

УДК 577.151.42/45

Н. А. Кузнецов<sup>1,2</sup>, Н. А. Тимофеева<sup>2</sup>, О. С. Федорова<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Новосибирский государственный университет  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
просп. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ *hOgg1* И *Ape1* В ПРОЦЕССЕ РЕПАРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

В работе методом остановленной струи исследована предстационарная кинетика процесса репарации 8-оксогуанина в ДНК при совместном действии двух ферментов (8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза *hOgg1* и апуриновая / апиримидиновая эндонуклеаза *Ape1*), ответственных за узнавание и вырезание поврежденного основания и разрыва рибозофосфатного остова ДНК. Показано, что в присутствии двух ферментов, последовательно выполняющих свои функции в процессе репарации 8-оксогуанина, происходит обмен промежуточного субстрата между двумя фермент-субстратными комплексами, что приводит к увеличению скорости накопления конечных продуктов реакции примерно в 10 раз по сравнению с процессом, катализируемым лишь одной 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой *hOgg1*.

**Ключевые слова:** репарация ДНК, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, апуриновая / апиримидиновая эндонуклеаза.

В процессе эволюции молекула ДНК была отобрана в качестве носителя генетической информации. Движущей силой для этого послужила стабильность химических связей, которые характеризуют устойчивость ДНК. Однако, несмотря на высокую химическую устойчивость, стабильность ДНК все же безгранична. ДНК живых организмов постоянно подвергается воздействию различных факторов, среди которых можно выделить мутагены, высокореакционные клеточные метаболиты, ультрафиолетовое и ионизирующее излучение и т. д. Перечисленные факторы могут приводить к окислительному стрессу вследствие образования в клетках активных форм кислорода. Эти формы кислорода способны реагировать с клеточными макромолекулами, в том числе ДНК. В результате происходит модификация азотистых оснований, образование одиночных или двойных разрывов цепей ДНК, апуриновых-апиримидиновых сайтов (AP-сайтов), ковалентных связей с белками [1; 2]. Среди продуктов окисления оснований ДНК наиболее часто встречается 8-оксогуанин (*oxoG*). Это основание способно образовывать пару Хугстеновского типа с аденином, что приводит к мутации G/C → T/A [3]. Подобные повреждения

генетического аппарата могут вызывать гибель клеток, вырождение ткани или рак [4]. Кроме того, согласно свободно-радикальной теории старения, окислительные повреждения клеточных макромолекул приводят к ускоренному развитию дегенеративных процессов организма [5]. Однако все живые организмы способны удалять повреждения и восстанавливать исходную структуру ДНК [6]. Считается, что по пути эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) удаляется большинство повреждений ДНК [7].

Механизм BER включает в себя удаление поврежденного или некомплементарного азотистого основания и последующее восстановление вырезанного нуклеотида репликативным аппаратом клетки. Удаление поврежденного или неправильно спаренного основания осуществляется ДНК-гликозилазами. Большинство из них могут удалять несколько различных модифицированных оснований. Удаление остатков 8-оксогуанина из ДНК человека осуществляет фермент 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (*hOgg1*). Это бифункциональный фермент, который расщепляет N-гликозидную связь поврежденного основания с образованием свободного *oxoG*, после че-

го разрушает фосфодиэфирную связь со стороны 3'-атома углерода остатка дезоксирибозы путем  $\beta$ -элиминирования (АР-лиазная активность), образуя в ДНК одноцепочечный разрыв [8]. Однако для удаления АР-сайтов из ДНК в клетках существует специализированный фермент – апуриновая / апириимидиновая эндонуклеаза (*Ape1*). В результате ее работы в ДНК образуется пробел в один нуклеотид, который содержит на 3'-конце гидроксильную группу, а на 5'-конце остаток фосфорной кислоты. После этого ДНК-полимеразы присоединяют нужный нуклеотид и ДНК-лигазы заканчивают процесс BER, восстанавливая целостность дезоксирибозофосфатного остова.

