

Кинетические особенности взаимодействия APE1 и Pol β с ДНК и другими белками-участниками процесса эксцизионной репарации оснований ДНК

Бакман А.*, Кузнецов Н.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

* art-bakman@yandex.ru

Ключевые слова: эксцизионная репарация оснований; апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1; ДНК-полимераза β ; белок-белковые взаимодействия; ферментативная кинетика

Мотивация и цель: Эксцизионная репарация оснований (BER) отвечает в живой клетке за репарацию таких повреждений ДНК, как апуриновые/апиримидиновые сайты (AP-сайты), модифицированные основания, одноцепочечные разрывы. BER – это сложный многостадийный процесс, в котором участвует ряд ферментов репарации и вспомогательных белковых факторов. В число ключевых ферментов BER у человека входят апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1) и ДНК-полимераза β (Pol β). Несмотря на то что механизм реакции, катализируемой APE1, детально изучался во многих работах [1, 2], до сих пор остается дискуссионной роль некоторых аминокислотных остатков фермента в катализе, а также факторы, обеспечивающие субстратную специфичность APE1. Для полного понимания процесса BER следует выяснить не только механизмы взаимодействия ферментов репарации с ДНК, но и их координацию между собой, которая требуется для эффективного устранения повреждений ДНК. Координация BER осуществляется за счет множественных белок-белковых взаимодействий между участниками процесса и активно изучается исследователями в течение последних 20 лет [3, 4]. Тем не менее не все взаимодействия между участниками BER изучены на данный момент, а большинство белок-белковых взаимодействий не охарактеризованы в структурном и кинетическом аспектах.

Цель данной работы состояла в детальном кинетическом исследовании процесса согласованного взаимодействия апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека APE1 и ДНК-полимеразы β с ДНК в процессе эксцизионной репарации оснований.

В ходе исследований выполнялось определение функциональной роли аминокислотных остатков His309, Tyr171, Arg177 и Arg181 APE1 в механизме AP-эндонуклеазной реакции и уточнение молекулярно-кинетического механизма взаимодействия APE1 с модельными ДНК-субстратами; создание чувствительной системы регистрации процессов взаимодействия фермента с ДНК и другими белками BER на основе флуоресцентно меченной APE1; исследование взаимного влияния между APE1 и Pol β в процессе BER и анализ эффекта ДНК-гликозилаз на каталитическую активность Pol β .

Методы и алгоритмы: Для внесения мутаций в ген APE1 использовался метод сайт-направленного мутагенеза, для выделения и очистки белков использовались ионообменная и аффинная хроматографии, для анализа накопления продуктов

ферментативных реакций использовался метод электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле. Предстационную кинетику взаимодействия ферментов с ДНК изучали методом «остановленной струи» с регистрацией флуоресценции остатков триптофана фермента, флуоресцеина в составе ДНК, 2-аминопурина в составе ДНК или красителя Alexa Fluor 488 в составе меченого белка. Обработка кинетических данных проводилась с помощью программ Origin 8.1 и DynaFit.

Результаты: Была изучена активность мутантных форм APE1 с заменами Y171F, H309A, R177A, R181A по отношению к субстрату, содержащему F-сайт (синтетический химически стабильный аналог AP-сайта). Показано, что замены Y171F и H309A не приводят к изменению профиля зависимости скорости катализа от pH. Исследование кинетики взаимодействия мутантных форм APE1 с ДНК-субстратом позволило установить влияние замен на стадии связывания фермента с ДНК, непосредственно расщепления фосфодиэфирной связи и диссоциации продукта. Показано, что замены Y171F и H309A снижают не только скорость расщепления ДНК на 3–4 порядка, но и скорость и эффективность связывания фермента с ДНК. Замена R177A не влияет на скорость стадии расщепления ДНК, но существенно облегчает диссоциацию комплекса фермента с продуктом. Замена R181A тоже облегчает диссоциацию продукта, но при этом еще и существенно снижает скорость стадии гидролиза фосфодиэфирной связи.

