

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ 3'-5'-ЭКЗОНУКЛЕАЗНОЙ РЕАКЦИИ АПУРИНОВОЙ/АПИРИМИДИНОВОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ 1 ЧЕЛОВЕКА С ДНК, СОДЕРЖАЩИМИ В ОДНОЦЕПЧЕЧНОМ РАЗРЫВЕ ПРИРОДНЫЕ dUMP ИЛИ ИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ АНАЛОГИ

© 2008 г. Н. С. Дырхеева, С. Н. Ходырева, О. И. Лаврик*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 29.03.2007 г. Принята к печати 02.05.2007 г.

Апуриновая/апиримидиновая (АР) эндонуклеаза 1 человека (APE1) – полифункциональный фермент, который помимо основной активности, расщепляющей ДНК с 5'-стороны от АР-сайта, обладает другими более слабо выраженными активностями. Среди них – 3'-5'-эксонуклеазная, которая проявляется более эффективно на ДНК-дуплексах, содержащих на 3'-конце праймерной цепи модифицированные или неправильно спаренные нуклеотиды. Существует предположение, что за счет своей экзонуклеазной активности APE1 может быть корректором синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой β , в ходе эксцизионной репарации оснований ДНК. Для понимания детального механизма этого процесса изучены количественные характеристики 3'-5'-эксонуклеазной реакции в зависимости от условий ее проведения. Определены кинетические параметры экзонуклеазного выщепления остатков dCMP и dTMP с помощью APE1 из неканонической пары на 3'-конце одноцепочечного разрыва в ДНК. Аналогичные характеристики получены для фотоактивируемых аналогов dCMP, применяемых для фотоаффинной модификации белков и ДНК в реконструированных системах и клеточных/ядерных экстрактах.

Ключевые слова: ДНК, репарация, эндонуклеаза, апуриновая/апиримидиновая, 3'-5'-эксонуклеазная активность, dUMP, фотоактивируемые аналоги.

ВВЕДЕНИЕ

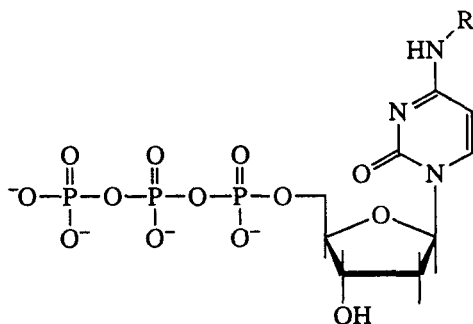
Система эксцизионной репарации оснований (ЭРО) ДНК направлена на исправление ДНК с поврежденными азотистыми основаниями и спонтанно возникающими АР-сайтами. Апуриновая/апиримидиновая (АР) эндонуклеаза 1 человека (APE1; КФ 3.1.22.3) осуществляет эндонуклеазное расщепление ДНК с 5'-стороны от АР-сайта, в результате чего образуется 3'-ОН-группа и дезоксирибо-5'-фосфат. В экстракте клеток HeLa активность APE1 составляет > 95% от суммарной активности по расщеплению АР-сайтов. APE1, кроме эндонуклеазной, обладает более слабо выраженными 3'-фосфодиэстеразной, 3'-фосфатазной и 3'-5'-эксонуклеазной активностями [1].

Данные о биологической значимости 3'-5'-эксонуклеазной активности APE1 противоречивы. Ранее эта активность считалась биологически незначимой, поскольку она на несколько порядков ниже, чем АР-эндонуклеазная [2]. Однако недавно интерес к экзонуклеазной активности возник вновь, так как APE1 была идентифицирована как экзонуклеаза, эффективно отщепляющая с 3'-конца одноцепочечного разрыва некоторые аналоги нуклеотидов, например, 3'-азидо-3'-дезокситимидинмонофосфат, 2',3'-дидегидро-3'-дезокситимидинмонофосфат и β -L-диоксоланцитидинмонофосфат.

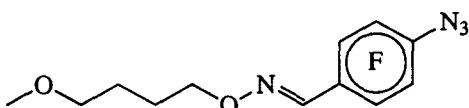
Нуклеозиды, соответствующие перечисленным аналогам dNMP, применяются в антивирусной и антираковой терапии [3, 4]. Кроме того, было установлено, что APE1 может более эффективно выщеплять неправильно (неканонически) спаренные нуклеотиды по сравнению с правильно спаренными [4]. Следует отметить, что основная ДНК-полимераза ЭРО – ДНК-полимераза β (β -полимераза), проявляет низкую точность в синтезе ДНК, так как не обладает корректирующей 3'-5'-эксонуклеазной активностью. В то же время точность репарационного синтеза ДНК *in vivo* заметно выше обнаруживаемой *in vitro* [5], поэтому представляет интерес выявление факто-

Сокращения: APE1 – апуриновая/апиримидиновая (АР-) эндонуклеаза 1 человека; АР-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; ЭРО – эксцизионная репарация оснований; ИРН – инцизионная репарация нуклеотидов; тетрагидрофуран или F – 3-гидрокси-2-гидроксиметилтетрагидрофуран; 5'-pF-группа на 5'-конце олигонуклеотида в одноцепочечном разрыве/бреши, содержащая остаток 2-фосфата 3-гидрокси-2-гидроксиметилтетрагидрофурана.

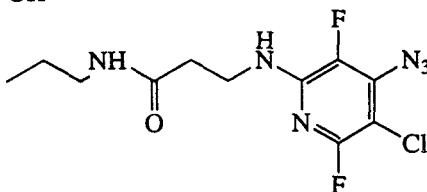
* Автор для связи (тел.: (383) 3309296; факс: (383) 3333677, эл. почта: lavrik@niboch.nsc.ru).



