

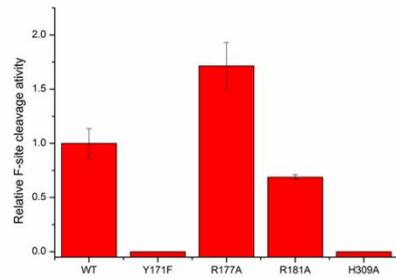
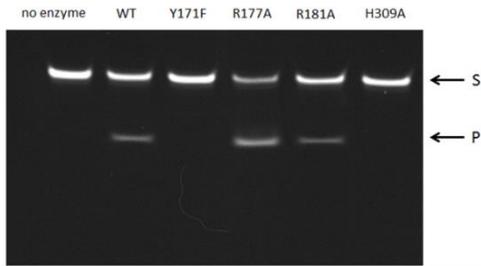
# **Анализ влияния аминокислотных замен R177A, R181A, Y171F и H309A на взаимодействие AP- эндонуклеазы человека с ДНК-субстратами**

**Бакман А.С., Кузнецов Н.А.**

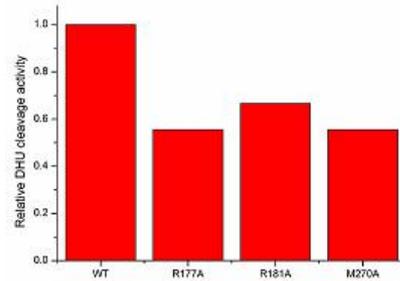
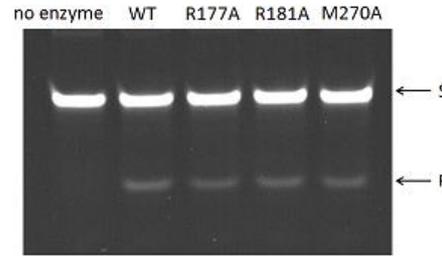
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

- **Цель работы** - установление роли аминокислотных остатков АРЕ1 R177, R181, Y171 и H309 в процессе взаимодействия фермента с ДНК-субстратами.
- **Материалы и методы**
- Мутации были введены в плазмиду, несущую ген АРЕ1, методом сайт-направленного мутагенеза, и мутантные формы фермента были экспрессированы в *E. Coli*, выделены и очищены.
- Сравнение активностей мутантных форм фермента по отношению к различным ДНК-субстратам проводилось с помощью электрофоретического разделения реакционной смеси в полиакриламидном геле.
- Кинетику взаимодействия мутантных форм АРЕ1, содержащих замены R177A, R181A, Y171F и H309A, с ДНК-дуплексами, содержащими синтетический аналог АР-сайта (F-сайт), исследовали методом остановленной струи с детекцией флуоресценции остатков триптофана белка и остатка 6-карбоксифлуоресцеина в составе FRET-пары в молекуле ДНК-субстрата.

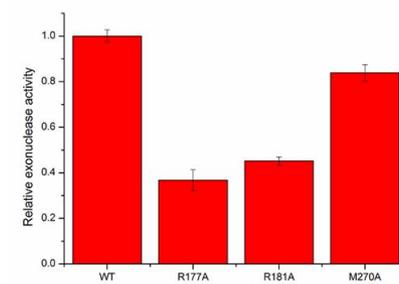
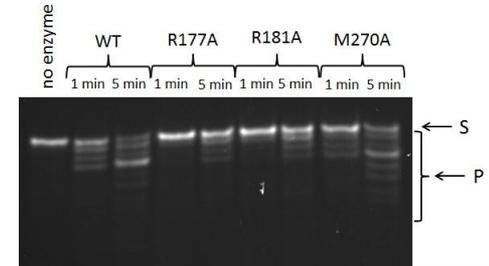
# Сравнение активностей мутантных форм по отношению к различным ДНК-субстратам



