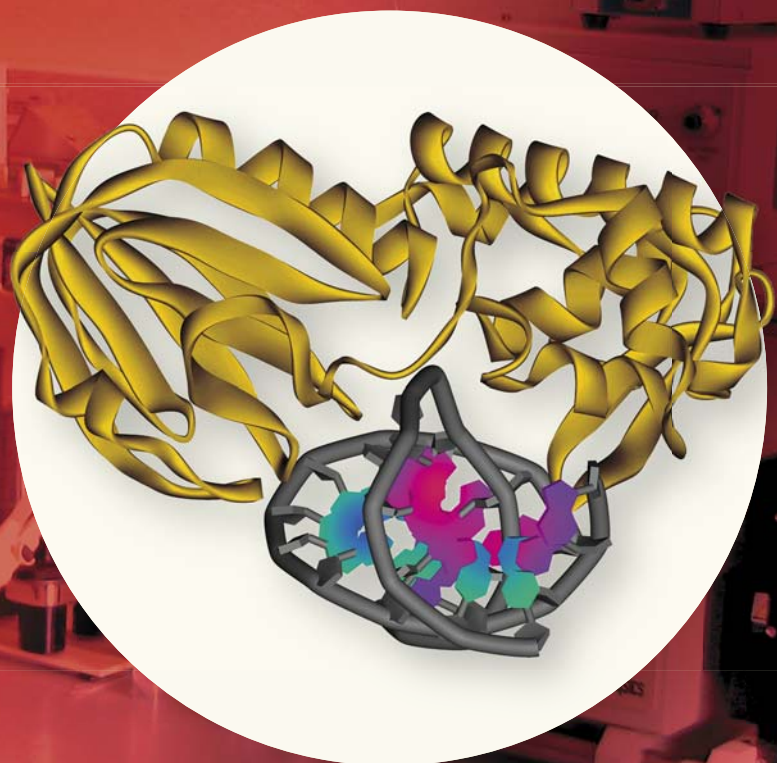


В главной роли – ФЕРМЕНТ



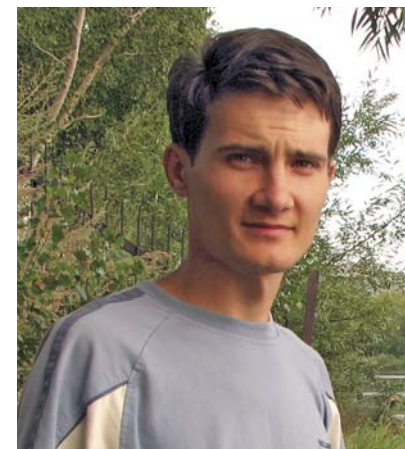
Биохимию любого живого организма можно рассматривать в виде совокупности ферментативных реакций, и это не будет большим преувеличением. Являясь катализаторами белковой природы, ферменты, в отличие от обычных катализаторов, обладают чрезвычайно высокой эффективностью и специфичностью действия. При этом и сам фермент, и вещество, в химическом превращении которого он участвует, представляют собой большие и сложные макромолекулы с изменчивой пространственной структурой. Выявление детального механизма взаимодействия фермента и субстрата имеет большой теоретический и практический интерес, но является трудной и нетривиальной задачей, требующей привлечения широкого спектра самых современных методов исследования

Как происходит взаимодействие молекул фермента и субстрата при ферментативной реакции? Выяснить все детали этого жизненно важного процесса далеко не просто. Фактически исследователи могут иметь в своем распоряжении кристалл либо свободного фермента, либо его комплекса с конечным продуктом реакции. Получить подобный кристалл на каком-то промежуточном этапе ферментативного процесса (к примеру, непосредственно на стадии катализа) практически невозможно.

Конечно, с помощью современных молекулярно-биологических методов из этой ситуации можно найти выход. Например, внести модификацию в субстрат, которая остановит катализ, но не повлияет на его связывание с ферментом, и получить кристалл соответствующего промежуточного комплекса. Однако такими способами можно исследовать лишь ограниченное число состояний фермента и субстрата. Что же касается «бескристалльных» методов определения структуры молекул, таких как ядерный магнитный резонанс (ЯМР), то их использование ограничено из-за трудности интерпретации данных.