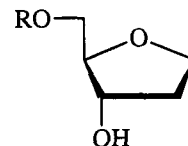
R:



FAVO-dCTP – N^4 -[(4-Азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминоокси)-бутилокси]-2'-дезокситидин 5'-трифосфат (литиевая соль)



FAP-dCTP – экзо- N -[2- N -(N -(4-Азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил)-аминоэтил]-2'-дезокситидин 5'-трифосфат (литиевая соль)



3-Гидрокси-2-гидроксиметил-тетрагидрофуран (R = H) и его 2-фосфат (R = PO(OH)₂)

Рис. 1. Структурные формулы фотоактивируемых аналогов dCTP и синтетического аналога природного AP-сайта.

ров, повышающих точность ЭРО. Поскольку APE1 более эффективно удаляет неканонически спаренные нуклеотиды, было высказано предположение, что она выполняет роль “корректора” в ЭРО [4].

Анализ публикаций по изучению “корректорской” роли APE1 выявил существенные различия в данных, полученных разными исследователями, как относительно самого факта возможного исправления ошибок, так и относительно факторов, влияющих на уровень экзонуклеазной активности APE1 (например, тип ДНК-дуплекса, условия реакции) [4, 6–9]. Важным направлением является поиск условий проявления этой активности, близких к оптимуму основной экзонуклеазной функции APE1.

Выявленные в цитированных работах закономерности для экзонуклеазной активности APE1 установлены преимущественно на качественном уровне. Различия в результатах разных авторов и в сделанных ими выводах могут быть обусловлены, в основном, полукваликативным подходом к измерению скорости этой реакции в разных условиях. Поэтому мы провели некоторые количественные измерения параметров экзонуклеазной реакции в зависимости от условий ее проведения. В предыдущей работе [10] нами была определена эффективность экзонуклеазного выщепления природных dNMP и фотоактивируемых аналогов dNMP, встроенных в 3'-конец ДНК-праймера в одноцепочечном разрыве, выраженная в доле (%) продукта экзонуклеазной реакции от общего количества ДНК-субстрата. Из четырех исследован-

ных фотоактивируемых производных [10] нами были выбраны наиболее (FAVO-dCMP) и наименее (FAP-dCMP) эффективно отщепляемые аналоги. Структура аналогов в форме нуклеозид-5'-трифосфатов приведена на рис. 1. Эти соединения за счет сдвига таутомерного равновесия являются аналогами dCMP или dTMP [11]. На рис. 1 изображен также аналог AP-сайта – производное тетрагидрофурана. Такой синтетический аналог дезоксирибозы в составе AP-сайта не может быть удален за счет лиазной активности β -полимеразы и не подвержен спонтанному раскрытию цикла, в отличие от природного AP-сайта, поэтому он широко используется в работах по исследованию свойств и функций APE1.

Для формирования ДНК-дуплексов были использованы два типа ДНК-матриц с dAMP (A) и dGMP (G) напротив природного нуклеотида или фотоактивируемого аналога (табл. 1). Изучение эффективности выщепления фотореакционноспособных 3'-dNMP за счет 3'-5'-экзонуклеазной активности APE1 важно при их применении для фотоаффинной модификации белков и ДНК в реконструированных системах и клеточных/ядерных экстрактах, содержащих этот белок. В данной работе проводится сопоставление кинетических параметров 3'-5'-экзонуклеазной реакции, катализируемой APE1, по отношению к ДНК-дуплексам, содержащим природные dNMP или фотоактивируемые аналоги dCMP (FAVO-dCMP и FAP-dCMP) на 3'-конце одноцепочечного разрыва, в различных условиях реакции.

Таблица 1. Структуры ДНК-дуплексов

Структура ДНК-дуплексов 5' → 3' 3' → 5'	Обозначение дуплексов
*pGG-CGA-TTA-AGT-TGG-G CC-GCT-AAT-TCA-ACC-C – <u>G</u> – T-TGC-AGT-CCC-AGA-AGG	ДНК-1
*pGG-CGA-TTA-AGT-TGG-G – F – A-ACG-TCA-GGG-TCT-TCC CC-GCT-AAT-TCA-ACC-C – <u>G</u> – T-TGC-AGT-CCC-AGA-AGG	F-ДНК
*pGG-CGA-TTA-AGT-TGG-G-fmY pA-ACG-TCA-GGG-TCT-TCC CC-GCT-AAT-TCA-ACC-C – <u>R</u> – T-TGC-AGT-CCC-AGA-AGG	fmY · R(p)
*pGG-CGA-TTA-AGT-TGG-G-fmYpFA-ACG-TCA-GGG-TCT-TCC CC-GCT-AAT-TCA-ACC-C – <u>R</u> – T-TGC-AGT-CCC-AGA-AGG	fmY · R(pF)
*pGG-CGA-TTA-AGT-TGG-G-fmY hA-ACG-TCA-GGG-TCT-TCC CC-GCT-AAT-TCA-ACC-C – <u>R</u> – T-TGC-AGT-CCC-AGA-AGG	fmY · R(h)
*pGG-CGA-TTA-AGT-TGG-G-C pA-ACG-TCA-GGG-TCT-TCC CC-GCT-AAT-TCA-ACC-C – <u>A</u> – T-TGC-AGT-CCC-AGA-AGG	C · A(p)
*pGG-CGA-TTA-AGT-TGG-G-T pA-ACG-TCA-GGG-TCT-TCC CC-GCT-AAT-TCA-ACC-C – <u>G</u> – T-TGC-AGT-CCC-AGA-AGG	T · G(p)

* p – ³²P-фосфатная группа; p – фосфатная группа, h – гидроксильная группа; fmY – FABO-dCMP или FAP-dCMP; R – A (dAMP) или G (dGMP).

