузнецова, Д. С. Новопашина, О. С. Федорова*, Н. А. Кузнецов*
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия
*E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru
Поступила в редакцию 17.01.2020
Принята к печати 20.03.2020
DOI: 10.32607/actanaturae.10864

РЕФЕРАТ **Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека APE1 – один из участников системы эксцизионной репарации оснований ДНК. Основной биологической функцией APE1 считается гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АР-сайтов. Как показано недавно, APE1 выступает в качестве эндорибонуклеазы, которая может расщеплять мРНК и тем самым контролировать уровень определенных транскриптов. APE1 расщепляет преимущественно динуклеотиды CA, UA и UG в РНК. В настоящей работе проведен сравнительный анализ эффективности расщепления модельных РНК-субстратов, представляющих собой короткие шпилечные структуры, в которых варьировали размер петли, а также местоположение динуклеотидной последовательности пиримидин–пурин. Выявлено влияние различных ионов двухвалентных металлов и pH на протекание эндорибонуклеазной реакции. Показано, что сайт-специфический гидролиз модельных РНК-субстратов зависит от пространственной структуры субстрата. Кроме того, расщепление РНК происходит в отсутствие ионов двухвалентных металлов, что свидетельствует об изменении каталитического механизма, установленного для реакции гидролиза ДНК-субстратов.**
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА **АР-эндонуклеаза человека, эндорибонуклеазная активность, субстратная специфичность.**

ВВЕДЕНИЕ

Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека APE1 – один из наиболее изученных ферментов репарации ДНК [1]. Фермент расщепляет фосфодиэфирную связь в ДНК с 5'-стороны от АР-сайта, в результате чего происходит разрыв рибозофосфатного остова с образованием фрагментов цепи, содержащих 3'-гидроксильную группу и 2'-дезоксирибозо-5'-фосфат [2, 3]. Однако фермент способен узнавать не только АР-сайты, но и некоторые поврежденные нуклеотиды, например, 5,6-дигидроуридин, альфа-аномер аденозина и др. [4]. Кроме того, APE1 обладает 3'-фосфодиэстеразной, 3'-фосфатазной [5], а также 3'-5'-экзонуклеазной активностями [6, 7].

Ранее было показано, что APE1 вызывает деградацию цепи РНК в дуплексах ДНК-РНК, т.е. обладает РНКаза H-подобной активностью [8]. Позднее установили, что APE1 способна расщеплять как РНК, содержащую АР-сайт [9], так и структурированные протяженные неповрежденные мРНК, например мРНК c-myc [10]. Способность расщеплять РНК показана также на микроРНК, CD44 РНК, РНК-компонентах коронавируса SARS [11]. При этом основным сайтом расщепления неповрежденных фрагментов РНК является фосфодиэфирная связь между динуклеотидами UA, UG и CA в одноцепочечных последовательностях или слабо спаренных участках РНК, тогда как динуклеотиды UC, CU, AC и AU с менее эффективным гидролизом относятся к второстепенным сайтам расщепления [11]. Последовательности, богатые CA-динуклеотидами, известны как мощные энхансеры/сайленсеры сплайсинга [12], поэтому преимущественное расщепление по CA-последовательностям указывает на возможную роль APE1 в сплайсинге мРНК [13, 14].

Таким образом, АР-эндонуклеаза человека выполняет широкий набор функций в клетке. На основе структурных данных, кинетических исследований

и мутационного анализа в настоящее время установлены ключевые этапы взаимодействия APE1 с поврежденной ДНК, содержащей AP-сайт [15–17], некоторые поврежденные [18] и неповрежденные [7] нуклеотиды. Предложен механизм широкой субстратной специфичности AP-эндонуклеазы при взаимодействии с ДНК [18]. Для осуществления катализа в комплексе APE1–ДНК образуются контакты, которые приводят к выворачиванию поврежденного нуклеотида из двойной спирали в активный центр фермента, образованный остатками Asp308, His309, Glu96, Asp210, Tyr171, Asn212 и Asn174. Аминокислотные остатки фермента взаимодействуют преимущественно с одной цепью двойной спирали. В фермент-субстратном комплексе, находящемся в каталитически компетентном состоянии, фосфатная группа, расположенная с 5'-стороны от поврежденного нуклеотида, координирована остатками Asn174, Asn212 и His309. При этом гидролиз фосфодиэфирной связи начинается с нуклеофильной атаки атома фосфора; нуклеофилом при этом выступает кислород молекулы воды, координированной через ион Mg^{2+} остатком Asp210.

Роль ионов Mg^{2+} в процессах связывания поврежденной ДНК, ее расщепления и высвобождения продукта реакции активно обсуждалась в ряде работ [19–27]. Интересно отметить, что эффективность гидролиза фосфодиэфирной связи в ДНК, содержащей неактивный аналог AP-сайта (2-оксиметил-3-окси-тетрагидрофуран, F-сайт), уменьшается в ряду $Mg^{2+} > Mn^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} >> Ca^{2+}$, Cu^{2+} [16]. Ион Ca^{2+}, обладающий самым большим ионным радиусом [28], по-видимому, не может правильно координироваться в металлсвязывающем центре фермента и блокирует каталитический процесс. А ингибирующий эффект ионов Cu^{2+}, скорее всего, связан с сильным взаимодействием ионов Cu^{2+} с азотистыми основаниями и фосфатными группами как описано ранее [29].

Известно, что для эндорибонуклеазной активности не требуется ионов двухвалентных металлов [11, 30]. Действительно, РНК-расщепляющая активность APE1 наблюдалась и при 10 мМ EDTA, и в присутствии ионов Mg^{2+}, Ca^{2+} и Mn^{2+}. При этом присутствие ионов Zn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} и Co^{2+}, как и в случае ДНК-субстратов, ингибировало эндорибонуклеазную реакцию. Для выяснения механизма эндорибонуклеазной реакции была исследована активность мутантных форм APE1, несущих замены аминокислотных остатков активного центра N68A, D70A, Y171F, D210N, F266A, D283N, D308A и H309S [30]. Анализ активности данных мутантных форм APE1 по отношению к модельным РНК- и ДНК-субстратам показал, что большинство перечисленных остатков, критических для гидролиза AP-сайта в двухцепочечной ДНК, важны также для осуществления эндорибонуклеазной активности. При этом остаток Asp283, вероятно, не принимает участия в гидролизе РНК-субстрата, поскольку мутантная форма APE1 D283N сохраняла эндорибонуклеазную активность в отсутствие иона металла. Ключевым отличием в каталитическом механизме гидролиза фосфодиэфирной связи у РНК- и ДНК-субстратов является образование разных продуктов реакции: 3'-PO_4^{2-} и 3'-OH в случае РНК и ДНК соответственно [30].

Таким образом, согласно опубликованным данным, каталитические механизмы гидролиза ДНК и РНК ферментом APE1 различаются, однако причины этих различий выяснены не до конца. Неизвестно, например, какое влияние оказывают особенности пространственного строения субстрата и природа ионов металлов на эффективность эндорибонуклеазного гидролиза. Поэтому цель представленной работы состояла в проведении кинетического анализа эндорибонуклеазного гидролиза модельных РНК-субстратов, формирующих шпилечные структуры с размером петли от 2 до 5 нуклеотидов, содержащие в разных положениях петли или стебля динуклеотидные последовательности CA или UA, в отсутствие или в присутствии ионов двухвалентных металлов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы производства Sigma-Aldrich (США): акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, дитиотреит, мочевину, глицерин, HEPES, изопропил-β-*D*-тиогалактопиранозид, Трис, NaCl, NaOH, EDTA, HCl, соли двухвалентных металлов ($CaCl_2$, $CoCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$, $NiSO_4$). Все растворы готовили на дважды дистиллированной воде.

