

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
Лаборатория генетических технологий

На правах рукописи

СЕНЧУРОВА СВЕТЛАНА ИГОРЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Кинетические механизмы безматричного синтеза
нуклеиновых кислот ДНК-полимеразами семейства X

Направление подготовки	1.5 Биологические науки
Специальность	1.5.4 Биохимия

Аспирант Сенчулова С.И.

Научный руководитель чл.-корр. РАН Кузнецов Н.А.

Новосибирск – 2025

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Двухцепочечные разрывы (ДЦР) ДНК являются наиболее опасным типом повреждений ДНК, поскольку они могут привести к потере крупных хромосомных участков. Для поддержания жизнеспособности клетки должны эффективно устранять такие повреждения при помощи специализированных систем репарации. Существует два основных пути репарации ДЦР: гомологичная рекомбинация и нехомологичное соединение концов ДНК (NHEJ). NHEJ является преобладающим путем восстановления ДЦР на протяжении всего клеточного цикла и считается основным путем репарации ДЦР за пределами фаз S и G2 [1, 2]. В отличие от гомологичной рекомбинации, которая требует наличия гомологичной последовательности для восстановления утраченного участка, NHEJ функционирует без использования матрицы и потому является универсальным и наиболее быстрым механизмом репарации [3]. В ходе NHEJ происходит ряд событий, включающий распознавание разрыва белками Ku70/80 и привлечение других ферментативных компонентов NHEJ, состоящих из ДНК-полимераз (Pol μ , TdT, Pol λ), нуклеазы (комплекс Artemis·DNA-PKcs) и лигазы (комплекс XLF·XRCC4·Lig4) [4].

Одним из физиологических источников ДЦР является V(D)J-рекомбинация, в ходе которой повышается разнообразие антигенсвязывающих участков иммуноглобулинов из В-лимфоцитов и Т-клеточных рецепторов. Рекомбиназный белковый комплекс RAG формирует двухцепочечные разрывы в участках генов иммуноглобулинов или Т-клеточных рецепторов, после чего белки NHEJ восстанавливают разрывы [5–9]. Одним из уникальных участников данного процесса выступает терминальная дезоксирибонуклеотидил трансфераза (TdT), относящаяся к структурному семейству X ДНК-полимераз [10]. В отличие от большинства известных матрица-зависимых ДНК-полимераз, TdT не нуждается в матричной цепи и катализирует присоединение «случайных» 2'-дезоксирибонуклеотидов к свободным 3'-концам ДНК генных сегментов, обеспечивая разнообразие возможных вариантов рецепторов, что в конечном итоге является фундаментальной основой адаптивного иммунитета [10]. Хотя исследования *in vitro* показали, что TdT может включать все четыре природных нуклеотида в одноцепочечную ДНК, *in vivo* наблюдается явное предпочтение включения dGMP и dCMP по сравнению с dAMP или dTMP [11–15].

Пространственная организация TdT имеет значительное сходство с матрично-зависимыми ДНК-полимеразами благодаря наличию типичных для ДНК-полимераз структурных мотивов: субдомена «большого пальца», «пальцев» и «ладони», а

каталитический центр TdT также содержит два иона металла-кофактора [16]. Эта особенность согласуется с предложенным механизмом двух двухвалентных ионов металла [17], связанным со всеми идентифицированными в настоящее время полимеразы [18]. В соответствии с данной моделью, ион «А» обеспечивает активацию 3'-ОН-группы терминального нуклеотида праймера, позволяя ему инициировать нуклеофильную атаку на α -фосфат, тогда как ион «В», связанный с входящим dNTP, играет ключевую роль в стабилизации образующегося пирофосфата (PPi). Координация обоих ионов достигается за счет атомов кислорода в структуре dNTP и карбоксильных групп трех аминокислотных остатков - D343, D345 и D433 [16]. В качестве ионов двухвалентных металлов TdT способен использовать широкий спектр ионов таких как Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} и Zn^{2+} . Анализ активности TdT *in vitro* показал, что природа иона металла кофактора влияет на скорость включения трифосфатов ферментом [19, 20].

Уникальной чертой архитектуры фермента является наличие структурного элемента Loop1, расположенного в субдомене «ладони» [11]. Эта петля заполняет пространство, в котором у матрица-зависимых полимераз располагается матричная ДНК. В результате в активном центре TdT отсутствует возможность корректного выравнивания по комплементарной цепи, а координация входящего dNTP и 3'-конца праймера обеспечивается контактами с аминокислотными остатками dNTP-связывающего кармана. Формирование кармана обеспечивают гидрофобные (W449, F404, L397), и гидрофильные аминокислотные остатки (R336, H342, D395, E456, R453, R457), которые создают специфическую систему контактов, стабилизирующих входящий нуклеотид и 3'-конец ДНК [21,22]. Эти особенности делают TdT единственной известной у человека полимеразой, функционирующей полностью в матрица-независимом режиме.