Таблица 2. 3'-5'-Экзонуклеазная активность APE1 в отношении дуплексов fmY · R(h)* в разных буферных растворах

Буфер	pH**	[MgCl ₂], мМ	Y = FABO-dCMP						Y = FAP-dCMP					
			R = G			R = A			R = G			R = A		
			k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , нМ	$k_{cat}/K_m \times 1000$	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , нМ	$k_{cat}/K_m \times 1000$	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , нМ	$k_{cat}/K_m \times 1000$	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , нМ	$k_{cat}/K_m \times 1000$
1	8.0	10	0.15	53.4	2.9	0.06	25.6	2.3	–	–	–	0.022	33.2	0.7
2	7.0	10	0.25	47.5	5.3	0.20	16.8	11.9	0.008	53.3	0.14	0.11	4.9	22.4
3	8.0	1	0.27	8.0	33.3	0.25	4.0	62.5	0.19	28.3	6.7	0.20	12.0	20.0
4	7.0	1	0.28	19.4	14.3	0.37	21.5	17.2	0.015	22.3	0.7	0.24	37.0	6.7
5	7.0	1	5.0	43.0	116	3.3	5.3	625	0.41	18.4	22.2	1.7	6.0	278

* Структуру дуплексов см. табл. 1.

** Буферы 1–4 содержат 50 мМ Трис-НСl с указанным в таблице значением pH, 50 мМ KCl и MgCl₂ в указанной концентрации. Буфер 5 содержит 25 мМ Hepes (pH 7.0), 50 мМ KCl и 1 мМ MgCl₂.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эндонуклеазная активность АРЕ1
в различных условиях реакции

Основываясь на наших предыдущих результатах и литературных данных по экзонуклеазной активности АРЕ1 в различных условиях, в опубликованном нами обзоре [12] сделаны выводы о том, что для основной эндонуклеазной активности АРЕ1 оптимальными являются условия, в которых исследуют системы ЭРО (например, ДНК-полимеразную и ДНК-лигазную реакции). Оптимальные условия для проявления экзонуклеазной активности АРЕ1 близки к оптимальным условиям для других дополнительных активностей этого фермента. Так, отмечается, что для наиболее эффективного расщепления АР-сайта в одноцепочечной ДНК [13] и для ИРН-активности* [14] оптимальные условия, более близкие к оптимуму экзонуклеазной активности АРЕ1, чем эндонуклеазной. В нашей предыдущей работе [10] по определению эффективности экзонуклеазного выщепления dNMP и фотоактивируемых аналогов dNMP за основу при подборе оптимальных условий реакции были взяты два реакционных буфера (табл. 2). Один из них (буфер 1) оптимален и часто используется для исследования реакций системы ЭРО, а другой (буфер 5) оптимален для ИРН-активности АРЕ1 [14]. Нами показано [10], что для всех типов использованных ДНК-дуплексов в буфере 5 эффективность экзонуклеазного отщепления остатка dNMP значительно выше по сравнению с эффективностью в буфере 1. Согласно данным, представленным в настоящей работе, эффективность эндонуклеазной активности АРЕ1 на ДНК с производным тетрагидрофурана (F-ДНК, табл. 1), напротив, выше в буфере 1, чем в буфере 5 (рис. 2).

Следует отметить, что АРЕ1 – многофункциональный белок, который не только обладает упомянутыми активностями, но и выступает также в роли регулятора экспрессии генов (Ref-1) [15–17]. Каким образом в условиях живой клетки осуществляется взаимная регуляция эндонуклеазной, экзонуклеазной активностей и других функций АРЕ1, пока остается неясным.

3'-5'-Экзонуклеазное отщепление с помощью АРЕ1 фотоактивируемых аналогов с 3'-конца одноцепочечного разрыва в различных условиях реакции

В связи с тем, что АРЕ1 более эффективно отщепляет остатки неканонически спаренных нуклеотидов с 3'-конца одноцепочечного разрыва [4, 8, 9],

* ИРН – механизм исправления окислительных повреждений в ДНК (например, 5,6-дигидродезоксиуридина, 5,6-дигидротимидина, 5-гидроксидезоксиуридина), в котором АРЕ1 расщепляет сахарофосфатный остов рядом с поврежденным нуклеотидом [14].



Рис. 2. Эндонуклеазная активность АРЕ1 в буферах 1 (1) и 5 (2). Реакционные смеси содержали 20 нМ F-ДНК (табл. 1) и 0,5 нМ АРЕ1. Реакцию проводили при 37°C в течение 15 с–10 мин. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ с 7 М мочевиной.

авзятые нами аналоги могут вести себя как dСТР- и dТТР-подобные [11], в предыдущей работе мы определили [10], как влияет структура фотоактивируемых аналогов dСМР (fmdYMP), встроенных в 3'-конец ДНК-праймера, на эффективность экзонуклеазной активности АРЕ1. На основании полученных данных [10] нами для дальнейших исследований были выбраны наиболее (FABO-dСМР) и наименее (FAP-dСМР) эффективно отщепляемые аналоги. В этой же работе [10] были также проведены эксперименты по эффективности элонгации с помощью β-полимеразы праймеров, содержащих остатки различных fmdYMP на 3'-конце, природными трифосфатами, и по эффективности лигирования разрывов с fmdYMP на 3'-конце [10]. С помощью этих тестов нами было подтверждено [10], что ДНК-структуры, содержащие данные fmdYMP, могут рассматриваться не только как модифицированные dYMP, но и как модели канонически (С · G- и Т · А-подобных) и неканонически (С · А- и Т · G-подобных) спаренных нуклеотидов.

Поскольку буферы 1 и 5 создают условия, максимально различающиеся по солевым и буферной компонентам, были приготовлены три "промежуточных" буфера (2–4). В пяти реакционных условиях (буферы 1–5) были определены кинетические параметры (табл. 2) реакции экзонуклеазного отщепления 3'-нуклеотида в парах fmY · R для дуплексов fmY · R(h) (табл. 1). Полученные кинетические константы в целом подтверждают, что FAP-dСМР является в большей степени аналогом С, а FABO-dСМР является в равной степени аналогом как С, так и Т.