Фермент APE1

Фермент APE1 был выделен из клеток *Escherichia coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET11a, несущей ген AP-эндонуклеазы человека, как описано ранее [15]. Культуру клеток *E. coli* Rosetta 2 выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°C до оптической плотности среды 0.6–0.7 на длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 20°C и индуцировали транскрипцию вставки, кодирующей белок, добавлением изопропил-β-*D*-тиогалактопиранозида до 0.2 мМ. После индукции культуру клеток инкубировали в течение 16 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора 20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8, 40 мМ NaCl. Лизис клеток проводили при помощи френч-пресса. Все последующие процедуры проводили при 4°C. Полученный клеточный лизат

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 APE1, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Heparin™, Amersham Biosciences). Хроматографию проводили в буферном растворе I и линейном градиенте 40 → 600 мМ NaCl, оптическую плотность раствора регистрировали на длине волны 280 нм. Степень чистоты белка APE1 определяли с помощью гель-электрофореза. 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 значения оптической плотности белка на длине волны 280 нм и коэффициента молярной экстинкции 56818 $M^{-1}\times см^{-1}$.

Олигорибонуклеотиды

Олигорибонуклеотиды получали твердофазным фосфитамидным методом на синтезаторе АСМ-800 («Биоссет», Россия) с использованием соответствующих фосфитамидов 2'-O-трет-бутилдиметилсилильных (2'-O-TBDMS) рибонуклеотидов (ChemGenes, США). Для введения флуоресцеина на 5'-конец использовали фосфитамид флуоресцеина (Glen Research, США). Для получения олигонуклеотидов, содержащих на 3'-конце тушитель флуоресценции BHQ1, использовали соответствующий модифицированный полимерный носитель 3'-BHQ-1 CPG (Black Hole Quencher) (Glen Research, США). Деблокирование олигорибонуклеотидов проводили в стандартных условиях. Деблокированные олигорибонуклеотиды выделяли с помощью препаративного электрофореза в 15% ПААГ в денатурирующих условиях (акриламид : N,N'-метиленбисакриламид (30 : 1), 8 М мочевина, 50 мМ Трис-H_3BO_3, pH 8.3, 0.1 мМ EDTA). Полосы геля, содержащие продукт, вырезали и элюировали нуклеотидный материал из ПААГ. Измельченный гель помещали в пробирку объемом 2.0 мл, заливали 1–1.5 мл 0.3 М $LiClO_4$ и выдерживали в течение 16 ч при 25°C и перемешивании с использованием термомиксера Thermomixer Compact (Eppendorf, Германия). Обессоливание олигонуклеотидов проводили на фазе C18 (Waters, США).

Гомогенность олигонуклеотидов и их производных анализировали методом гель-электрофореза в 15% ПААГ в описанных выше условиях. К образцам олигонуклеотидов (~0.05 о.е.) для нанесения на гель добавляли 4–5 мкл раствора 8 М мочевины, содержащего 0.05% ксиленцианолового голубого и 0.05% бромфенолового синего. Для визуализации олигонуклеотидов использовали раствор, приготовленный из 50 мг красителя Stains-all и 100 мл смеси формамид : вода (1 : 1).

Оптическую плотность растворов олигонуклеотидов измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (ThermoScientific, США) относительно деионизованной воды. Для расчета концентрации олигонуклеотидов в исходном растворе использовали коэффициент молярного поглощения олигорибонуклеотидов или их конъюгатов при 260 нм. Молярные коэффициенты поглощения флуоресцентно меченных производных олигорибонуклеотидов считали равными сумме значений молярных коэффициентов поглощения олигонуклеотидов и молярного коэффициента поглощения флуоресцеина и тушителя, присоединенного к олигомеру (20900 $M^{-1}\times см^{-1}$ для FAM и 8000 $M^{-1}\times см^{-1}$ для BHQ1). Последовательности модельных олигорибонуклеотидов представлены в *табл. 1*.

Кинетические исследования методом «остановленного потока»

Флуоресцентные кинетические кривые были зарегистрированы на спектрометре «остановленного потока» SX.18MV (Applied Photophysics, Великобритания). Эффективность резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) между парой FAM/BHQ1 регистрировали при возбуждении флуоресценции красителя FAM на длине волны 494 нм. FRET-сигнал регистрировали на длинах волн более 530 нм при использовании светофильтра OG-515 (Schott, Германия). Мертвое время прибора составляло 1.38 мс. Каждую кинетическую кривую усредняли, как минимум, по четырем экспериментальным кривым.

Флуоресцентное титрование

Флуоресцентное титрование было выполнено на флуориметре Cary Eclipse Fluorescence

Таблица 1. Модельные РНК-субстраты, использованные в работе

РНК-субстрат, название	Нуклеотидная последовательность
HP1	5' FAM-r(AUAUAAGAUUAUAU)-BHQ1 3'
HP2	5' FAM-r(AUAUAAGAAUUAUAU)-BHQ1 3'
HP3	5' FAM-r(AUAUAAGAUAUUAUAU)-BHQ1 3'
HP4	5' FAM-r(AUAUAAGAUCAUUAUAU)-BHQ1 3'
HP5	5' FAM-r(AUACAACAUAAUUGUAU)-BHQ1 3'
HP6	5' FAM-r(AUAUAACAUCAUUAUAU)-BHQ1 3'
L	5' FAM-r(AGAGAGGCAGAGA) 3'

Примечание. FAM – остаток 6-карбоксифлуоресцеина, BHQ1 – тушитель флуоресценции black hole quencher.

Spectrophotometer. Все эксперименты проводили в течение 10 мин, что позволило пренебречь гидролизом РНК-субстратов в ходе титрования. Для этого к 100 мкл 1.0×10^{-6} М раствора РНК-субстрата в буферном растворе (50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 9% глицерин) добавляли раствор фермента. Спектр испускания флуоресценции FAM регистрировали при возбуждении на длине волны 494 нм. Для расчета значений констант диссоциации экспериментальные данные обрабатывали в пакете программ DynaFit (BioKin, Pullman, WA) [31] с использованием модели одностадийного связывания.

Микроскопический термофорез (МСТ)

Определение констант связывания исследуемых субстратов с ферментом APE1 выполнено на приборе Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) с использованием стандартных капилляров (MonolithTM NT.115 Standard Treated Capillaries). Каждая точка на кривых титрования получена путем измерения интенсивности флуоресценции отдельных растворов (10 мкл), содержащих олигонуклеотидный лиганд (0.5 мкМ) и фермент (0.05–30 мкМ) в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 9% глицерин при 25°C. Для расчета значений констант диссоциации экспериментальные данные обрабатывали в пакете программ DynaFit (BioKin, Pullman, WA) [31] с использованием модели одностадийного связывания.

Кинетический анализ гидролиза РНК-субстратов

Кинетический анализ расщепления модельных РНК-субстратов проводили по следующей методике. К 30 мкл буферного раствора, содержащего субстрат (2 мкМ), добавляли 30 мкл фермента (0.6–4 мкМ) в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 9% глицерин при 25°C. После быстрого перемешивания реакционной смеси через определенные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 10 мкл. Реакцию останавливали, добавляя 10 мкл раствора, содержащего 9 М мочевины и 25 мМ EDTA. Электрофорез в 20% ПААГ в денатурирующих условиях (7 М мочевина) проводили в вертикальной термостатируемой камере Protean II xi (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) при напряжении 200–300 В и 55°C. Гель визуализировали с помощью гель-документирующей системы E-Box CX.5 TS (Vilber Lourman, Франция). Степень расщепления субстрата определяли в пакете программ Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США). Степень расщепления рассчитывали как отношение площади пика продукта расщепления к сумме площадей пиков продукта и исходного олигорибонуклеотида. Предполагаемая ошибка определения степени модификации, как правило, не превышала 20%.