Ключевые слова: конформационная динамика, предстационарная кинетика, ДНК-гликозилазы.

Key words: conformational dynamics, pre-steady-state kinetics, DNA glycosylases



КУЗНЕЦОВ Никита Александрович – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории исследования модификации биополимеров Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 30 научных публикаций и 3 патентов



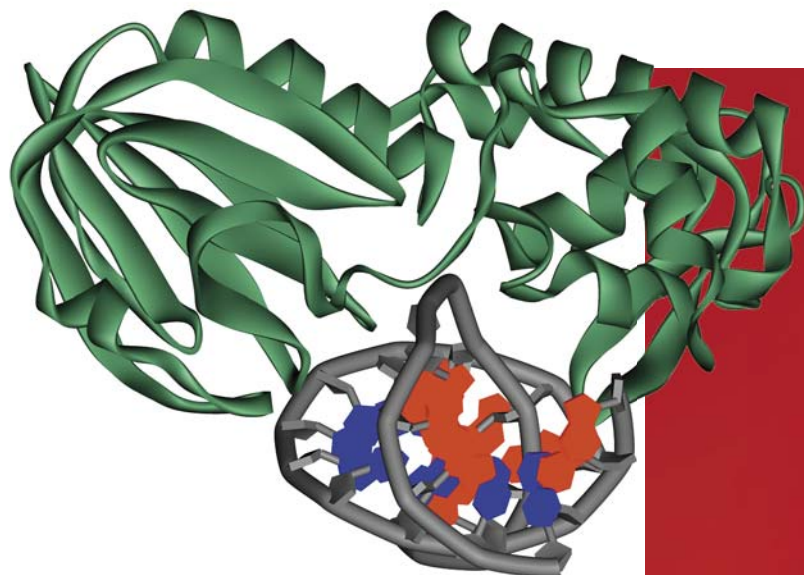
ФЕДОРОВА Ольга Семеновна – профессор, доктор химических наук, заведующая лабораторией исследования модификации биополимеров Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор 135 научных публикаций и 3 патентов

Структурные данные, полученные вышеописанными способами, по сути, представляют собой «мгновенные» снимки конкретных структурных перестроек в молекулах фермента и субстрата. Но для современного уровня научного познания этого уже недостаточно – требуется детальный полнометражный «фильм».

На страже ДНК

Известно, что в живых клетках на постоянной страже находятся десятки ферментов, защищающих генетическую информацию от повреждения. Это связано с тем, что в процессе функционирования клеточная ДНК подвергается негативному воздействию различных физических и химических факторов внешней среды, таких как ультрафиолетовое и радиоактивное излучение, канцерогенные химические вещества и т. д. При этом одними из наиболее агрессивных факторов являются активные формы кислорода, вызывающие так называемые окислительные повреждения ДНК. Подобные повреждения генетического аппарата, обладающие цитотоксическим и мутагенным действиями, способны приводить к развитию сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний.

Клетка «ремонтует» ДНК с помощью специальной системы репарации. Ферменты, входящие в эту систему, способны быстро и точно определить местоположение повреждения среди огромного количества нуклеотидных звеньев, составляющих цепочку ДНК, и инициировать процесс репарации. В поиске поврежденных нуклеотидов молекулы репарационных ферментов могут «перепрыгивать» между разными участками ДНК в составе клеточного ядра или же просто последовательно «утюжить» цепочку ДНК, причем каждый из этих ферментов способен специфически опознавать «свое» повреждение.



Рентгеноструктурные данные для Fpg – одного из ферментов репарации ДНК – подтвердили сведения о скорости и виде структурных перестроек фермента и ДНК-субстрата в процессе ферментативного взаимодействия, полученные при регистрации изменения флуоресценции методом остановленной струи. Слева – кристаллическая структура 1K82 комплекса Fpg с двойной нитью ДНК в базе данных Protein data bank

Изучение механизмов и особенностей действия ферментов репарации ДНК в последнее время вызывает особый интерес – подобные знания могут помочь человечеству в решении проблем раннего старения и лечении болезней, связанных с высоким уровнем образования генетических мутаций.

Флуоресцирующее видео

Регистрировать изменение структуры фермента и ДНК непосредственно в процессе их взаимодействия можно с помощью оптических методов.