Ранее с помощью метода остановленной струи нами изучена предстационарная кинетика процесса с участием фермента *hOgg1*. Для этого проводили регистрацию изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана *hOgg1* в ходе ферментативной реакции [9]. Выявлены изменения конформации фермента в ходе каталитического цикла. Предложена кинетическая схема процесса взаимодействия фермента *hOgg1* с *oxoG*-субстратом. Показано, что стадия вырезания поврежденного основания протекает в 10 раз быстрее, чем последующее расщепление фосфодиэфирной связи с 3'-стороны от образовавшегося АР-сайта. Поскольку скорость расщепления ДНК очень мала, то фермент *hOgg1* самостоятельно не способен эффективно выполнять этот процесс в живой клетке. Поэтому работа фермента *hOgg1* сопряжена с действием других компонентов системы репарации, в том числе с АР-эндонуклеазой *Ape1*. Добавление *Ape1* в реакционную смесь *hOgg1* с дуплексом, содержащим 8-оксогуанин, увеличивает скорость вырезания поврежденного основания [10]. Показано, что продукт реакции *hOgg1* с *oxoG*-субстратом имеет на 3'-конце 4-окси-2-пентеналь, в то

время как в присутствии *Ape1* на 3'-конце остается гидроксильная группа.

**Цель** исследования: изучение предстационарной кинетики удаления остатка *oxoG* из молекулы ДНК при совместном присутствии двух ферментов: 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы *hOgg1* и АР-эндонуклеазы человека *Ape1*, последовательно функционирующих в процессе репарации ДНК.

## Материал и методы

Для кинетического исследования этого процесса мы использовали метод остановленной струи. Вместо флуоресценции остатков Trp белка регистрировали флуоресценцию ДНК-субстратов. Для этого в ДНК вводили флуоресцирующий аналог пуриновых оснований – 2-аминопурин (*2aPu*). В отличие от предыдущей работы [9] для исследования использован спектрометр SFM-400 (Франция), позволяющий проводить последовательное смешивание растворов. Строение использованных ДНК-субстратов представлено на рис. 1. Субстрат F, содержащий остаток 2-оксиметил-3-окси-тетрагидрофурана, является нерасщепляемым для *hOgg1*, но расщепляется ферментом *Ape1*, тогда как субстрат АР расщепляется обоими ферментами, но с различными скоростями [10].

Олигонуклеотиды d(GGAAGCCGAGAG), d(CTCTCX(*2aPu*)CTTCC), где X – модифицированный нуклеозид синтезированы стандартным фосфитамидным методом. Очистку проводили с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (Nucleosil 100-10 N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) и последующей обращенно-фазовой хроматографией (Nucleosil 100-10 C18). Концентрацию олигонуклеотидов определяли по электронным спектрам поглощения [11].

Ферменты *hOgg1* и *Ape1* выделяли из клеток *E. coli*, очищали и характеризовали, как описано ранее [9].

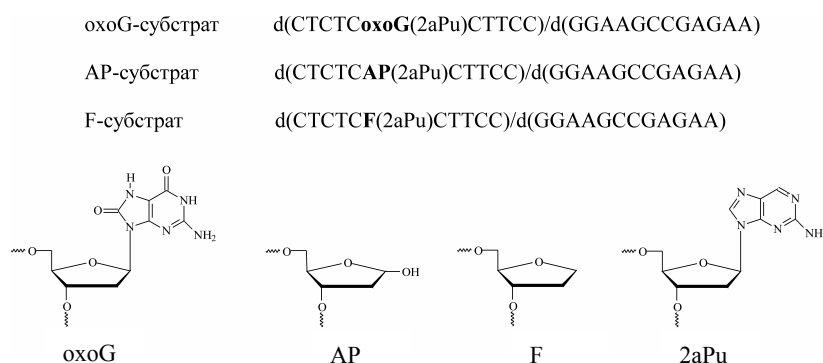


Рис. 1. Последовательность использования использованных ДНК-субстратов и структура модифицированных нуклеозидов.

*oxoG* – 8-оксогуанин, АР – АР-сайт, F – остаток 2-оксиметил-3-окси-тетрагидрофурана, *2aPu* – 2-аминопурин, флуоресцирующий аналог пуринов

Флуоресцентные кинетические кривые были зарегистрированы на спектрофотометре остановленной струи SFM-400. Во всех экспериментах длина волны возбуждения флуоресценции составляла 310 нм. Все эксперименты выполнены с использованием 1 мкМ ДНК-субстратов и 1,5 мкМ ферментов в буфере состава 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 9 % глицерин при 25 °С. Флуоресценцию *2aPu* наблюдали на длинах волн более 370 нм, используя светофильтр Corion filter LG-370. Каждая кинетическая кривая являлась результатом усреднения как минимум трех экспериментальных кривых.

Для расчета констант скорости использовали метод нелинейной регрессии, включающий численное интегрирование дифференциальных уравнений, описывающих кинетику процесса [12].