Частичный гидролиз субстрата РНКазы А проводили по следующей методике. Реакционную смесь (20 мкл), содержащую 3.0-мкМ субстрат и 3.0-нМ РНКазу А в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl (pH 8.5), 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 9% глицерин, выдерживали в течение 5 мин при 25°C. После этого в реакционную смесь добавляли 20 мкл раствора, содержащего 9 М мочевины и 25 мМ EDTA, и выдерживали в течение 5 мин при 96°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн РНК-субстратов

Согласно опубликованным данным [10, 11], APE1 расщепляет в РНК преимущественно динуклеотидные последовательности CA, UA и UG в одноцепочечных или слабо спаренных областях. Кроме того, наблюдали слабое расщепление РНК в сайтах UC, CU, AC и AU [11]. Можно предположить, что для образования каталитического комплекса важна как последовательность пиримидин–пурин, так и структура субстрата, которая может оказывать значительное влияние на узнавание целевого сайта. Действительно, расщепление РНК, наблюдаемое в одноцепочечных областях вблизи стеблей шпилечных структур [10, 11], может косвенно указывать на значительный вклад именно вторичной структуры субстрата. Поэтому мы использовали ряд модельных РНК-субстратов длиной 14–17 нуклеотидов, представляющих собой короткие шпилечные структуры, в которых длина стебля была равна шести нуклеотидным парам, а размер петли варьировал от 2 до 5 нуклеотидов; также изменялось местоположение динуклеотида CA или UA в петле или стебле шпильки (*рис. 1*). Для изучения кинетики расщепления РНК-субстратов методом FRET на 5'- и 3'-концы модельного олигонуклеотида вводили красители FAM и BHQ1 соответственно. Влияние дуплексной части шпильки на эффективность расщепления оценивали с использованием линейного субстрата L длиной 13 нуклеотидов, содержащего один динуклеотид CA. В качестве контроля специфичности гидролиза по динуклеотидам пиримидин–пурин использовали РНКазу А, обладающую специфичностью к пиримидиновым нуклеотидам независимо от их структурного расположения (*рис. 1*).

Из *рис. 1* видно, что для всех субстратов наблюдаются полосы, соответствующие продуктам расщепления по четырем последовательностям UA в стебле. Кроме того, в случае HP3–HP6 появляются дополнительные полосы, соответствующие расщеплению по UA и CA в петлях.

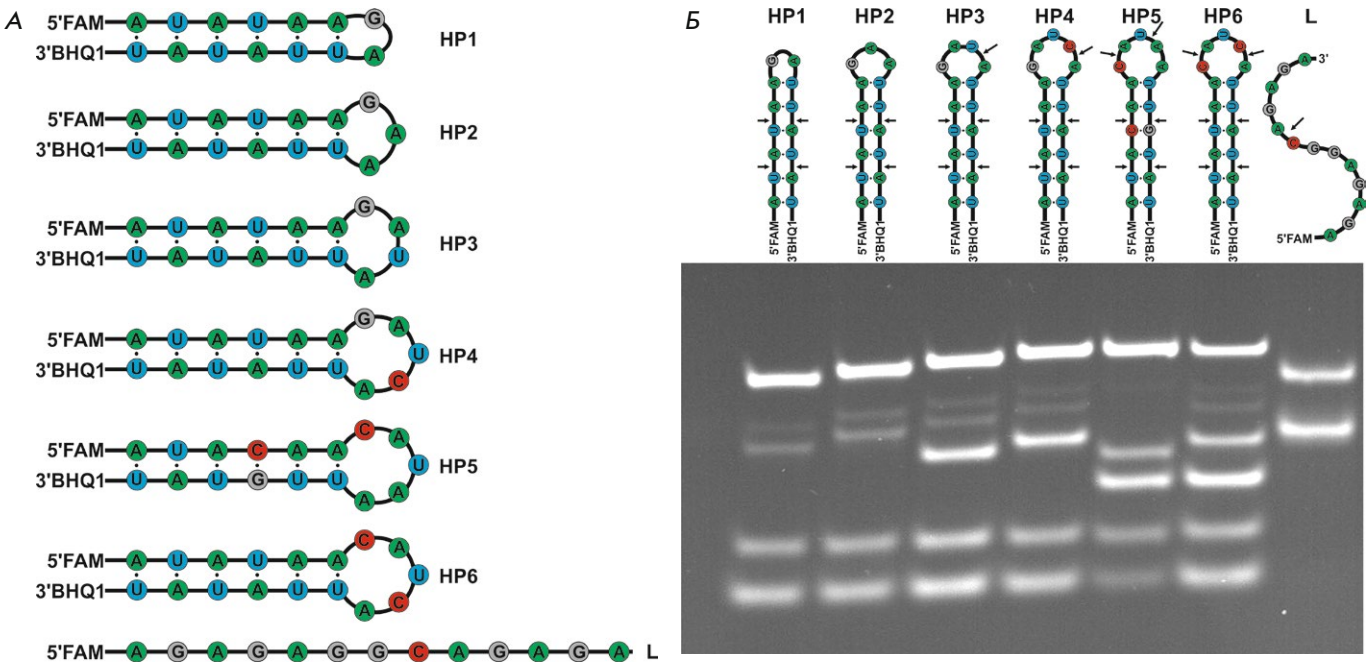

Рис. 1. Модельные РНК-субстраты, используемые в работе (*А*). Разделение продуктов расщепление РНК-субстратов РНКазой А по пиримидиновым нуклеотидам методом электрофореза в ПААГ, сайт расщепления отмечен стрелкой (*Б*)

Влияние ионов двухвалентных металлов и pH на взаимодействие APE1 с РНК-субстратами

На примере РНК-субстрата HP6 показано, что 3'-5'-экзонуклеазная и эндорибонуклеазная реакции протекают в присутствии ионов Mg^{2+}, Mn^{2+} и Ni^{2+}, тогда как в присутствии Ca^{2+} и Co^{2+} происходило в основном накопление продуктов эндорибонуклеазной реакции (*рис. 2А* и *Б*). В то же время в присутствии ионов Zn^{2+} не наблюдали какой-либо активности фермента. Кроме того, повышение pH буфера, содержащего EDTA, до 8.5 приводило к заметному снижению выхода продуктов гидролиза, тогда как понижение pH до 6.5 приводило к появлению побочных продуктов за счет статистического гидролиза.

Сравнение кинетических кривых (*рис. 2В*), характеризующих взаимодействие APE1 с HP6, позволило заключить, что начальные скорости эндорибонуклеазной реакции в присутствии EDTA или ионов Ca^{2+} имеют близкие значения, тогда как в присутствии ионов Mg^{2+} интенсивность флуоресценции FAM увеличивается быстрее, по-видимому, за счет протекания 3'-5'-экзонуклеазной реакции. Кроме того, необходимо отметить, что изменение интенсивности флуоресценции FAM в присутствии ионов Mg^{2+} также может быть связано с образованием каталитического экзонуклеазного комплекса, который приводит к отдалению тушителя BHQ1, расположенного на 3'-конце, от 5'-концевого остатка FAM.

Интересно, что при взаимодействии с ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, активность APE1 увеличивается с ростом pH, а в отсутствие ионов двухвалентных металлов или в присутствии ионов Ca^{2+} происходило полное блокирование каталитической реакции [16]. Наличие продуктов эндорибонуклеазной активности в аналогичных условиях свидетельствует о протекании реакции гидролиза РНК-субстратов по альтернативному металл-независимому каталитическому механизму.

На основании полученных данных (*рис. 2*) для анализа различных типов активности фермента в дальнейших экспериментах с различными РНК-субстратами использовали три буферных раствора (pH 7.5), содержащих 5 мМ $MgCl_2$, 5 мМ $CaCl_2$ или 1 мМ EDTA.

Гидролиз РНК-субстратов под действием APE1 в присутствии EDTA

При взаимодействии APE1 с модельными РНК-субстратами в отсутствие ионов двухвалентных металлов наблюдается накопление продуктов эндорибонуклеазной реакции для РНК-субстратов HP3–HP6, содержащих в петлевой части CA- или UA-динуклеотид (*рис. 3*). Действительно, сравнение сайтов расщепления РНК-субстратов РНКазы А, статистически расщепляющей РНК по всем пиримидиновым нуклеотидам, свидетельствует о том,