Как известно, наиболее интенсивно флуоресцирующей аминокислотой является триптофан – именно он обеспечивает около 90 % всей флуоресценции белков. Поэтому триптофан используют как высокочувствительный флуоресцентный маркер при изучении конформационных изменений в молекулах белков, в том числе ферментов. Если же природных флуоресцентных свойств макромолекул оказывается недостаточно для получения нужной информации, то можно использовать специальные вещества-флуорофоры с хорошими фотофизическими свойствами.

В результате удается провести настоящую «съемку» ферментативного процесса, если в качестве «кинокамеры» использовать так называемые *спектрометры остановленной струи*, которые регистрируют быстрые изменения интенсивности флуоресценции в растворе.

Этим способом в лаборатории исследования модификации биополимеров Института химической биологии

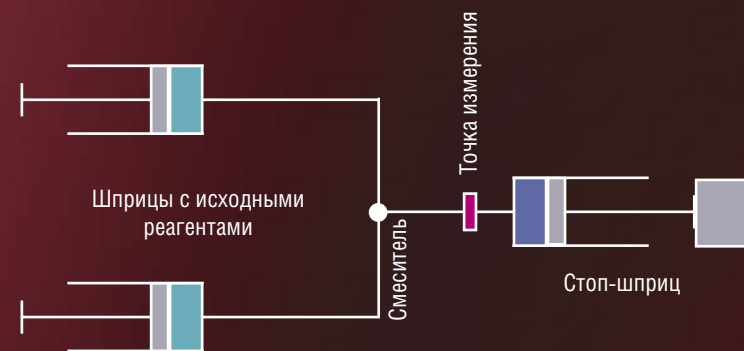
и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) была изучена динамика изменений пространственной организации одного из ферментов репарации ДНК – *формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы* (Fpg) из бактерии *E. coli* – при его взаимодействии с несколькими видами ДНК, содержащими различные поврежденные нуклеотиды (Koval *et al.*, 2010).

В структуре фермента Fpg имеется пять остатков триптофана. Интерпретировать данные, полученные при регистрации динамики флуоресценции триптофана во время ферментативной реакции, помогли рентгеноструктурные данные для этого фермента, находящегося в свободном состоянии и в комплексе с ДНК (Fromme, Verdine, 2002; Gilboa *et al.*, 2002).

В результате новосибирские исследователи установили, что взаимодействие фермента с ДНК-субстратами приводит к конформационным изменениям как в молекуле самого фермента (например, встраивание некоторых его аминокислотных остатков в двойную спираль ДНК), так и в молекуле субстрата.

Тип изменения *конформации* (пространственной организации) фермента зависит от типа взаимодействия с субстратом: неспецифическое либо специфическое связывание и т.д. Было выявлено, как минимум, пять таких конформационных перестроек, каждой из которых удалось соотнести определенные «движения» молекулярной структуры фермента.

Таким способом фермент образует специфические контакты с субстратом, результатом которых является высокоэффективное узнавание и связывание поврежденных участков ДНК.



В основе всех струевых методов исследования быстропротекающих химических реакций лежит быстрое, в течение примерно 1 мс, смешивание взаимодействующих веществ. Слева – принципиальная схема устройства для метода остановленной струи, позволяющего использовать очень малые количества исходных реагентов и широко использующегося в биохимических исследованиях

ОСТАНОВИТЬ МГНОВЕНИЕ

Для того чтобы следить за протеканием ферментативных реакций, идущих за сотые доли секунды, необходимо иметь соответствующие методы и технические устройства.

Еще в 1920-х гг. был разработан первый так называемый *струевой метод*, суть которого в том, что химическая реакция запускается быстрым смешиванием реагентов в проточных условиях (Hartridge, Roughton, 1923). В методе непрерывной струи растворы реагирующих веществ поступают под давлением в смесительную камеру, после чего смешанный раствор с высокой постоянной скоростью идет в трубку, вдоль которой и проводится измерение концентраций. «Возраст» смеси (т.е. время от начала ферментативной реакции) определяют по расстоянию от смесительной камеры до точки наблюдения. К сожалению, количество исходных веществ при этом измеряется литрами, а ферменты – продукт труднодоступный и дорогой.