Константы скорости экзонуклеазной реакции (k_{cat}) в первых четырех буферах с буферной компонентой Трис отличались незначительно, возрастая от буфера 1 к буферу 4 (за исключением случая FAP-dСМР · G, где $k_{cat} 2 > k_{cat} 3$). В буфере 5 с буферной компонентой Нерес скорость реакции значительно (не менее чем в 5 раз) повышалась

Таблица 3. Зависимость 3'-5'-экзонуклеазной активности APE1 в отношении дуплексов fmY · R(h), fmY · R(p), fmY · R(pF)* от структурных особенностей 5'-конца олигонуклеотида, фланкирующего одноцепочечный разрыв

Буфер	5'-Группа	k_{cat} , мин ⁻¹	K_m , нМ	$k_{cat}/K_m \times 1000$
Y = FAVO-dCMP, R = G				
1	ОН	0.15	53.0	2.9
	p	0.10	1891	0.05
	pF	0.15	3737	0.04
5	ОН	5.0	43.0	116
	p	2.2	24.2	91.7
	pF	0.62	753	0.80
Y = FAVO-dCMP, R = A				
1	ОН	0.06	25.6	2.3
	p	0.02	90.1	0.27
	pF	0.02	57.9	0.30
5	ОН	3.3	5.3	625
	p	3.3	19.7	169
	pF	0.6	34.0	18.9
Y = FAP-dCMP, R = G				
5	ОН	0.40	18.4	22.2
	p	0.05	4.2	11.9
	pF	2.6	262	10.0
Y = FAP-dCMP, R = A				
1	ОН	0.02	33.1	0.70
	p	0.08	738	0.10
	pF	0.03	414	0.08
5	ОН	1.7	6.0	278
	p	2.0	26.1	78.0
	pF	1.8	614	2.9

* Структуру дуплексов см. табл. 1.

публикации [10], в которой эффективность экзонуклеазной активности выражалась как доля продукта экзонуклеазной реакции от общего количества ДНК-субстрата. Таким образом, к наблюдаемому влиянию состава реакционной среды на эффективность 3'-5'-экзонуклеазной активности приводит сочетание изменений как константы скорости реакции (k_{cat}), так и стабильности комплекса фермент-субстрат, показателем которой является константа Михаэлиса.

Зависимость 3'-5'-экзонуклеазной активности APE1 от структурных особенностей 5'-конца олигонуклеотида, фланкирующего одноцепочечный разрыв

Влияние структуры 3'- и 5'-концов олигонуклеотидов, обрамляющих одноцепочечный разрыв (брешь) в 5'-3'-цепи дуплекса, на 3'-5'-экзонуклеазную активность APE1 исследовано разными авторами. Наличие фосфата на 3'-конце разрыва или однонуклеотидной бреши не влияло на эффективность экзонуклеазной реакции по сравнению с гидроксильной группой в этом положении [9]. Природа 5'-концевой группы, напротив, заметно сказывается на эффективности экзонуклеазной активности APE1 [4, 8–10, 18, 19], однако данные разных авторов несколько противоречивы. В большинстве работ показано, что присутствии 5'-pF, фланкирующей брешь или разрыв, уменьшает эффективность гидролиза 3'-концевого олигонуклеотида бреши (разрыва) с помощью APE1 по сравнению с ДНК-дуплексом, содержащим фосфатную группу в этом положении [4, 7, 8, 10, 18, 19], но по данным [9] – наоборот увеличивает. Во всех работах отмечается наибольшая эффективность экзонуклеазной реакции при наличии 5'-гидроксильной группы в бреши или разрыве по сравнению с фосфатной или pF. Например, фосфатная группа по сравнению с 5'-гидроксильной уменьшает эффективность выщепления нуклеотида в 10 [9] или 8 [8] раз, а 5'-pF-группа – в 5 раз [9].

Мы также исследовали влияние на экзонуклеазную активность группы, фланкирующей одноцепочечный разрыв с 5'-стороны (табл. 3). Были использованы три типа олигонуклеотидов: с фосфатной группой (p), без нее (h) и с pF-группой на 5'-конце. Полученные нами результаты согласуются с данными о наибольшей эффективности экзонуклеазной активности APE1 в отношении дуплексов с 5'-гидроксильной группой фланкирующего разрыв нуклеотида и вписываются в преобладающую в литературе картину, демонстрирующую для влияния 5'-концевых групп на эффективность ряд: h > p > pF – как в буфере 1, так и в буфере 5.

Зависимость k_{cat} от типа группы, фланкирующей одноцепочечный разрыв с 5'-стороны, в двух

по сравнению с другими реакционными условиями. Значение другого параметра реакции, константы Михаэлиса (K_m), в буфере 5 для всех четырех пар было ниже, чем в буфере 1. В целом, для K_m не наблюдается четкой зависимости от состава реакционных буферов, одинаковой для всех четырех сочетаний нуклеотидных пар fmY · R. Но в значениях эффективности экзонуклеазной реакции, выражаемой как отношение k_{cat}/K_m , наблюдается следующая зависимость от буфера: 5 > 3 > 4 ≥ 2 > 1. Такая зависимость одинакова для всех четырех пар fmY · R. Полученный ряд сопоставим с ранее приведенным нами в предыдущей