F-сайт

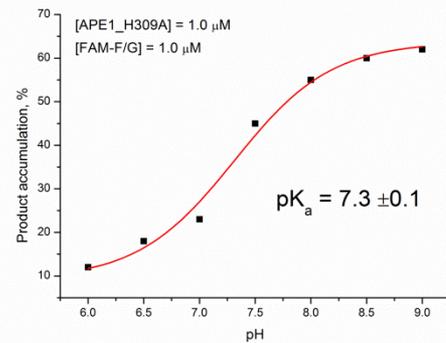
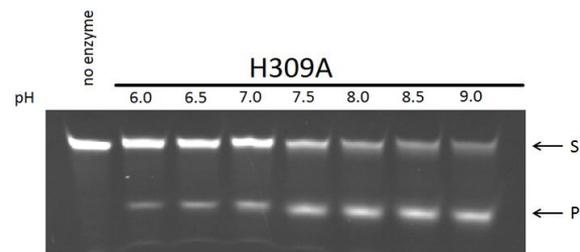
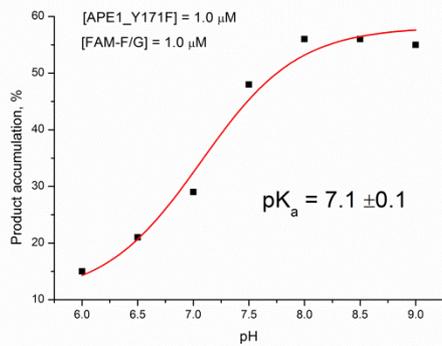
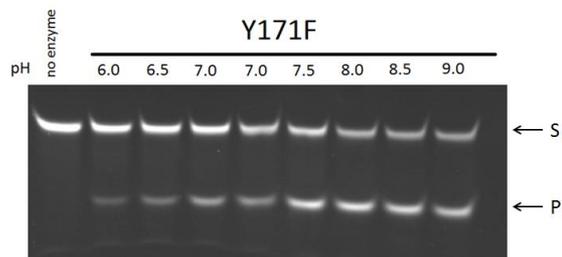


DHU

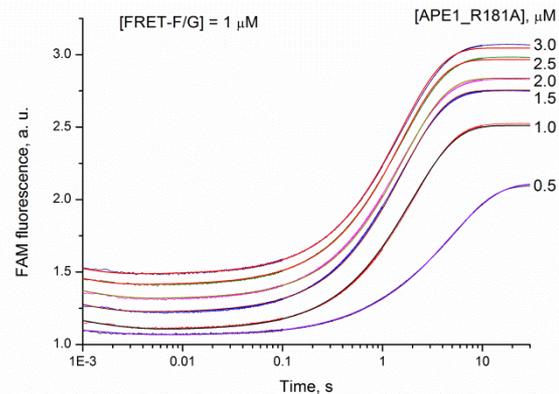
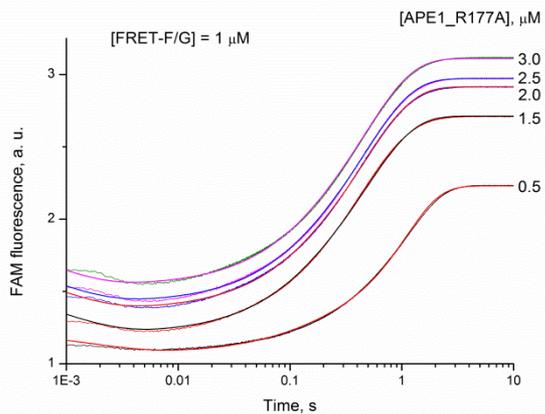
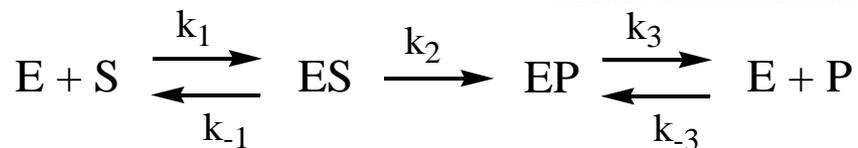
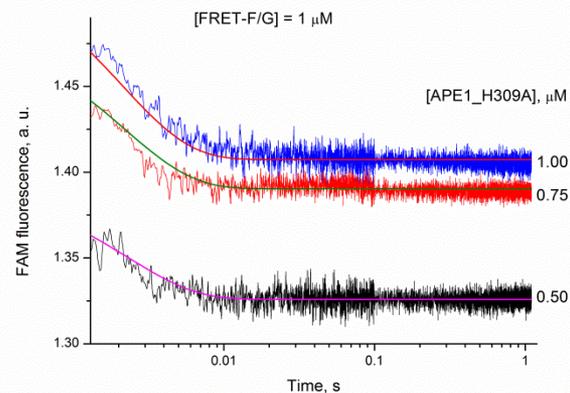
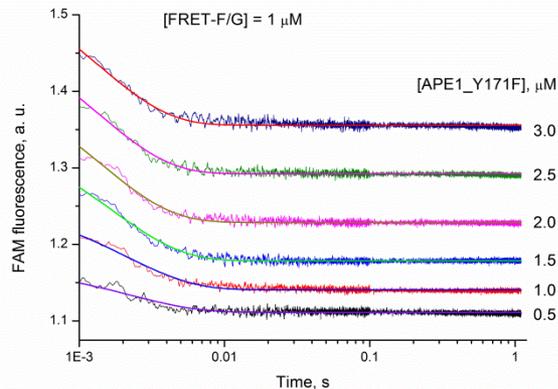
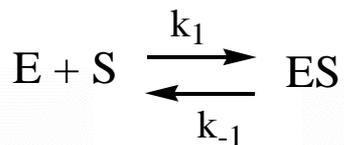