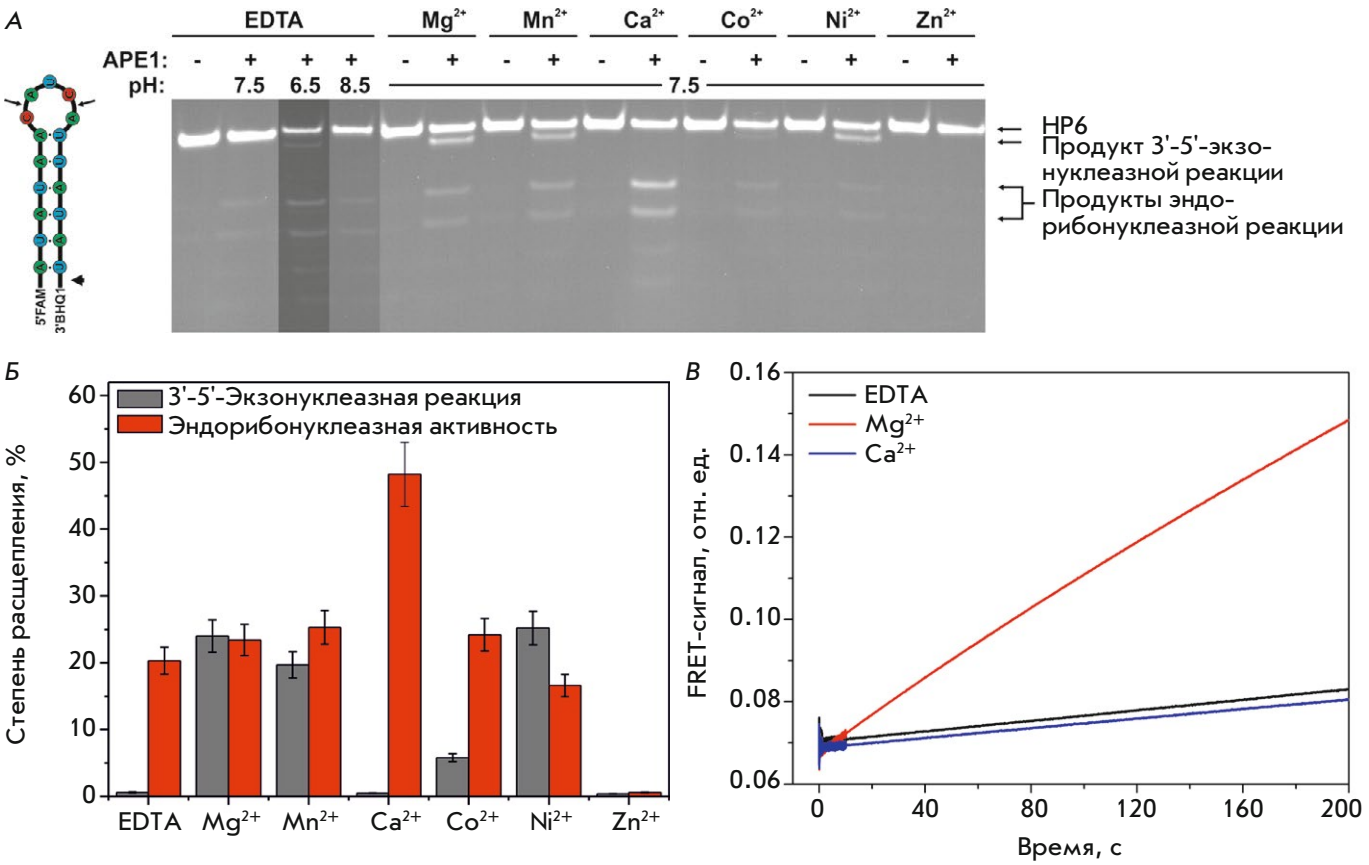

Рис. 2. Расщепление РНК-субстрата HP6 под действием APE1 в присутствии различных ионов двухвалентных металлов и pH. *А* – анализ продуктов реакции методом электрофореза в ПААГ; нуклеотид, по которому происходит расщепление, отмечен стрелкой. *Б* – степень расщепления РНК-субстрата в присутствии ионов различных двухвалентных металлов. [APE1] = 2 мкМ, [РНК] = 1 мкМ, [EDTA/Me^{2+}] = 1/5 мМ, *T* = 25°C, время реакции 1 ч. *В* – изменение FRET-сигнала в процессе взаимодействия APE1 с HP6, [APE1] = 2 мкМ, [РНК] = 1 мкМ, [EDTA/Me^{2+}] = 1/5 мМ, *T* = 25°C

что динуклеотиды UA в составе дуплексной части шпильки не узнаются AP-эндонуклеазой в качестве сайтов расщепления. При этом в отсутствие ионов двухвалентных металлов APE1 не катализирует 3'-5'-экзонуклеазную реакцию ни с одним из использованных РНК-субстратов (*рис. 3*).

Интересно, что наиболее эффективным субстратом, расщепление которого достигает 25%, является шпилька HP6, содержащая два сайта расщепления CA (*рис. 3Б*). При этом, оба сайта, согласно данным гель-электрофореза, имеют близкую степень расщепления, что указывает на независимость эффективности расщепления от положения динуклеотида CA в петле. В то же время при взаимодействии APE1 с HP4, содержащим один динуклеотид CA, степень расщепления достигает 16%. Шпилька HP5 содержит в петле динуклеотиды UA и CA с суммарной степенью расщепления 17%. Однако расщепление по динуклеотиду UA протекает значительно хуже, чем по CA (*рис. 3*), что также согласуется с небольшой (8%) степенью расщепления HP3, который содержит один динуклеотид UA. Однако при сравнении эффективности расщепления данных субстратов необходимо учитывать не только CA/UA-контекст гидролизуемой фосфодиэфирной связи, но также структуру субстрата, включающую как разный размер петли, так и разное положение гидролизуемой связи в этой петле. Поскольку сайт расщепления у шпилек HP3 (UA) и HP4 (CA) расположен в одном месте относительно стебля, то можно предположить, что петля в шпильке HP4, содержащая 5 нуклеотидов, легче адаптируется в субстратсвязывающем центре фермента по сравнению со шпилькой HP3, содержащей 4 нуклеотида в петле. При этом шпилька HP5, также содержащая 5 нуклеотидов в петле, отличается от HP4 расположением сайтов расщепления, что, по-видимому, затрудняет эффективное образование каталитического комплекса в случае HP5.

Линейный субстрат также имеет небольшую степень расщепления (около 5%), что свидетель-