Использование метода химической модификации APE1 флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 в сочетании с сайт-направленным мутагенезом остатков цистеина в белке позволило получить белок, меченный по остатку Cys99, что было подтверждено масс-спектрометрическим анализом. Использование флуоресцентно меченой APE1 позволило зарегистрировать специфические процессы взаимодействия фермента с ДНК-субстратами в ходе эндонуклеазной реакции по изменению флуоресценции красителя в составе белка. Фазы изменения интенсивности флуоресценции Alexa Fluor 488 были соотнесены со стадиями процесса фермент-субстратного взаимодействия. Было изучено взаимодействие меченой APE1 с модельными 17- и 28-звенными ДНК-субстратами. Полученные данные существенно дополнили предложенную ранее модель фермент-субстратного взаимодействия путем детализации механизма диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции.

Флуоресцентно меченная APE1 и 28-звенный ДНК-дуплекс были использованы в работе для того, чтобы изучить механизм влияния Pol β на активность APE1. Показано, что Pol β способствует связыванию APE1 с субстратом эндонуклеазной реакции и диссоциации ее из комплекса с продуктом (расщепленной ДНК). Было изучено влияние APE1 на кинетику катализируемого Pol β встраивания нуклеотида в ДНК-субстраты, моделирующие интермедиаты BER. В случае дуплекса с однонуклеотидной брешью добавление APE1 в реакционную смесь приводит к небольшому снижению скорости как связывания Pol β с ДНК, так и каталитической стадии. В случае субстрата, содержащего однонуклеотидную брешь с F-сайтом, концентрация APE1 не влияла на скорости связывания Pol β с ДНК и встраивания нуклеотида. Однако при высоких концентрациях APE1 на флуоресцентных кривых появлялась дополнительная фаза, предположительно, соответствующая связыванию APE1 с продуктом полимеразной реакции. Дополнительные эксперименты показали, что повышение концентрации Pol β приводит к ингибированию данной стадии, что свидетельствует о конкуренции

между двумя ферментами за связывание ДНК. Однако EMSA показал, что APE1 и Pol β могут связываться с ДНК-продуктом полимеразной реакции одновременно. С целью изучения влияния ДНК-гликозилаз на нуклеотидилтрансферазную активность Pol β были выбраны 7 ДНК-гликозилаз, относящихся к разным структурным семействам и обладающих различными субстратными специфичностями: AAG, OGG1, NEIL1, NTHL1, MBD4, UNG2 и SMUG1. Катализируемое Pol β встраивание нуклеотида в ДНК-субстраты, имитирующие различные интермедиаты BER, в присутствии каждой из этих ДНК-гликозилаз было изучено в условиях кинетики одного оборота. Результаты показали, что ДНК-гликозилазы AAG, OGG1, NTHL1, MBD4, UNG2 и SMUG1 стимулируют активность Pol β по отношению к различным интермедиатам BER.

Выводы: Результаты исследования кинетики взаимодействия мутантных форм APE1 с ДНК-субстратами позволили уточнить функциональную роль остатков H309, Y171, R177 и R181 в механизме AP-эндонуклеазной реакции. Остатки Y171 и H309 не только критически важны для катализа эндонуклеазной реакции, но также участвуют в связывании APE1 с ДНК, что подтверждает их роль в стабилизации переходного состояния реакции за счет координации гидролизуемой фосфатной группы ДНК. R177 важен для связывания фермента с расщепленной ДНК, но не участвует в гидролизе фосфодиэфирной связи. R181 важен для стабилизации комплекса APE1 с расщепленной ДНК, но помимо этого способствует протеканию реакции гидролиза фосфодиэфирной связи.

С помощью созданной чувствительной модельной системы на основе флуоресцентно меченной APE1 зарегистрированы специфические процессы взаимодействия фермента с ДНК-субстратами различной длины, содержащими F-сайт, а также ДНК-опосредованные взаимодействия между APE1 и другими ферментами BER. Полученные данные позволили установить последовательность стадий диссоциации комплекса фермента с расщепленной ДНК. Показано, что в случае 17-звенных дуплексов диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции инициируется высвобождением 5'-концевого олигонуклеотидного фрагмента, тогда как в случае более длинных модельных субстратов происходит согласованная диссоциация фермента и дуплексной ДНК, содержащей разрыв.

Изучены механизм влияния Pol β на взаимодействие APE1 с ДНК и механизм влияния APE1 на катализируемое Pol β встраивание нуклеотида в ДНК с одонуклеотидной брешью. Полученные результаты свидетельствуют о сложном механизме координации между этими двумя ферментами BER, выходящем за пределы модели «передачи эстафетной палочки».