В 1930—50-х гг. были предложены две модификации этого метода (Roughton, Millikan, 1936; Chance, 1940; 1948). В методе «ускоренной струи» растворы реагирующих веществ помещают в шприцы, поршни которых приводят в движение резким толчком, а наблюдение осуществляется в фиксированной точке вблизи смесительной камеры. Скорость течения жидкости в данном случае меняется с ускорением, поэтому даже в одной точке удается исследовать растворы разного «возраста». Метод позволяет использовать весьма малые (до 0,1 л) объемы реагирующих веществ.

В методе остановленной струи раствор после смешивания поступает в трубку, заканчивающуюся поршнем. Раствор давит на поршень и перемещает его до того момента, пока

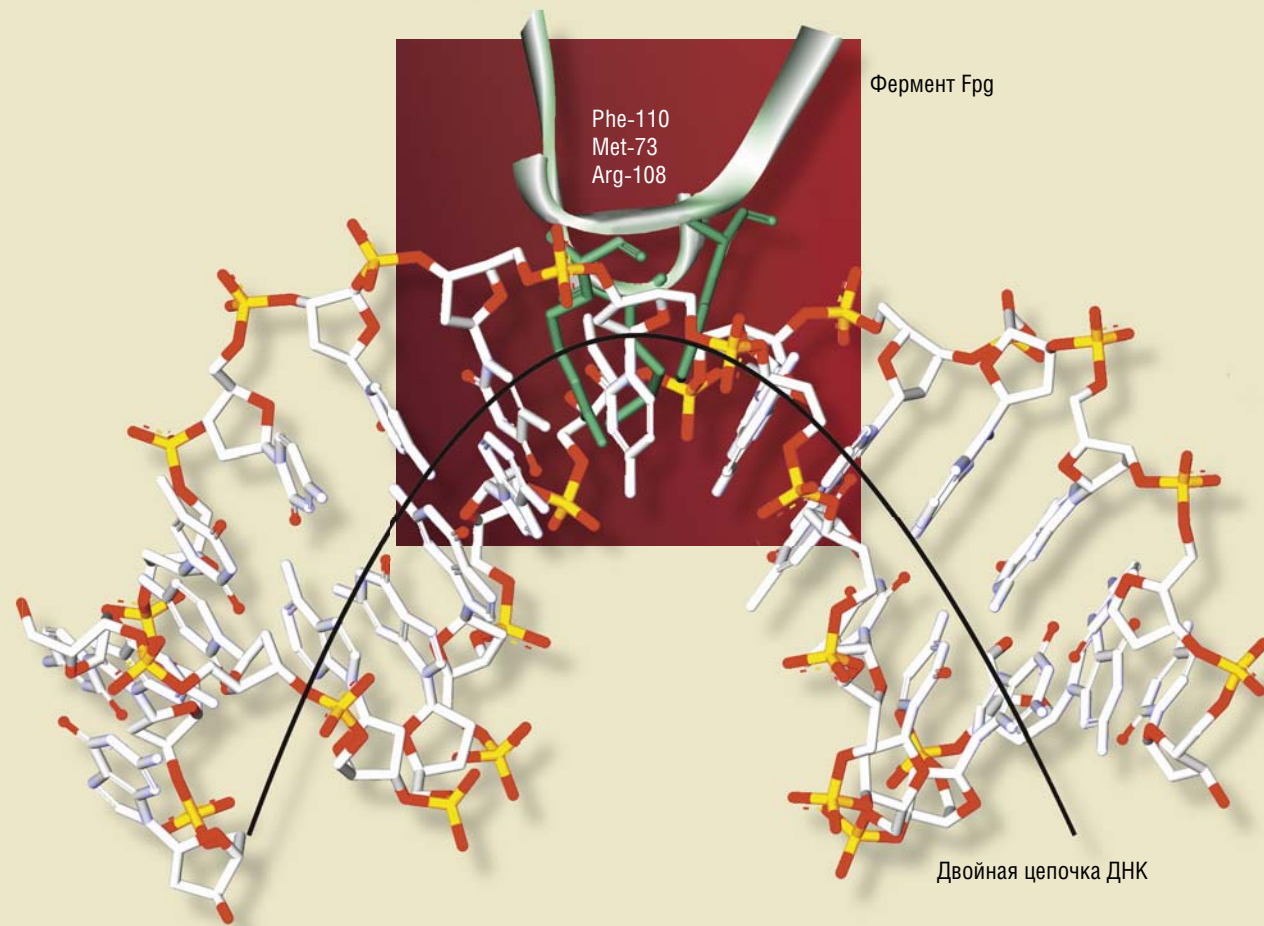
поршень не упрется в ограничитель, в результате чего поток останавливается. Регистрация концентраций проводится в какой-либо фиксированной точке, при этом временная развертка регистрируемого параметра дает кинетическую кривую ферментативной реакции в интервале от миллисекунд до нескольких минут.