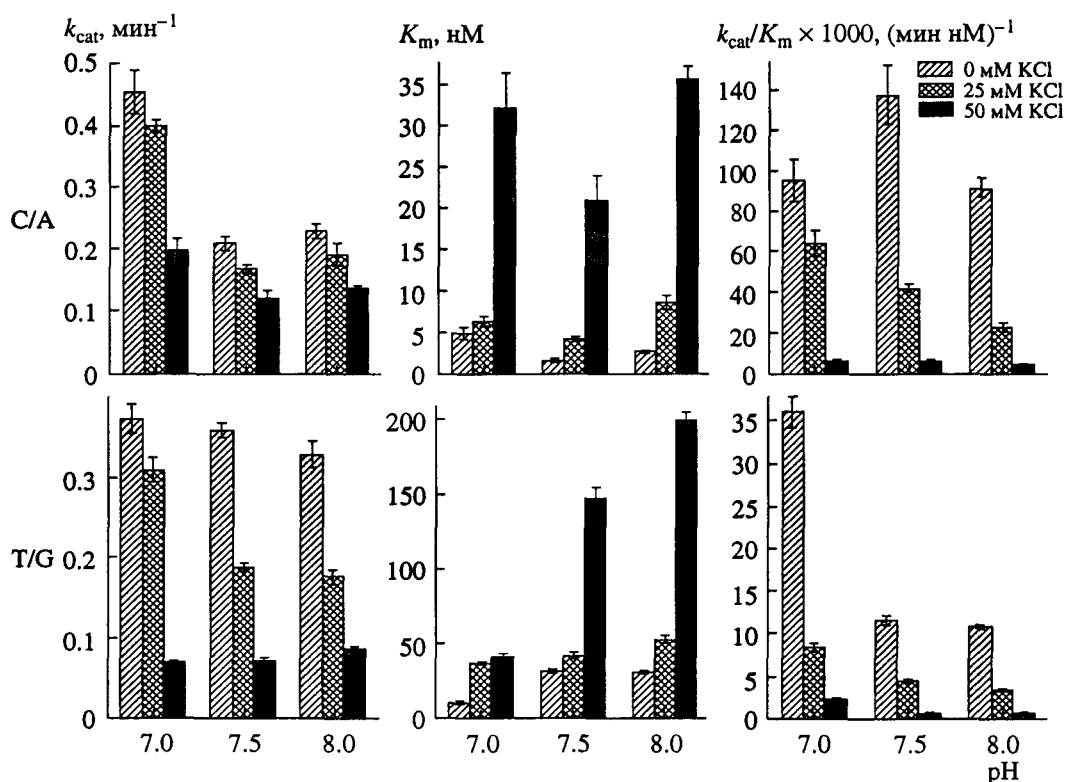


Рис. 3. Зависимость 3'-5'-экзонуклеазной активности APE1 в отношении природных dCMP и dTMP от ионной силы и pH. Реакционные смеси содержали 20 нМ ДНК-дуплекс (С · А(р) или Т · G(р)), APE1 в различных концентрациях (5 нМ–2 мкМ), а также 50 мМ Трис, 1 мМ MgCl₂ и KCl в указанной концентрации. Реакцию проводили при 37°C в течение 5–30 мин.

буферах (1 и 5), совершенно различных по составу, примерно одинакова. Для различных пар $f_mY \cdot R$ k_{cat} в зависимости от типа группы с 5'-стороны в разрыве изменяется следующим образом:

FABO-dCMP · G и FABO-dCMP · A: $h > p > rF$;

FAP-dCMP · G (буфер 5): $rF > h > p$;

FAP-dCMP · A: $p > rF > h$.

Значения величин K_m зависят от буфера и от того, какая именно пара находится на 3'-конце праймера, подвергаемого действию экзонуклеазной активности APE1. Для канонических пар FABO-dCMP · G и FAP-dCMP · G в буфере 5 наблюдались изменения в величинах K_m следующего характера: $rF > h > p$. Для неканонических пар FABO-dCMP · A и FAP-dCMP · A в том же буфере: $rF > p > h$. Такой же ряд зависимости был получен и для дуплексов с парой FABO-dCMP · G в буфере 1. Поскольку уровень отщепления FAP-dCMP из пары FAP-dCMP · G в этом буфере очень низок, количественные данные по параметрам экзонуклеазной реакции APE1 в этом случае не определены. Для дуплексов с неканоническими парами FABO-dCMP · A и FAP-dCMP · A, в зависимости от типа группы с 5'-стороны в разрыве, получен следующий ряд в буфере 1: $p > rF > h$. Та-

ким образом, сродство APE1 к ДНК-субстрату с одноцепочечным разрывом в значительной мере зависит от каноничности пары на 3'-конце, подвергаемой экзонуклеазной реакции.

Выщепление природного dNMP в составе неканонической пары с 3'-конца праймера с помощью 3'-5'-экзонуклеазной активности APE1 в зависимости от ионной силы и pH

Далее нами была исследована эффективность экзонуклеазного отщепления dCMP или dTMP с помощью APE1 с 3'-конца праймера в одноцепочечном разрыве, в зависимости от концентрации одновалентной соли и pH в реакционной смеси. В предыдущей нашей работе [10] в качестве аналогии к структурам, содержащим модифицированные остатки, были взяты четыре типа ДНК-структур, из них две – с канонической парой на 3'-конце праймера (С · G и Т · А) и две – с неканонической (Т · G и С · А). Нами было показано [10], что эффективность отщепления с помощью APE1 природных dYMP в целом ниже, чем остатков фотоактивируемых аналогов dYMP. Эффективность отщепления с помощью APE1 природных dYMP в одноцепочечном разрыве уменьша-

лась в ряду пар: $C \cdot A > T \cdot G > T \cdot A \geq C \cdot G$. Поскольку уровень экзонуклеазной активности АРЕ1 по отношению к каноническим парам невысок, кинетические параметры экзонуклеазной реакции АРЕ1 измерялись только для неканонических пар $C \cdot A$ и $T \cdot G$, на примере ДНК с фосфатной группой на 5'-конце в одноцепочечном разрыве (дуплексы $C \cdot A(p)$, $T \cdot G(p)$). Полученные нами кинетические данные подтвердили (рис. 2), что выщепление 3'-dNMP с помощью АРЕ1 проходит более эффективно в паре $C \cdot A$, чем в паре $T \cdot G$. Причем больший вклад в эффективность (соотношение k_{cat}/K_m) вносит не константа скорости реакции, а константа Михаэлиса. То есть, в данном случае предпочтения АРЕ1 к тому или иному субстрату, скорее всего, проявляются еще на стадии формирования фермент-субстратного комплекса.