### Результаты исследования и обсуждение

**F-субстрат.** При взаимодействии фермента *Ape1* с F-субстратом происходит очень быстрое (в течение 150 мс) образование каталитически активного комплекса, которое сопровождается падением интенсивности флуоресценции (рис. 2). После образования комплекса F•*Ape1* происходит рост интенсивности флуоресценции *2aPu*, характеризующий химическую стадию

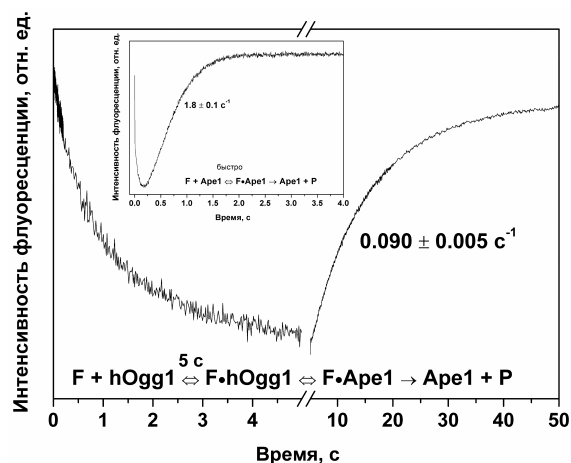


Рис. 2. Кинетические кривые, полученные при взаимодействии F-субстрата с *Ape1* (вставка), *hOgg1* и при последовательном действии двух ферментов.

В кинетической схеме P – продукт реакции, содержащий на 3'-конце гидроксильную группу

ферментативного процесса и диссоциацию комплекса фермента с продуктом реакции (см. рис. 2). Наблюдаемая эффективная константа скорости этого процесса равна  $1,80 \pm 0,10 \text{ c}^{-1}$ .

Взаимодействие фермента *hOgg1* с F-субстратом приводит к образованию фермент-субстратного комплекса, однако химической стадии разрыва рибозофосфатного остова не происходит. На кинетических кривых, полученных для этого процесса, наблюдается падение интенсивности флуоресценции на начальном участке времени (за 5 с), характеризующее образование комплекса F•*hOgg1* (см. рис. 2). После установления равновесия через 5 с в реакционную смесь был добавлен фермент *Ape1*. Далее начинается рост интенсивности флуоресценции, свидетельствующий о разрыве цепи ДНК, что явилось следствием распада комплекса субстрата с ферментом *hOgg1* и образования комплекса с *Ape1*. Наблюдаемая константа скорости этого процесса равна  $0,090 \pm 0,005 \text{ c}^{-1}$ .

Полученные данные свидетельствуют о том, что разрыв F-субстрата при последовательном действии ферментов *hOgg1* и *Ape1* происходит в 20 раз медленнее, чем при взаимодействии с одним лишь *Ape1*. Эта задержка, вероятно, связана с медленным процессом обмена субстратом между двумя ферментами.

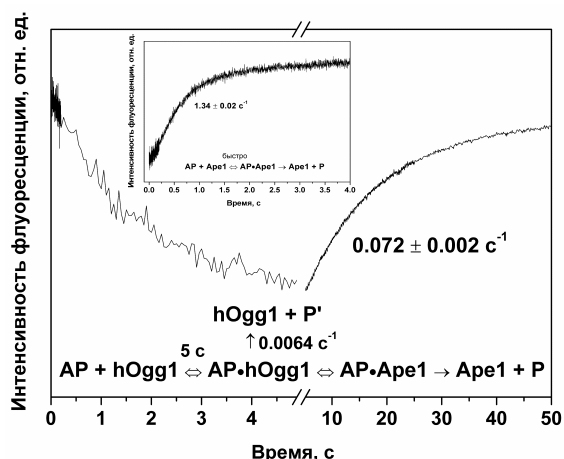


Рис. 3. Кинетические кривые, полученные при взаимодействии AP-субстрата с *Ape1* (вставка), *hOgg1* и при последовательном действии двух ферментов.