Полученные в работе данные о влиянии различных ДНК-гликозилаз на нуклеотидилтрансферазную реакцию Pol β по отношению к различным интермедиатам BER свидетельствуют в пользу предположения, что ДНК-гликозилазы формируют контакты с Pol β в ходе осуществления полимеразной реакции в BER.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания № 121031300041-4.

Kinetic features of protein-DNA and protein-protein interactions of APE1 and Pol β during the base excision repair

Bakman A.*, Kuznetsov N.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* art-bakman@yandex.ru

Key words: base excision repair; apurinic/apyrimidinic endonuclease 1; DNA polymerase β ; protein-protein interactions; enzyme kinetics

Motivation and Aim: In living cells Base excision repair (BER) is responsible for the repair of DNA damage such as apurinic/apyrimidinic sites (AP sites), modified bases, and single-strand breaks. BER is a complex, multistep process that involves a number of repair enzymes and auxiliary protein factors. Key BER enzymes in humans include apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) and DNA polymerase β (Pol β). The mechanism of the reaction catalyzed by APE1 has been studied in detail in many studies [1, 2]. However, the role of some amino acid residues of the enzyme in catalysis and the factors ensuring the substrate specificity of APE1 still remain controversial. To fully understand the BER process, it is necessary to elucidate not only the mechanisms of interaction of repair enzymes with DNA, but also their coordination with each other, which is required for effective repair of DNA damage. BER is coordinated by multiple protein-protein interactions between participants in the process and has been actively studied by researchers over the past 20 years [3, 4]. However, not all interactions between BER participants have been studied to date, and most protein-protein interactions have not been characterized in structural and kinetic aspects. The aim of this work was to perform a detailed kinetic study of the coordinated interaction of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and DNA polymerase β with DNA during the base excision repair.

In the course of the studies we determined the functional role of amino acid residues His309, Tyr171, Arg177 and Arg181 of APE1 in the mechanism of AP-endonuclease reaction and clarified the molecular kinetic mechanism of interaction of APE1 with model DNA substrates. Also we created a sensitive system for recording the interaction of the enzyme with DNA and other BER proteins based on fluorescently labeled APE1. Finally, we studied the mutual influence between APE1 and Pol β during the BER process and analyzed the effect of DNA glycosylases on the catalytic activity of Pol β .

Methods and Algorithms: Site-directed mutagenesis was used to introduce mutations into the APE1 gene; ion-exchange and affinity chromatography were used to isolate and purify proteins; electrophoresis in a denaturing polyacrylamide gel was used to analyze the accumulation of enzymatic reaction products. The pre-steady-state kinetics of enzyme-DNA interaction was studied by the “stopped flow” technique with registering the fluorescence of tryptophan residues of the enzyme, fluorescein in DNA, 2-amino-purine in DNA or Alexa Fluor 488 dye in labeled protein. Kinetic data were processed using Origin 8.1 and DynaFit programs.

Results: The activities of the APE1 mutant forms with substitutions Y171F, H309A, R177A, and R181A toward substrates containing F-site (synthetic chemically stable analog of AP-site) were studied. It is shown that substitutions Y171F and H309A do not lead to a change in the profile of the pH dependence of the catalysis rate. The study of

the kinetics of interaction of mutant forms of APE1 with DNA-substrate allowed us to establish the influence of substitutions on the stages of enzyme binding to DNA, cleavage of the phosphodiester bond and dissociation of the product. It was shown that substitutions Y171F and H309A not only reduce the rate of DNA cleavage by 3–4 orders of magnitude, but also reduce the rate and efficiency of enzyme-DNA binding. Substitution R177A does not affect the rate of the DNA cleavage step, but significantly facilitates the dissociation of the enzyme-product complex. Substitution R181A also facilitates dissociation of the product, but also significantly reduces the rate of the hydrolysis stage of the phosphodiester bond.

The chemical modification of APE1 by the fluorescent dye Alexa Fluor 488 in combination with site-directed mutagenesis of cysteine residues in the protein allowed us to obtain a protein labeled by the Cys99 residue, which was confirmed by mass spectrometric analysis. The use of fluorescently labeled APE1 allowed us to register specific processes of interaction of the enzyme with DNA-substrates during the endonuclease reaction by changes in the fluorescence of the dye in the protein composition. The phases of the fluorescence intensity change of Alexa Fluor 488 were related to the stages of the enzyme-substrate interaction process. The interaction of labeled APE1 with model 17- and 28-nt DNA substrates was studied, significantly supplemented the previously proposed model of the enzyme-substrate interaction by detailing the mechanism of dissociation of the enzyme complex with the product.