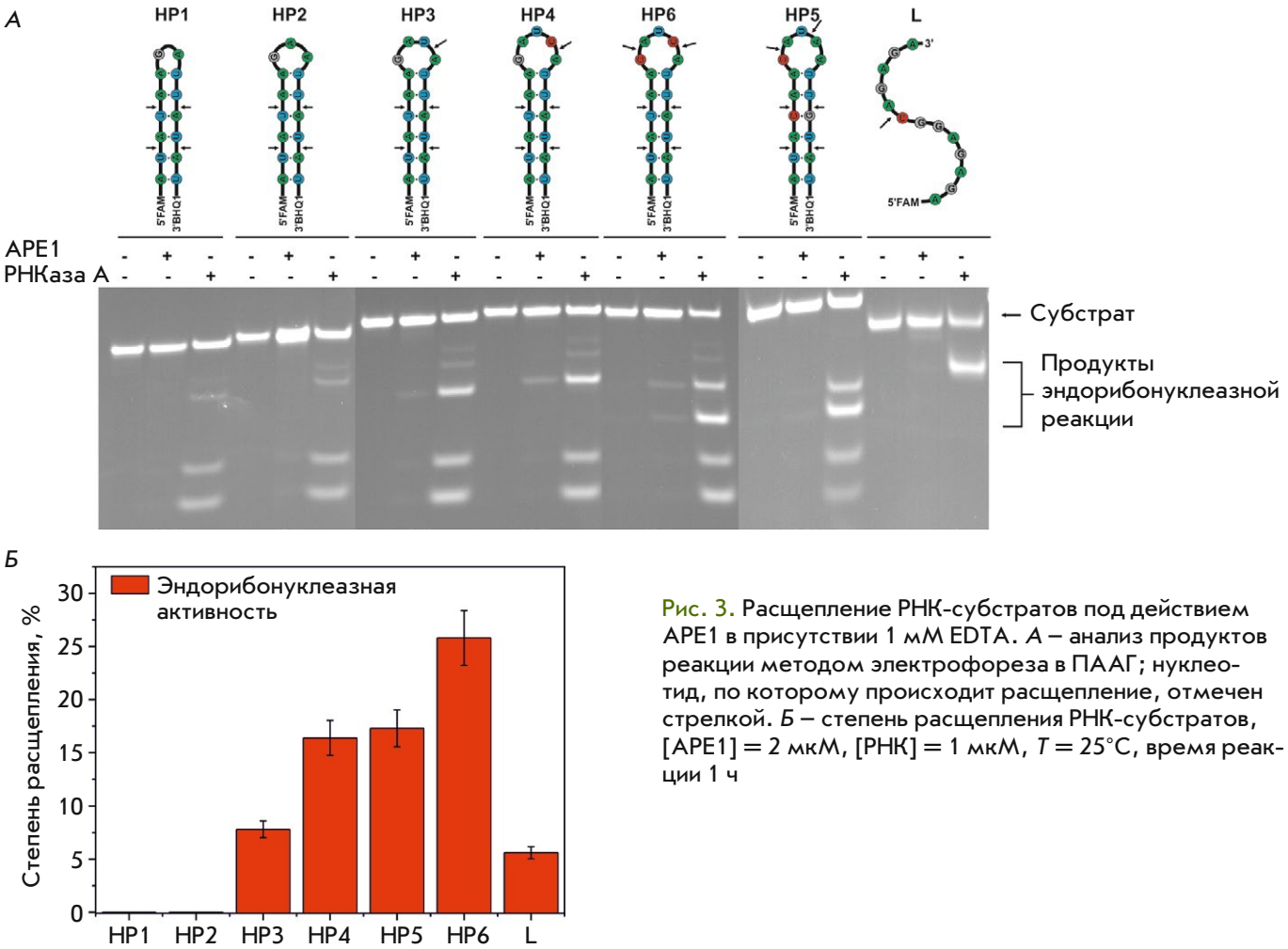

Рис. 3. Расщепление РНК-субстратов под действием APE1 в присутствии 1 мМ EDTA. *А* – анализ продуктов реакции методом электрофореза в ПААГ; нуклеотид, по которому происходит расщепление, отмечен стрелкой. *Б* – степень расщепления РНК-субстратов, [APE1] = 2 мкМ, [РНК] = 1 мкМ, *T* = 25°C, время реакции 1 ч

ствует о важной роли двухцепочечной части РНК-субстратов при образовании каталитического фермент-субстратного комплекса.

Связывание РНК-субстратов APE1 в присутствии EDTA

Низкая степень расщепления РНК-субстратов в течение 1 ч реакции (*рис. 3*) позволила провести эксперименты по флуоресцентному титрованию субстратов ферментом и оценить величину константы диссоциации фермент-субстратного комплекса. На *рис. 4А* представлена зависимость интенсивности флуоресценции на длине волны 520 нм от концентрации фермента. Для субстратов HP1–HP6, содержащих пару FAM/BHQ1, наблюдали рост FRET-сигнала при образовании фермент-субстратного комплекса. При этом в случае линейного L-субстрата, содержащего только 5'-остаток FAM, наблюдали тушение интенсивности флуоресценции. Такое различие в изменении интенсивности флуоресценции FAM может быть обусловлено связыванием фермента со шпилечными структурами не только со стороны петли, но и с 5'/3'-концевым участком. При этом присутствие в реакционных смесях продуктов эндорибонуклеазного гидролиза свидетельствует о связывании с петельной частью субстрата, а наличие продуктов 3'-5'-экзонуклеазной деградации подтверждает образование альтернативного комплекса с 5'/3'-концевым участком. Так как тушитель BHQ1 расположен на 3'-конце шпилек, то повышение интенсивности флуоресценции FAM для субстратов HP1–HP6, содержащих пару FAM/BHQ1, может быть обусловлено отдалением в пространстве остатков FAM и BHQ1 при образовании фермент-субстратного комплекса с 5'/3'-концевым участком. В случае L-субстрата, в котором отсутствует тушитель BHQ1, снижение интенсивности флуоресценции FAM происходит при образовании комплекса с молекулой фермента. Были рассчитаны значения констант диссоциации K_d (*табл. 2*).

Проведено дополнительное исследование связывания APE1 с субстратами с помощью микроскопического термофореза (МСТ) (*рис. 4Б*), рассчитаны соответствующие константы диссоциации K_d (*табл. 2*).

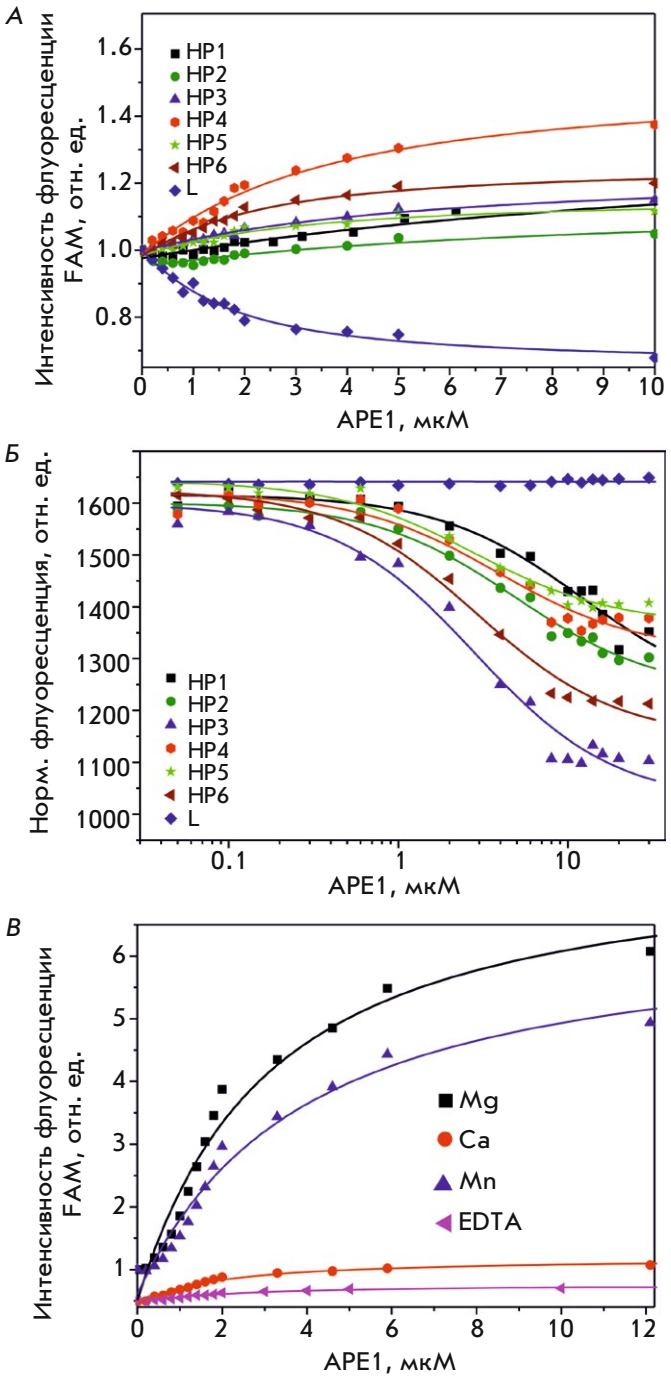

Рис. 4. Определение константы диссоциации K_d фермент-субстратных комплексов методом флуоресцентного титрования (*А*, *В*) и методом микроскопического термофореза (*Б*)

Однако полученная методом МСТ кривая титрования L-субстрата не позволила определить K_d данным методом из-за низкого соотношения сигнал/шум. Сравнение констант диссоциации (*табл. 2*) выявило хорошее соответствие значений, полученных разными методами. Таким образом, анализ стабильности фермент-субстратных комплексов методами флуоресцентного титрования и МСТ показывает, что образование комплекса APE1 с HP1 и HP2, которые имеют короткую петлю и не содержат специфический динуклеотид в петле, характеризуется наибольшими значениями констант диссоциации. При этом комплексы фермента с субстратами HP3–HP6 имеют близкие значения констант диссоциации, лежащие в диапазоне 2.2–4.9 мкМ.