В кинетической схеме P – продукт реакции, содержащий на 3'-конце гидроксильную группу, P' – продукт реакции, содержащий на 3'-конце 4-окси-2-пентеналь

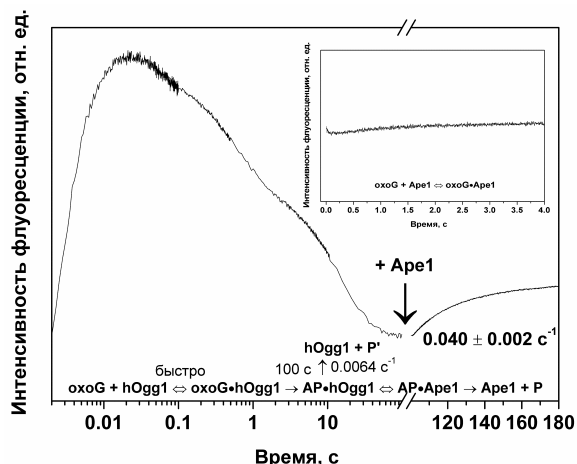


Рис. 4. Кинетические кривые, полученные при взаимодействии *oxoG*-субстрата с *Ape1* (вставка), *hOgg1* и при последовательном действии двух ферментов.

В кинетической схеме Р – продукт реакции, содержащий на 3'-конце гидроксильную группу, Р' – продукт реакции, содержащий на 3'-конце 4-окси-2-пентеналь

*AP-субстрат.* В случае взаимодействия *Ape1* с AP-субстратом быстрая стадия образования комплекса AP•*Ape1* не может быть зарегистрирована в данных условиях. Однако выявлена более медленная химическая стадия и последующая стадия диссоциации комплекса «фермент-продукт», характеризующиеся наблюдаемой константой скорости  $1,34 \pm 0,02 \text{ c}^{-1}$  (рис. 3).

При взаимодействии AP-субстрата с *hOgg1*, как и в случае с F-субстратом, происходит образование комплекса AP•*hOgg1*, сопровождающееся падением интенсивности флуоресценции (см. рис. 3). Поскольку AP-субстрат является расщепляемым субстратом для *hOgg1* [9], то наблюдается стадия разрыва рибозофосфатного остова в таком субстрате. Константа скорости реакции расщепления равна  $0,0064 \text{ c}^{-1}$  [9]. Именно эта стадия репарации 8-оксогуанина в ДНК человека является скоростью-лимитирующей. В данной ситуации «передача» AP-субстрата более «быстрому» ферменту *Ape1* приведет к другому альтернативному ходу реакции, не содержащему этой стадии. Иначе говоря, происходит «шунтирование» данной стадии через взаимодействие с ферментом *Ape1*.

Добавление *Ape1* в реакционную смесь, содержащую AP-субстрат с *hOgg1*, через 5 с после их смешивания приводит к росту интенсивности флуоресценции, который подтверждает передачу AP-субстрата от *hOgg1* к *Ape1* и превращение его в продукт. Наблюдаемая константа скорости этого процесса равна  $0,072 \pm 0,002 \text{ c}^{-1}$ .

В данном случае, как и с F-субстратом, константа скорости расщепления AP-субстрата при последовательном действии ферментов *hOgg1* и *Ape1* ( $0,072 \text{ c}^{-1}$ ) при-

мерно в 20 раз ниже, чем при действии только *Ape1* ( $1,34 \text{ c}^{-1}$ ). Эта константа скорости в 11 раз больше константы скорости расщепления AP-субстрата ферментом *hOgg1* ( $0,0064 \text{ c}^{-1}$ ) в отсутствие *Ape1*. Другими словами, суммарная скорость накопления продуктов реакции расщепления ДНК увеличивается в 11 раз при совместном действии данных ферментов на AP-субстрат.

*oxoG-субстрат.* Использование в качестве субстрата дуплекса ДНК, содержащего остаток 8-оксогуанина, позволило промоделировать полный цикл действия двух ферментов. Фермент *Ape1* не вызывал разрыва субстрата *oxoG* (рис. 4). В то же время взаимодействие фермента *hOgg1* с *oxoG*-субстратом приводило к быстрому возрастанию интенсивности флуоресценции на начальном участке кинетической кривой (в течение 20 мс), что свидетельствует об образовании фермент-субстратного комплекса. После образования первичного комплекса *oxoG*•*hOgg1* происходило падение интенсивности флуоресценции, что указывает на конформационные изменения в структуре ДНК-субстрата, связанные с образованием каталитически активного комплекса. Эти конформационные изменения приводят к удалению *oxoG* из *oxoG*-субстрата и образованию AP-субстрата с константой скорости, равной  $0,06 \text{ c}^{-1}$  [9].