Fluorescently labeled APE1 and the 28-nt DNA duplex were used in this work to study the mechanism of Pol β 's influence on APE1 activity. Pol β was shown to facilitate the binding of APE1 to the substrate of the endonuclease reaction and its dissociation from the complex with the product (cleaved DNA). The effect of APE1 on the kinetics of Pol β -catalyzed nucleotide incorporation into DNA substrates modeling BER intermediates was studied. In the case of a duplex with a single-nucleotide gap, the addition of APE1 to the reaction mixture results in a slight decrease in the rate of both Pol β binding to DNA and the catalytic step. In the case of a substrate containing a single-nucleotide gap with an F-site, the concentration of APE1 did not affect the rates of Pol β binding to DNA and nucleotide incorporation. However, at high APE1 concentrations, an additional phase appeared in the fluorescence curves, presumably corresponding to the binding of APE1 to the product of the polymerase reaction. Additional experiments showed that increasing the concentration of Pol β resulted in inhibition of this phase, indicating competition between the two enzymes for DNA binding. However, EMSA has shown that APE1 and Pol β bind to the DNA product of the polymerase reaction simultaneously.

In order to study the effect of DNA glycosylases on the nucleotidyltransferase activity of Pol β , 7 DNA glycosylases belonging to different structural families and with different substrate specificities were selected: AAG, OGG1, NEIL1, NTHL1, MBD4, UNG2, and SMUG1. Pol β -catalyzed nucleotide incorporation into DNA substrates mimicking different BER intermediates in the presence of each of these DNA glycosylases was studied under single turnover kinetics conditions. The results have shown that DNA glycosylases AAG, OGG1, NTHL1, MBD4, UNG2, and SMUG1 stimulate Pol β activity toward different BER intermediates.

Conclusion: The results of studying the kinetics of interaction of the APE1 mutant forms APE1 with DNA substrates allowed us to clarify the functional role of residues H309, Y171, R177, and R181 in the mechanism of the AP-endonuclease reaction. Residues Y171 and H309 are not only critical for catalysis of the endonuclease reaction, but also

participate in the binding of APE1 to DNA, which confirms their role in stabilizing the reaction transition state by coordinating the hydrolyzable phosphate group of DNA. R177 is important for the binding of the enzyme to cleaved DNA but is not involved in the hydrolysis of the phosphodiester bond. R181 is important for stabilization of the APE1 complex with cleaved DNA, but also contributes to the reaction of phosphodiester bond hydrolysis.

Using the created by us sensitive model system based on fluorescently labeled APE1, specific processes of interaction of the enzyme with DNA substrates of different length containing F-site, as well as DNA-mediated interactions between APE1 and other BER enzymes were registered. The data obtained allowed to establish the sequence of stages of dissociation of the enzyme complex with cleaved DNA. It was shown that in the case of our model 17-nt duplexes, dissociation of the enzyme complex with the reaction product is initiated by the release of the 5'-terminal oligonucleotide fragment, while in the case of longer model substrates there is a coordinated dissociation of the enzyme and the duplex DNA containing the break.

The mechanism of Pol β 's influence on the interaction of APE1 with DNA Pol β and the mechanism of APE1's influence on the Pol β -catalyzed nucleotide insertion into DNA with a single-nucleotide gap were studied. These results indicate a complex mechanism of coordination between these two BER enzymes that goes beyond the "baton passing" model.

The data obtained in this work regarding the effect of different DNA-glycosylases on the Pol β 's nucleotidyltransferase activity toward different BER intermediates support the assumption that DNA-glycosylases form contacts with Pol β during the polymerase reaction in BER.

Funding: The research was conducted under the state assignment No. 121031300041-4.

Список литературы/References

1. Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination. *Nature*. 2000;403:451-456
2. Freudenthal B.D., Beard W.A., Cuneo M.J., Dyrkheeva N.S., Wilson S.H. Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22:924-931
3. Moor N.A., Lavrik O.I. Protein – Protein Interactions in DNA Base Excision Repair. *Biochemistry (Moscow)*. 2018;83:411-422
4. Dianov G.L., Hübscher U. Mammalian base excision repair: The forgotten archangel. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:3483-3490