Таблица 2. Значение константы диссоциации K_d

Субстрат	Буфер	K_d, мкМ	
		флуоресцентное титрование	МСТ
HP1	EDTA	13.5 ± 8.2	12.1 ± 4.3
HP2	–«–	7.8 ± 5.5	4.6 ± 0.9
HP3	–«–	4.9 ± 1.1	2.6 ± 0.6
HP4	–«–	3.0 ± 0.7	3.6 ± 1.3
HP5	–«–	3.1 ± 1.0	2.5 ± 0.6
HP6	–«–	2.2 ± 0.5	2.7 ± 0.5
	Mg^{2+}	2.8 ± 0.6	-
	Ca^{2+}	1.6 ± 0.3	-
	Mn^{2+}	3.6 ± 0.8	-
L	EDTA	1.5 ± 0.3	-

Кроме того, были оценены величины константы диссоциации комплекса, содержащего HP6 в качестве субстрата, в присутствии ионов двухвалентных металлов (*рис. 4В*, *табл. 2*). Сильное тушение флуоресценции субстрата в присутствии Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} не позволило определить величину K_d, тогда как уменьшение величины K_d, наблюдаемое в присутствии Ca^{2+}, может свидетельствовать о стабилизации фермент-субстратного комплекса.

Гидролиз РНК-субстратов под действием APE1 в присутствии ионов Ca^{2+}

Взаимодействие APE1 с РНК-субстратами в присутствии ионов Ca^{2+} приводило к увеличению эффективности гидролиза по специфическим сайтам СА в петлевой части шпильки HP6 и линейном субстрате по сравнению с условиями в отсутствие ионов двухвалентных металлов (*рис. 5*). Интересно отметить, что в случае HP4 ионы Ca^{2+} вызывали лишь небольшое уменьшение активности APE1 и не влияли при использовании HP3 и HP5 в качестве субстратов. По-видимому, данные эффекты могут быть обусловлены небольшим влиянием ионов Ca^{2+} на константу диссоциации фермент-субстратного комплекса, что согласуется с данными флуоресцентного титрования (*табл. 2*).

Определена кинетика накопления продуктов эндорибонуклеазной активности APE1 на РНК-субстрате

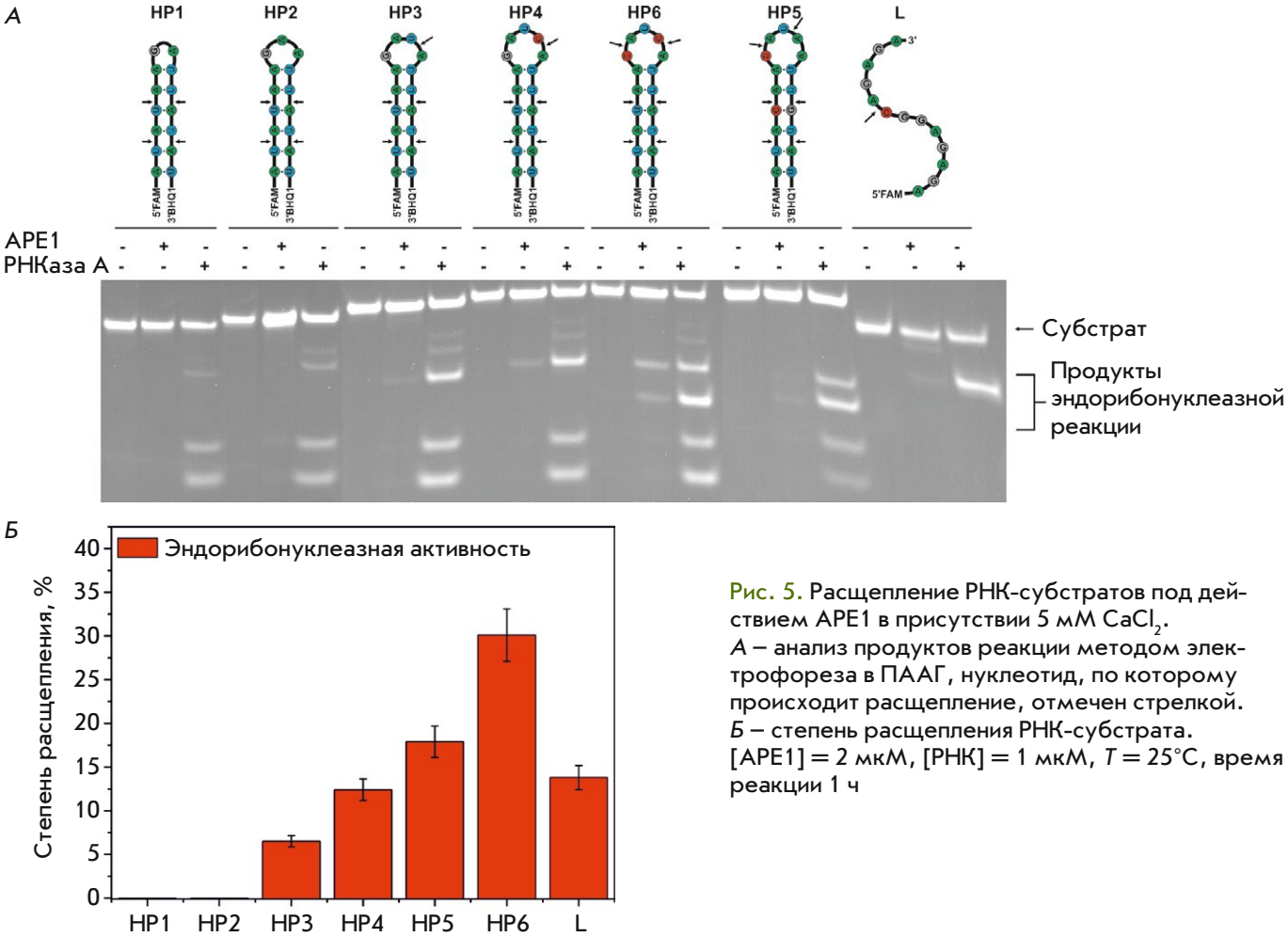

Рис. 5. Расщепление РНК-субстратов под действием APE1 в присутствии 5 мМ $CaCl_2$.
А – анализ продуктов реакции методом электрофореза в ПААГ, нуклеотид, по которому происходит расщепление, отмечен стрелкой.
Б – степень расщепления РНК-субстрата.
[APE1] = 2 мкМ, [РНК] = 1 мкМ, *T* = 25°C, время реакции 1 ч

HP6 в отсутствие ионов двухвалентных металлов и в присутствии ионов Ca^{2+} (*рис. 6*). Интересно, что в условиях трехкратного избытка субстрата степень расщепления субстрата выходила на плато в течение 15 мин (около 5 и 9% в присутствии EDTA и $CaCl_2$ соответственно). Низкая степень расщепления может свидетельствовать как о неэффективности образования каталитического комплекса, так и о прочном связывании фермента с продуктами реакции. Действительно, добавление новой порции фермента в реакционную смесь приводило к дополнительному накоплению продуктов реакции, что свидетельствует о том, что после осуществления каталитического акта APE1 остается связанным с РНК-продуктом.

Гидролиз РНК-субстратов под действием APE1 в присутствии $MgCl_2$

При взаимодействии APE1 с РНК-субстратами в буфере, содержащем $MgCl_2$, происходило накопление

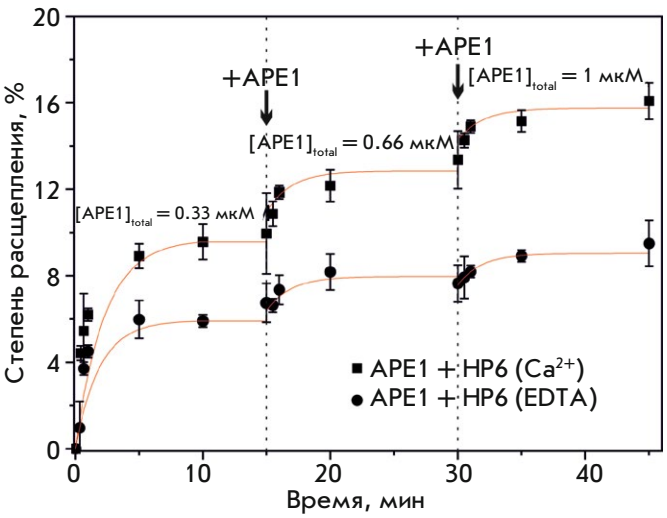

Рис. 6. Кинетическая кривая накопления продуктов расщепления HP6 при взаимодействии с APE1 в присутствии 1 мМ EDTA и 5 мМ $CaCl_2$, [РНК] = 1 мкМ