При измерении кинетических параметров мы варьировали рН реакционной буфера (7.0–8.0, рис. 3) и концентрацию одновалентной соли КСl (0–50 мМ, рис. 3). Эксперименты проводились в присутствии 1 мМ MgCl₂. В работах [6, 20, 21] показано, что в отсутствие Mg²⁺ для АРЕ1 не было обнаружено какой-либо значительной ферментативной активности, т.е. для катализа реакции необходимо наличие ионов Mg²⁺ [22, 23]. Для проявления экзонуклеазной активности АРЕ1 в отношении частичного ДНК-дуплекса с выступающей матричной цепью оптимальна концентрация MgCl₂ 0.1–1 мМ, а для ДНК с одноцепочечным разрывом – 2 мМ [6]. В присутствии 2 мМ MgCl₂ экзонуклеазная активность АРЕ1 проявлялась в узком диапазоне концентраций КСl (0–60 мМ в отношении частичного ДНК-дуплекса с выступающей матричной цепью и 50–100 мМ для ДНК с одноцепочечным разрывом) и ингибировалась полностью при концентрации выше 100–150 мМ [6]. Эндонуклеазная активность проявлялась в широком диапазоне концентраций одновалентной соли до 300 мМ. Максимальная эндонуклеазная активность наблюдалась при концентрациях MgCl₂ 2 мМ и КСl 120 мМ или MgCl₂ 12.5 мМ и КСl 20 мМ [4]. Данные, полученные нами ранее [19], также показывают, что 3'-5'-эксонуклеазная активность АРЕ1 проявляется более эффективно в условиях, когда концентрация солей понижена (0.5 мМ MgCl₂, 25 мМ КСl), чем в условиях, оптимальных для эндонуклеазной активности (10 мМ MgCl₂ и 50 мМ КСl).

При определении кинетических параметров мы использовали три значения рН: 7.0, 7.5 и 8.0. Авторы, впервые выделившие АРЕ1 из клеток HeLa, сообщали, что фермент активен в диапазоне рН 6.7–9.0, с максимумом активности при рН 7.5–7.8 [21]. Другими авторами показано, что для эндонуклеазной активности АРЕ1 оптимальный рН 7.7–7.9, а для экзонуклеазной – рН 7.4 [6]. В таком же, как и для экзонуклеазной активнос-

сти, диапазоне значений рН 7.0–7.5 находятся оптимальные значения рН для эндонуклеазной активности АРЕ1 в отношении AP-сайта в составе одноцепочечной ДНК [13] и в отношении некоторых окислительных повреждений ДНК (ИРН-активность) [14]. Кроме того, такие условия являются оптимальными для связывания АРЕ1 с ДНК, содержащей AP-сайт [24]. При повышении рН от 7.0 до 8.0, по нашим наблюдениям (рис. 3), k_{cat} экзонуклеазной реакции остается практически неизменной, кроме значений при рН 7.0 и концентрации КСl 0 и 25 мМ для пары $C \cdot A$ и 25 мМ для пары $T \cdot G$. А значение K_m при росте рН повышается, то есть сродство АРЕ1 к ДНК с одноцепочечным разрывом падает (рис. 3). Таким образом, от рН реакционной смеси зависит преимущественно стабильность комплекса АРЕ1–ДНК, а не скорость 3'-5'-эксонуклеазной реакции, катализируемой АРЕ1. Влияние рН на скорость может сказываться в оптимальных условиях реакции, при более низком значении рН 7.0.

При повышении концентрации КСl в реакционной смеси от 0 до 50 мМ значение k_{cat} экзонуклеазной реакции падает (рис. 3). При этом величина K_m растет, то есть сродство АРЕ1 к ДНК с одноцепочечным разрывом так же, как и k_{cat} , снижается (рис. 3). Таким образом, от ионной силы раствора зависят как стабильность комплекса АРЕ1–ДНК, так и скорость 3'-5'-эксонуклеазной реакции, катализируемой АРЕ1. В целом, эффективность экзонуклеазной реакции, выражаемая отношением значений k_{cat}/K_m , снижается при повышении рН и концентрации КСl в реакционной смеси.

Как уже отмечено, эффективность эндонуклеазной и экзонуклеазной реакций зависит от концентрации катионов, при этом их оптимальные концентрации для этих двух активностей АРЕ1 различны. Было высказано предположение, что различия в оптимальных условиях экзонуклеазной и эндонуклеазной активностей АРЕ1 могут быть обусловлены тем, что при различной ионной силе раствора изменяется конформация белка при связывании его с ДНК [6, 13].

В литературе есть данные, показывающие, что уровень выщепления 3'-концевого нуклеотида с помощью экзонуклеазной активности АРЕ1 в канонических парах выше для олигонуклеотидов с А + Т-богатой последовательностью [25]. Мы в предыдущей работе предположили, что менее эффективное экзонуклеазное выщепление с помощью АРЕ1 при более высокой ионной силе обусловлено не только менее продуктивной конформацией белка, но и стабилизацией ДНК-дуплекса [10, 19]. Такое предположение было сделано на основе того, что эффективность выщепления dNMP с 3'-конца прямо коррелирует с термостабильностью дуплекса и, следовательно, с возмож-

ностью его "подплавления" с 3'-конца [19]. Приведенные данные по эффективности экзонуклеазной активности АРЕ1 в зависимости от концентрации КС1 (рис. 3) подтверждают наше предположение.