Этот метод, впервые предложенный в 1934 г. для реакций с временем около 10 с, был затем усовершенствован для измерения времени порядка нескольких миллисекунд, а затем и для существенно меньшего (Gibson, 1952).

Сейчас зарубежные компании производят ряд приборов для измерения быстропротекающих химических процессов, в том числе основанных на методе остановленной струи, которые требуют использования небольших количеств тестируемых веществ. Поэтому этот метод нашел широкое распространение в биохимических исследованиях.

В Новосибирском научном центре установки для изучения струевыми методами химических радикальных реакций были созданы еще в 1960—70-е гг. в Институте химической кинетики и горения СО АН СССР. Однако они требовали больших расходов реагентов и не могли быть использованы для исследования таких молекул, как ферменты и нуклеиновые кислоты.

В наши дни в новосибирском Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН с помощью струевых методов проводится комплексное кинетическое исследование закономерностей функционирования защитно-репарационных систем живых организмов. Для этого используются спектрометры остановленной струи производства *Applied Photophysics* (Англия)



На одной из стадий «работы» фермента репарации Frg в поврежденную ДНК встраиваются аминокислотные остатки (Met-73, Arg-108 и Phe-110) белковой молекулы фермента. При этом рибозо-фосфатный остов ДНК изгибается, выворачивая поврежденное основание ДНК в активный центр фермента. Вверху – кристаллическая структура комплекса ДНК с ферментом Frg в активном состоянии. Данные рентгеноструктурного анализа из базы PDB, код структуры – 1K82

Взгляд с другой стороны

Все вышесказанное относилось к самому ферменту, а что же при этом происходит с субстратом?

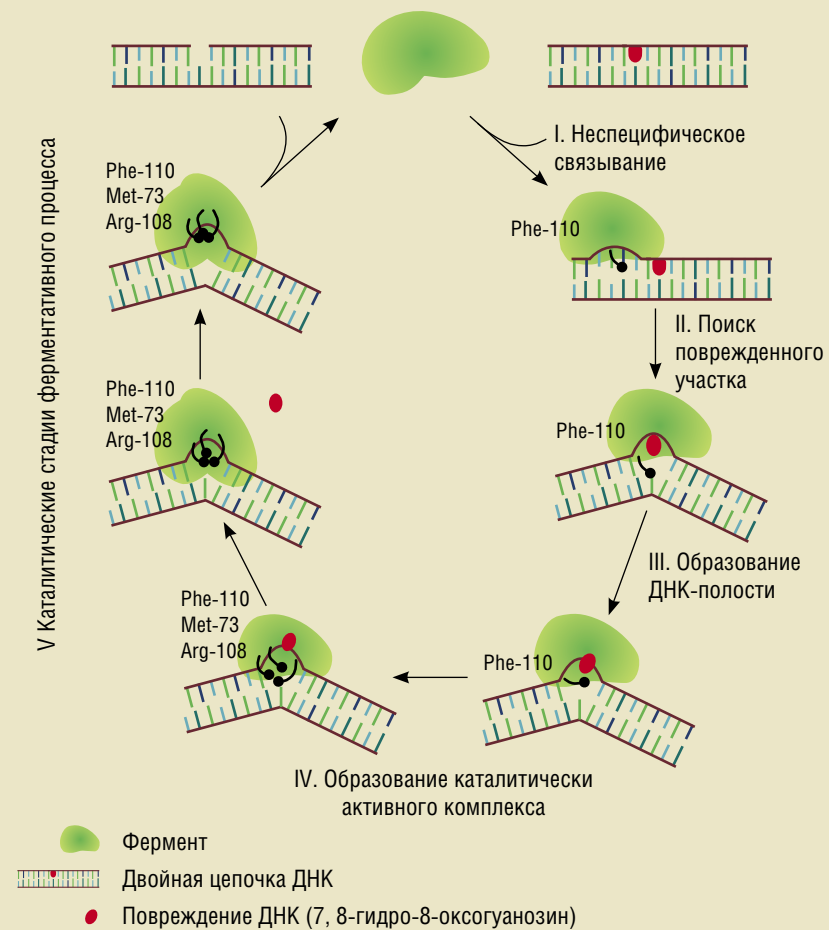
Для регистрации конформационных изменений субстрата в его структуру была встроена флуоресцентная «метка» – 2-аминопурин. Фактически «снялась» та же сцена, что и в предыдущем случае, но уже с другим «главным героем».