Добавление *Ape1* в реакционную смесь после завершения реакции удаления остатка *oxoG* приводит к передаче AP-субстрата из комплекса с ферментом *hOgg1* в комплекс с ферментом *Ape1* и его разрыву с наблюдаемой константой скорости  $0,040 \pm 0,002 \text{ c}^{-1}$ . Эта величина в 6 раз превышает константу скорости превращения AP-субстрата при катализе ферментом *hOgg1* ( $0,0064 \text{ c}^{-1}$ )

в отсутствие *Ape1*. Таким образом, присутствие в реакционной смеси обоих ферментов приводит к увеличению скорости разрыва цепи ДНК по остаткам *oxoG* за счет «шунтирования» скорость-лимитирующей стадии процесса.

### Заключение

С помощью метода остановленной струи с последовательным смешиванием реагентов и регистрацией интенсивности флуоресценции остатков 2-аминопурина получены кинетические характеристики превращения ДНК-субстратов при совместном действии ферментов *hOgg1* и *Ape1*, последовательно выполняющих свои функции в процессе репарации окислительных повреждений ДНК. Установлено, что в результате вытеснения ферментом *Ape1* фермента *hOgg1* из комплекса с промежуточным AP-субстратом, образующимся после удаления поврежденного основания *oxoG*, происходит увеличение скорости разрыва ДНК-цепи в 10 раз. Такой процесс способствует эффективной репарации повреждений в молекулах ДНК, образующихся под действием активных форм кислорода.

### Список литературы

1. Wallace S. S. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. Vol. 33. P. 1–14.
2. Marnett L. J. Oxyradicals and DNA damage // *Carcinogenesis*. 2000. Vol. 21. P. 361–370.
3. Shibutani S. et al. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG / S. Shibutani, M. Takeshita, A. P. Grollman // *Nature*. 1991. Vol. 349. P. 431–434.
4. Evans M. D. et al. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance / M. D. Evans, M. Dizdaroglu, M. S. Cooke // *Mutat. Res.* 2004. Vol. 567. P. 1–61.
5. Beckman K. B., Ames B. N. The free radical theory of aging matures // *Physiol. Rev.* 1998. Vol. 78. P. 547–581.
6. DNA Repair and Mutagenesis / E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede et al. ASM Press. 2005.
7. Parikh S. S. et al. Base excision repair enzyme family portrait: integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway / S. S. Parikh, C. D. Mol, J. A. Tainer // *Structure*. 1997. Vol. 5. P. 1543–1550.
8. Substrate specificity of the *Ogg1* protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide / metal ion-generated free radicals / B. Karahalil, P. M. Girard, S. Boiteux et al. // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26. P. 1228–1232.
9. Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase / N. A. Kuznetsov, V. V. Koval, D. O. Zharkov et al. // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33. P. 3919–3931.
10. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair / J. W. Hill, T. K. Hazra, T. Izumi et al. // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29. P. 430–438.
11. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* / Ed. G. D. Fasman. 3rd ed. CRC Press. Cleveland, OH, 1975. Vol. 2. P. 589.
12. Kuzmic P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase // *Anal. Biochem.* 1996. Vol. 237. P. 260–273.

Материал поступил в редколлегию 05.07.2006

N. A. Kuznetsov, N. A. Timofeyeva, O. S. Fedorova

### Interaction of enzymes *hOgg1* and *Ape1* during repair of the oxidative damages in DNA

The present work is devoted to study of the kinetic process of repair of 8-oxoguanine in DNA by two enzymes [8-oxoguanine-DNA-glycosylase *hOgg1* and AP-endonuclease *Ape1*], which recognize and excise damage bases and cleavage ribose-phosphate bond in DNA. In result of the work was shown, that in the presence of both enzymes, which consequently act during 8-oxoguanine repair process, there is the exchange of intermediate substrate between two enzyme-substrate complexes. Such exchange result in increasing of the rate constant of accumulation of product reaction about 10 times more than during action only 8-oxoguanine-DNA-glycosylase *hOgg1*.

**Keywords:** DNA repair, 8-oxoguanine-DNA-glycosylase, AP-endonuclease

Работа выполнена при поддержке РФФИ (04-04-48171) и INTAS (05-109-4159), Welcome Trust (№ 070244/Z/03/Z), интеграционных грантов СО РАН (№ 51, 60), Роснауки (№ 02.434.11.7064), гранта № 94 Лаврентьевского конкурса молодежных проектов СО РАН и гранта Фонда содействия отечественной науке «Лучшие аспиранты РАН».