Заклучение

Вопрос о биологической значимости экзонуклеазной активности и роли АРЕ1 как "корректора" ошибок, допущенных β -полимеразой при синтезе ДНК, пока остается открытым. Основанием для предположения о координации действий АРЕ1 и β -полимеразы, помимо коррекции ошибок, создаваемых β -полимеразой в ходе синтеза, послужили следующие результаты [26]. Находясь на АР-сайте, АРЕ1 способствует связыванию β -полимеразы с нерасщепленным АР-сайтом ДНК (с образованием тройного комплекса), а также стимулирует лиазную активность этого фермента. Кроме того, было показано, что АРЕ1 стимулирует синтез ДНК с вытеснением цепи, катализируемый β -полимеразой, во время которого достраивается несколько (2–7) нуклеотидов [27]. Такой тип синтеза характерен для репарации ДНК по "длиннозаплаточному" пути [12]. 3'-5'-Экзонуклеазная активность АРЕ1 менее эффективна в отношении ДНК, моделирующих субстраты, возникающие в ходе "короткозаплаточной" ЭРО [12] (с 5'-р- и 5'-рF-группами), чем на ДНК с 5'-ОН-группой в одноцепочечном разрыве, а также на ДНК, содержащей на 5'-конце свисающую последовательность из нескольких нуклеотидов-флэп, либо на частичном ДНК-дуплексе с выступающим 5'-концом матричной цепи [19]. Возможно, что экзонуклеазная функция АРЕ1 находит применение в каком-либо другом процессе метаболизма ДНК, но скорее всего не в "короткозаплаточном" пути ЭРО, как было предположено ранее [4].

Высказаны и другие предположения о механизме исправления ошибок репаративного синтеза, катализируемого β -полимеразой. Например, роль "корректора" могли бы играть автономные 3'-5'-экзонуклеазы [28]. Показано, что эффективной 3'-5'-экзонуклеазной активностью обладает АРЕ2, в то время как эндонуклеазная активность этого фермента низка по сравнению с АРЕ1 [29]. Таким образом, существуют альтернативные пути для исправления ошибок, создаваемых β -полимеразой в ходе репаративного синтеза ДНК.

Однако к АРЕ1 как объекту исследования проявляется неизменный интерес, поскольку этот фермент обладает множеством функций, действие которых направлено на сохранение целостности генома [12]. Помимо участия в репарации АР-сайтов [1] и азотистых оснований с окислительными повреждениями [1, 13], этот фермент удаляет 3'-блокирующие группы, возникающие при выщеплении окисленного основания бифунк-

циональными ДНК-гликозилазами или под действием окислительных агентов [12]. Кроме непосредственного участия в исправлении повреждений в ДНК, АРЕ1 рассматривается как координатор работы всего процесса ЭРО, стимулируя активность белково-участников репарации [1, 12]. В дополнение к указанным функциям, в качестве окислительно-восстановительного фактора (Ref-1), АРЕ1 регулирует экспрессию генов, активируя факторы транскрипции, такие, как ядерный фактор NF- κ B, Jun и Fos [15–17]. АРЕ1/Ref-1 повышает способность белка p53 связываться с ДНК и активировать транскрипцию целевых промоторов p53, а также участвует в регуляции проапоптотических функций белка p53 [15]. Кроме того, АРЕ1, вероятно, участвует в апоптотической деградации ДНК [30, 31]. Каким образом в клетке обеспечивается протекание различных реакций, катализируемых этим многофункциональным ферментом, представляет значительный интерес.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие реактивы: Т4-полинуклеотидкиназа, ДНК-полимераза β крысы, АР-эндонуклеаза 1 человека (Лаборатория биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН). [γ - 32 P]-АТР (Лаборатория биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН); реактивы для электрофореза, Трис (Sigma, США), Neres (Fluka, Швейцария). Остальные реактивы российских фирм квалификаций "ос. ч." или "ч. д. а."

Олигонуклеотиды синтезированы фирмой "Genset" (Франция) или в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. 32 P-мечение олигонуклеотидов по 5'-концу осуществляли с помощью Т4-полинуклеотидкиназы, меченые олигонуклеотиды были очищены электрофорезом в денатурирующем ПААГ в присутствии 7 М мочевины [32]. Очищенные 32 P-олигонуклеотиды использовали в создании F-ДНК, ДНК-дуплексов с С · А-, Т · G-парами на 3'-конце (С · А(р), Т · G(р)) и ДНК-1 для синтеза олигонуклеотидов, содержащих фотоактивируемые аналоги dCMP на 3'-конце (табл. 1).

Синтез ДНК-структур, содержащих фотоактивируемые аналоги dCMP на 3'-конце праймера, с помощью β -полимеразы. Реакционная смесь содержала следующие стандартные компоненты: 50 мМ Трис (рН 8.0), 50 мМ КС1, 10 мМ MgCl₂, а также 0.6 мкМ ДНК-1 (табл. 1) с 5'- 32 P-меченым олигонуклеотидным праймером, 5.0 мкМ аналог dСТР и 3.0 мкМ β -полимеразу. Продукты достройкой анализировали и очищали электрофорезом в денатурирующем ПААГ с 7 М мочевиной [32], с полученным 32 P-меченым фотоактивируемым олигонуклеотидом создавали нужные ДНК-дуплексы (табл. 1, fmY · R(p), fmY · R(h), fmY · R(pF)).

Эндонуклеазная активность АРЕ1. Реакционные смеси содержали 20 нМ F-ДНК (табл. 1), 0.5 нМ АРЕ1, а также следующие компоненты: 50 мМ Трис, 50 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂ (буфер 1, рН 8.0) или 25 мМ Нерес, 50 мМ КСl, 1 мМ MgCl₂ (буфер 5, рН 7.0). Реакцию проводили при 37°C в течение 15 с–10 мин. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ с 7 М мочевиной [32].