Для получения более полной картины в структуру ДНК-субстрата были также введены дополнительно

две «метки» – флуорофор и так называемый *тушитель* (гаситель флуоресценции), позволяющие зарегистрировать изгибание молекулы субстрата методом *резонансного переноса энергии флуоресценции* (FRET).

В итоге в распоряжении исследователей оказалось два «видео-ролика», описывающих поведение флуоресцирующих элементов фермента и ДНК-субстрата, что оказалось вполне достаточным для детального описания процесса взаимодействия фермента с ДНК. В результате удалось установить взаимные конформационные переходы в процессе ферментативного взаимодействия и выяснить, в какой последовательности и с какой скоростью протекают различные стадии процесса.

Эти заключения были подтверждены с помощью других аналитических методов, таких как метод быстрого прерывания реакции, позволяющий точно определить, в какой момент времени и с какой скоростью происходит образование продуктов реакции, а также метода масс-спектрометрии, с помощью которого удалось подтвердить образование ключевых промежуточных продуктов ферментативного процесса.



Таким образом, с помощью современных физико-химических методов удалось охарактеризовать природу конформационных переходов, происходящих на стадии образования фермент-субстратных комплексов, которые в конечном итоге приводят к формированию каталитически активного состояния одного из важнейших ферментов репарации ДНК.

Подобные сведения очень важны для понимания того, каким образом у живых организмов организован процесс сохранения наследственной информации и поддерживается стабильность генома. В целом же это исследование служит хорошим примером того, как использование методов быстрой кинетики позволяет глубже проникнуть в суть механизмов ферментативных реакций и понять, каким образом в природе происходит высокоспецифическое узнавание и селективное превращение одних молекул в другие.

Литература

- Колдин Е. Быстрые реакции в растворе. М.: Мир, 1966.
 Chance B. The enzyme-substrate compounds of catalase and peroxides // Nature. 1948. Vol. 161(4102). P. 914–917.
 Koval V. V., Kuznetsov N. A., Ishchenko A. A. et al. Real-time studies of conformational dynamics of the repair enzyme *E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase and its DNA complexes during catalytic cycle. Mutation Res. // Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2010. Vol. 685. P. 3–10.

На примере взаимодействия фермента репарации Frg с поврежденной ДНК, содержащей один окисленный нуклеотид, можно схематически описать пять первых стадий кинетического механизма ферментативного процесса. Сначала происходит неспецифическое связывание фермента. Затем фермент с помощью аминокислотного остатка Phe-110 встраивается между парами гетероциклических оснований и идет по цепи ДНК как плаг в борозде, тестируя ее на наличие поврежденного участка. В том случае, когда фермент опознает повреждение, происходит третья стадия процесса – выворачивание поврежденного основания. В результате в двойной нити ДНК образуется полость, в которую встраиваются еще два аминокислотных остатка фермента (Met-73 и Arg-108). После этого происходит подстройка конформации активного центра фермента и осуществление каталитических стадий процесса, заканчивающихся удалением поврежденного участка из цепочки ДНК. Стадией, лимитирующей скорость всего процесса, является распад соединения между ферментом и остатком рибозы, получающимся при разрезании цепи рибозофосфатного остова ДНК с двух сторон от поврежденного нуклеотида

Работа поддержана Президентским грантом МК 1304.2010.4, грантом РФФИ № 10-04-00070, госконтрактом 02.740.11.0079, интеграционными проектами СО РАН № 28 и 48