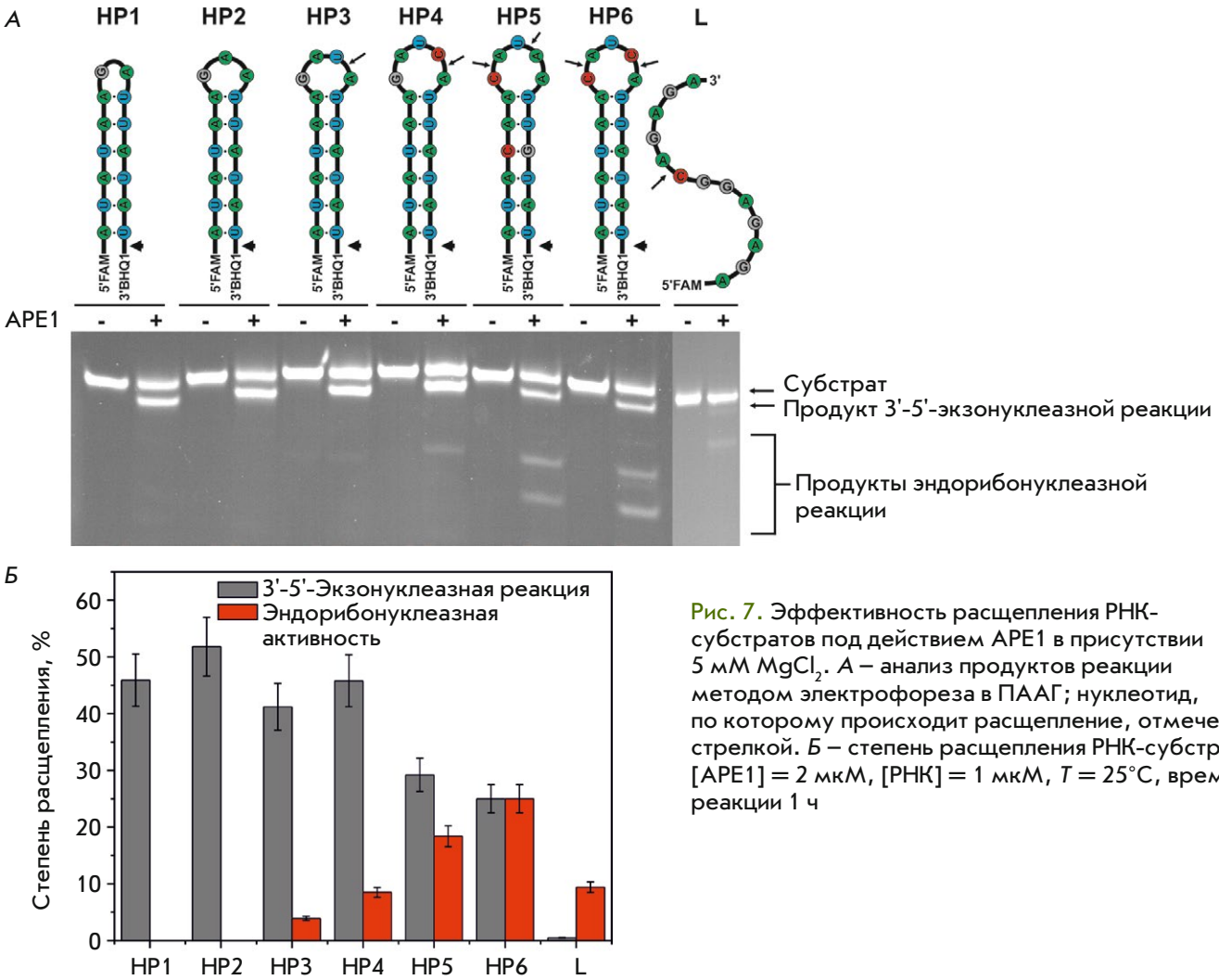

Рис. 7. Эффективность расщепления РНК-субстратов под действием APE1 в присутствии 5 мМ $MgCl_2$. *А* – анализ продуктов реакции методом электрофореза в ПААГ; нуклеотид, по которому происходит расщепление, отмечен стрелкой. *Б* – степень расщепления РНК-субстрата. [APE1] = 2 мкМ, [РНК] = 1 мкМ, *T* = 25°C, время реакции 1 ч

продуктов как эндорибонуклеазной, так и 3'-5'-экзорибонуклеазной реакции (*рис. 7*). Образование продуктов эндорибонуклеазной реакции не наблюдали при использовании субстратов HP1 и HP2 с петлей минимального размера (2 и 3 нуклеотида соответственно), не содержащей специфической последовательности пиримидин–пурин. При этом продукты, образующиеся за счет эндорибонуклеазной активности APE1 на субстратах HP3–HP6, соответствовали расщеплению динуклеотидов CA и UA в составе петли. Протекание 3'-5'-экзорибонуклеазной реакции зарегистрировано на всех шпилечных РНК-субстратах, содержащих 3'-BHQ1. Эта реакция приводит к удалению остатка BHQ1 с 3'-конца, что сопровождалось характерным увеличением подвижности экзопродукта в ПААГ (*рис. 7*).

Анализ кинетики накопления продуктов эндо- и экзонуклеазной реакции превращения РНК-субстратов в присутствии ионов Mg^{2+} показал, что отщепление 3'-концевого BHQ1 происходит более эффективно, чем расщепление в петле (*рис. 8*). При этом повторное добавление фермента в реакционную смесь приводило к увеличению скорости накопления продукта экзонуклеазной реакции, но не эндонуклеазного расщепления (*рис. 8Б*). Такое отличие может свидетельствовать о том, что на шпильке расположено несколько сайтов связывания фермента. АР-эндонуклеаза прочно связывается с петлевой частью шпильки для осуществления медленной эндонуклеазной реакции. В этом случае добавление дополнительного фермента в реакционную смесь приводит к дополнительному связыванию только вакантного противоположного конца, несущего красители FAM/BHQ1, что сопровождается экзонуклеазной реакцией. Можно также предположить, что образование каталитического комплекса с 5'/3'-концевым участком HP6 в присутствии ионов Mg^{2+} создает стерические затруднения для образования каталитического комплекса с петлей.