Экзонуклеазная активность АРЕ1. Реакционные смеси содержали 20 нМ ДНК-дуплекс, АРЕ1 (5 нМ–2 мкМ), а также буферные компоненты: 50 мМ Трис или 25 мМ Нерес, соли MgCl₂ и КСl в указанных в каждом случае концентрациях. Реакцию проводили при 37°C в течение 5–30 мин. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 20% денатурирующем ПААГ с 7 М мочевиной [32]. Расчет кинетических параметров k_{cat} и K_m экзонуклеазной реакции, катализируемой АРЕ1, проводили по формуле: $\ln(1 - [P]/[S_0]) = -k_{cat}[E_0]t/(K_m + [E_0])$, в координатах $t/\ln(1 - [P]/[S_0])$ от $(1/[E_0])$. Для каждой точки проводилось 3–4 эксперимента. Расчетное значение полученных параметров усреднялось. Крайнее значение полученного усредненного составляло не более 10% от усредненного.

Авторы выражают благодарность Жаркову Д.О. за ценные замечания при написании статьи. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-00178), Лаврентьевского гранта СО РАН для молодых ученых (№ 96), Интеграционного проекта СО РАН № 110.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wilson D.M. III, Barsky D.* // *Mutat. Res.* 2001. V. 484. P. 283–307.
2. *Demple B., Herman T., Chen D.S.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 11450–11454.
3. *Chou K.-M., Kukhanova M., Cheng Y.-C.* // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 31009–31015.
4. *Chou K.-M., Cheng Y.-C.* // *Nature.* 2002. V. 415. P. 655–659.
5. *Lindahl T.* // *Mutat. Res.* 2000. V. 462. P. 129–135.
6. *Chou K.-M., Cheng Y.-C.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 18289–18296.
7. *Lebedeva N.A., Khodyreva S.N., Favre A., Lavrik O.I.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 300. P. 182–187.
8. *Wong D., DeMott M.S., Demple B.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 36242–36249.
9. *Wilson D.M. III.* // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 330. P. 1027–1037.
10. *Дырхеева Н.С., Ходырева С.Н., Суханова М.В., Сафронов И.В., Дежуров С.В., Лаврик О.И.* // *Биохимия.* 2006. Т. 71(2). С. 200–210.
11. *Сафронов И.В., Щербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Шишкин Г.В., Лав-*

рик О.И. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 576–585.

12. *Дырхеева Н.С., Ходырева С.Н., Лаврик О.И.* // *Молекулярная биология.* 2007. Т. 43 (3). С. 450–466.
13. *Wilson D.M. III.* // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 345. P. 1003–1014.
14. *Gros L., Ischenko A.A., Ide H., Elder R.H., Saporbaev M.K.* // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 73–81.
15. *Fritz G.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000. V. 32. P. 925–929.
16. *Xanthoudakis S., Curran T.* // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 653–665.
17. *Xanthoudakis S., Miao G., Wang F., Pan Y.C., Curran T.* // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 3323–3335.
18. *Cistulli C., Lavrik O.I., Prasad R., Hou E., Wilson S.H.* // *DNA Repair.* 2004. V. 3. P. 581–591.
19. *Dyrkheeva N.S., Lomzov A.A., Pyshnyi D.V., Khodyreva S.N., Lavrik O.I.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 764. P. 699–706.
20. *Wilson D.M. III, Takeshita M., Grollman A.P., Demple B.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 16002–16007.
21. *Kane C.M., Linn S.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 3405–3414.
22. *Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A.* // *Mutat. Res.* 2000. V. 460. P. 211–229.
23. *Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.* // *Nature.* 2000. V. 430. P. 451–455.
24. *Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson D.M. III, Rupp B.* // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 307. P. 1023–1034.
25. *Hadi M.Z., Ginalski K., Nguyen L.H., Wilson D.M. III.* // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 316. P. 853–866.
26. *Bennet R.A.O., Wilson D.M. III, Wong D., Demple B.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 7166–7169.
27. *Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I.* // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. P. 1222–1229.
28. *Крутяков В.М.* // *Молекулярная биология.* 2004. Т. 38. С. 823–833.
29. *Burkovics P., Szukacsov V., Unk I., Haracska L.* // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. P. 2508–2515.
30. *Marenstein D.R., Wilson D.M. III, Teebor G.W.* // *DNA Repair.* 2003. V. 3. P. 527–533.
31. *Yoshida A., Urasaki Y., Waltham M., Bergman A.-C., Pourquier P., Rothwell D.-G., Inuzuka M., Weinstein J.N., Ueda T., Appella E., Hickson I.D., Pomtner Y.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 37768–37776.
32. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Quantitative Parameters of the 3'-5' Exonuclease Reaction of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 with Nicked DNA Containing dYMP or a Modified dCMP Analogue Depending on the Reaction Conditions

N. S. Dyrkheeva, S. N. Khodyreva, and O. I. Lavrik[#]

[#] Phone: +7 (383) 330-9296; fax: +7 (383) 330-3367; e-mail:lavrik@niboch.nsc.ru

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrenteva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Human apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease 1 (APE1) is a multifunctional enzyme. In addition to its main AP endonuclease activity, the cleavage of DNA 5' to the AP site, it displays other weak enzymatic activities. One of them is 3'-5' exonuclease activity, which is most effectively pronounced for DNA duplexes containing modified or mismatched nucleotides at the 3' end of the primer chain. There is a presumption that APE1 can correct the DNA synthesis catalyzed by DNA polymerase β during the base excision repair process. We determined the quantitative parameters of the 3'-5' exonuclease reaction in dependence on the reaction conditions to reveal the detailed mechanism of this process. The kinetic parameters of APE1 exonuclease excision of mismatched dCMP and dTMP from the 3' terminus of single-strand DNA and from photoreactive dCMP analogues applied for photoaffinity modification of proteins and DNA in recombinant systems and cell/nuclear extracts were determined.

Key words: DNA, repair, endonuclease, apurinic/aprimidinic; dYTP, 3'-5' exonuclease activity, photoreactive analogues