Exo

# Влияние pH на активность Y171F и H309A



# Данные экспериментов кинетики остановленной струи с регистрацией флуоресценции FAM в составе FRET-пары в ДНК-субстрате



## Полученные кинетические параметры и выводы

FRET	$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$k_{-1}, c^{-1}$	$K_s, M^{-1}$	$k_2, c^{-1}$	$k_3, c^{-1}$	$k_{-3}, M^{-1}c^{-1}$	$K_p, M$
Y171F	$(230 \pm 20) \times 10^6$	$140 \pm 20$	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^6$				
H309A	$(160 \pm 60) \times 10^6$	$200 \pm 40$	$(0,8 \pm 0,5) \times 10^6$				
WT	$(350 \pm 40) \times 10^6$	$20 \pm 4$	$(18 \pm 6) \times 10^6$	$2,22 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,02$	$(26 \pm 4) \times 10^6$	$(0,015 \pm 0,003) \times 10^{-6}$
R177A	$(520 \pm 10) \times 10^6$	$75 \pm 7$	$(7 \pm 1) \times 10^6$	$2,36 \pm 0,02$	$8,0 \pm 0,3$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^6$	$(5 \pm 1) \times 10^{-6}$
R181A	$(740 \pm 90) \times 10^6$	$110 \pm 40$	$(7 \pm 3) \times 10^6$	$0,73 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,2$	$(18 \pm 7) \times 10^6$	$(0,08 \pm 0,04) \times 10^{-6}$

Замены Y171F и H309A приводят к резкому снижению AP-эндонуклеазной активности APE1 и значительно более слабому снижению сродства фермента к ДНК-субстрату. Это говорит о критической роли данных остатков в процессе катализа. Зависимость активностей этих мутантных форм от pH близка к соответствующей зависимости для дикого типа APE1, что не подтверждает предполагавшееся ранее участие этих остатков в катализе в депротонированном состоянии и свидетельствует в пользу того, что остатки His-309 и Tyr-171 координируют гидролизуемую фосфатную группу и стабилизируют переходное состояние реакции.

Замены R177A и R181A приводят к значительному облегчению диссоциации фермента из комплекса с продуктом, при этом слабо влияя на связывание с субстратом. Это свидетельствует в пользу того, что функцией данных остатков является стабилизация комплекса APE1 с продуктом AP-эндонуклеазной реакции. Кроме того, замена R181A существенно снижает константу скорости каталитической стадии AP-эндонуклеазной реакции. Также показано, что замены R177A и R181A заметно снижают экзонуклеазную активность APE1, однако не имеют критического значения для субстратной специфичности фермента.