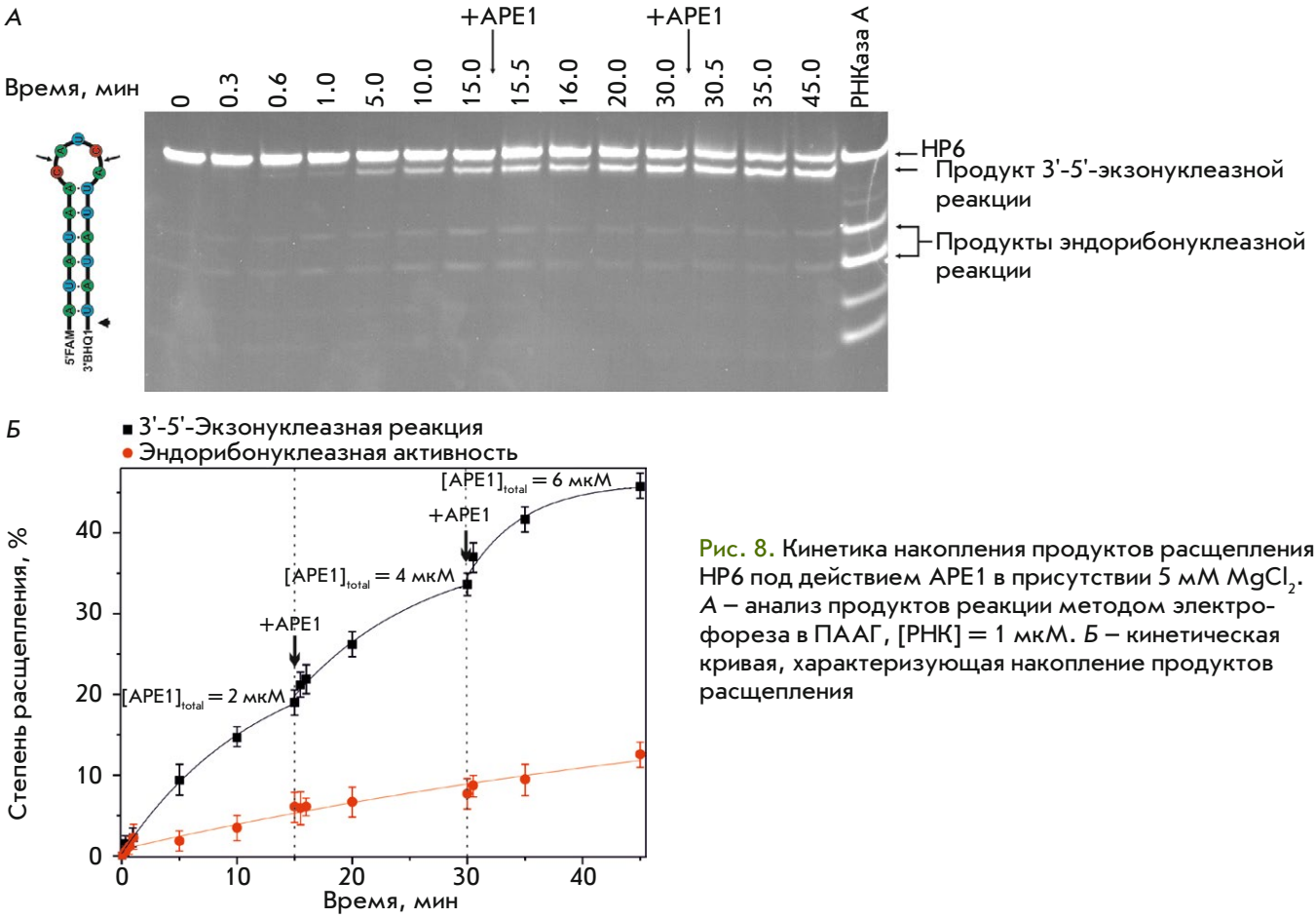

Рис. 8. Кинетика накопления продуктов расщепления HP6 под действием APE1 в присутствии 5 мМ $MgCl_2$. *А* – анализ продуктов реакции методом электрофореза в ПААГ, [РНК] = 1 мкМ. *Б* – кинетическая кривая, характеризующая накопление продуктов расщепления

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведен анализ взаимодействия АР-эндонуклеазы человека APE1 с модельными РНК-субстратами различной структуры. Показано, что APE1 эффективно связывает как линейный РНК-субстрат, так и РНК-субстраты, формирующие шпильку. При этом эндорибонуклеазное расщепление субстратов происходило в петлевых фрагментах по последовательностям CA и UA. Эффективность расщепления по динуклеотиду UA меньше, чем динуклеотида CA. Однако при сравнении эффективности расщепления данных субстратов необходимо учитывать не только CA/UA-нуклеотидный контекст гидролизуемой фосфодиэфирной связи, но также структуру субстрата, включающую как размер петли, так и положение гидролизуемой связи в этой петле. Поскольку сайт расщепления у шпилек HP3 (UA) и HP4 (CA) расположен в одном месте относительно стебля, то на основе полученных данных можно предположить, что петля в шпильке HP4, содержащая 5 нуклеотидов, легче адаптируется в субстратсвязывающем центре фермента по сравнению со шпилькой HP3, содержащей 4 нуклеотида в петле. При этом шпилька HP5 (CA/UA), также содержащая 5 нуклеотидов в петле, отличается от HP4 расположением сайтов расщепления, что, по-видимому, затрудняет эффективное образование каталитического комплекса в случае HP5. Таким образом, можно сделать заключение, что образование каталитического фермент-субстратного комплекса зависит как от конформационной напряженности петли РНК-субстрата, имеющего форму шпильки, так и от контекста и местоположения гидролизуемой фосфодиэфирной связи. Следует отметить, что степень расщепления линейного субстрата L также была низкой по сравнению со шпилечными субстратами HP4–HP6. На основании этого можно предположить, что структурированная дуплексная часть шпильки играет важную роль при формировании неспецифических контактов в активном центре фермента, необходимых для образования каталитического комплекса. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-74-10034 и частичной поддержке бюджетного финансирования для обеспечения регламентных работ на использованном оборудовании № АААА-А17-117020210022-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li M., Wilson 3rd D.M. // Antioxid Redox Signal. 2014. V. 20. № 4. P. 678–707.
2. Demple B., Sung J.-S. // DNA Repair. 2005. V. 4. P. 1442–1449.
3. Дырхеева Н.С., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. № 3. С. 450–466.
4. Gros L., Ishchenko A.A., Ide H., Elder R.H., Saparbaev M.K. // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. № 1. P. 73–81.
5. Chen D.S., Herman T., Demple B. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 21. P. 5907–5914.
6. Chou K.-M., Cheng Y.-C. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 20. P. 18289–18296.
7. Kuznetsova A., Fedorova O., Kuznetsov N. // Molecules. 2018. V. 23. № 9. P. 2101.
8. Barzilay G., Hickson I.D. // Bioessays. 1995. V. 17. № 8. P. 713–719.
9. Berquist B.R., McNeill D.R., Wilson 3rd D.M. // J. Mol. Biol. 2008. V. 379. № 1. P. 17–27.
10. Barnes T., Kim W.C., Mantha A.K., Kim S.E., Izumi T., Mitra S., Lee C.H. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. № 12. P. 3946–3958.
11. Kim W.C., King D., Lee C.H. // Int. J. Biochem. Mol. Biol. 2010. V. 1. № 1. P. 12–25.
12. Black D.L. // Annu. Rev. Biochem. 2003. V. 72. № 1. P. 291–336.
13. Kuninger D.T., Izumi T., Papaconstantinou J., Mitra S. // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. № 3. P. 823–829.
14. Rossbach O., Hung L.-H., Schreiner S., Grishina I., Heiner M., Hui J., Bindereif A. // Mol. Cell. Biol. 2009. V. 29. № 6. P. 1442–1451.
15. Мирошникова А.Д., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. // Acta Naturae. 2016. V. 8. № 1. P. 106–113.
16. Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. // Mol. BioSyst. 2016. V. 12. № 5. P. 1527–1539.
17. Alekseeva I.V., Bakman A.S., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. // J. Phys. Chem. B. 2019. V. 123. № 45. P. 9546–9556.
18. Kuznetsova A.A., Matveeva A.G., Milov A.D., Vorobjev Y.N., Dzuba S.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. № 21. P. 11454–11465.
19. 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. № 21. P. 6548–6558.
20. Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson 3rd D.M., Rupp B. // J. Mol. Biol. 2001. V. 307. № 4. P. 1023–1034.
21. Manvilla B.A., Pozharski E., Toth E.A., Drohat A.C. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. Pt 12. P. 2555–2562.
22. Lipton A.S., Heck R.W., Primak S., McNeill D.R., Wilson 3rd D.M., Ellis P.D. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 29. P. 9332–9341.
23. Oezguen N., Schein C.H., Peddi S.R., Power T.D., Izumi T., Braun W. // Proteins. 2007. V. 68. № 1. P. 313–323.
24. Masuda Y., Bennett R.A., Demple B. // J. Biol Chem. 1998. V. 273. № 46. P. 30360–30365.
25. Erzberger J.P., Wilson 3rd D.M. // J. Mol. Biol. 1999. V. 290. № 2. P. 447–457.
26. He H., Chen Q., Georgiadis M.M. // Biochemistry. 2014. V. 53. № 41. P. 6520–6529.
27. Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. // Nature. 2000. V. 403. № 6768. P. 451–456.
28. Shannon R.D. // Acta Cryst. 1976. V. 32. P. 751–767.
29. Duguid J., Bloomfield V.A., Benevides J., Thomas G.J. // Biophys. J. 1993. V. 65. № 5. P. 1916–1928.
30. Kim W.-C., Berquist B.R., Chohan M., Uy C., Wilson D.M., Lee C.H. // J. Mol. Biol. 2011. V. 411. № 5. P. 960–971.
31. Kuzmic P. // Anal. Biochem. 1996. V. 237. P. 260–273.