Благодаря уникальной способности вести безматричный синтез ДНК, TdT широко используется в клинической и биотехнологической сфере. Одним из наиболее распространенных применений TdT является «маркировка» терминального 3'-конца ДНК различными нуклеотидными аналогами, такими как флуоресцентные меченые нуклеотиды в качестве химических репортеров и химически модифицированные нуклеотиды для повышения устойчивости к нуклеазам [23]. TdT также применяется в методах обнаружения небольших количеств ДНК и РНК при поиске вирусов и диагностике генетических заболеваний. Одним из перспективных направлений биотехнологического применения TdT является ферментативный синтез олигонуклеотидов. В настоящее время основным методом синтеза олигонуклеотидов является фосфорамидитный метод, имеющий ряд недостатков:

возможность синтеза олигонуклеотидов только относительно небольшой длины (< 300 нуклеотидов), использование безводных растворителей и образование токсичных и легковоспламеняемых отходов. В то же время ферментативный синтез олигонуклеотидов избавляет от этих недостатков поскольку позволяет повысить выход и синтезировать более длинные цепи ДНК, при этом реакция протекает в более мягких водных условиях.

Несмотря на то, что клеточные функции TdT изучены достаточно подробно, остаётся актуальной задача анализа структурно-функциональных характеристик фермента и выявления роли отдельных аминокислотных остатков в обеспечении матрица-независимого синтеза ДНК. Использование кинетических подходов анализа ферментативных свойств фермента и сайт-направленный мутационный анализ позволяют оценить роль отдельных аминокислотных остатков в формировании активного центра, стабилизации тройного каталитического комплекса и обеспечении специфичности фермента по отношению к входящим dNTP.

Целью данной работы являлось определение молекулярных основ субстратной специфичности TdT человека по отношению к входящим dNTP путем мутационного и кинетического анализа функциональной роли ряда аминокислотных остатков dNTP-связывающего кармана.

В ходе исследования решались следующие **задачи**:

- 1) Провести функциональный анализ аминокислотных остатков R336, H342 и D345, входящих в состав dNTP-связывающего кармана TdT человека и участвующих во взаимодействии с фосфатными группами входящего dNTP и 3'-концевого участка ДНК-праймера.
- 2) Определить роль аминокислотных остатков L397, F400 и F404, формирующих гидрофобный участок dNTP-связывающего кармана, и остатка D472, обеспечивающего стабильность активного центра TdT и поддержание закрытой конформации фермента, в процессах связывания ДНК-праймера, входящего dNTP и каталитической реакции присоединения нуклеотида
- 3) Провести мутационный и кинетический анализ влияния одиночных и двойных замен аминокислотных остатков D395 и E456, образующих сеть водородных связей с азотистым основанием входящего dNTP, на субстратную специфичность, процессивность и каталитическую эффективность фермента.

Научная новизна и практическая значимость работы:

В данной работе был проведён систематический функциональный анализ аминокислотных остатков активного центра TdT человека R336, H342, D345, L397, F400, F404, D472, D395 и E456. Установлена роль данных остатков в процессах связывания ДНК и dNTP, а также их влияние на эффективность элонгации ДНК. Полученные результаты выявили, что остатки D395 и E456 оказывают значительное влияние на субстратную специфичность фермента по отношению к входящему dNTP. Установлено, что замены D395N и E456N приводят к увеличению эффективности включения природных dNTP до 70 раз, что может быть применено для увеличения эффективности TdT как катализатора для биотехнологического применения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активность TdT человека подвергается сложному многопараметрическому контролю как на стадии связывания dNTP в активном центре, так и на стадии каталитического присоединения входящего нуклеотида к растущей цепи. В свою очередь, на оба этих этапа влияет и природа входящего нуклеотида, вызывающего последовательные конформационные перестройки в ферменте, и общий эффект нейтрализации заряда и расширения внутреннего объема в dNTP-связывающем кармане, и природа ионов-кофакторов. Сочетание этих факторов позволяет гибко регулировать переключение между дистрибутивным и процессивным типом удлинения праймеров и обеспечивает эффективное выполнение биологической функции TdT при достраивании концов ДНК в процессе V(D)J-рекомбинации.

Личное участие автора: Автором проведено получение генетических конструкций для индукции мутантных форм TdT человека, наработка клеточной массы и очистка мутантных форм TdT. Лично автором выполнен анализ активности всех полученных мутантных форм, проведена обработка и интерпретация экспериментальных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растворы и реагенты

В работе были использованы: акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония, N,N,N,N-Тетраметилэтилендиамин (TEMED), мочеви́на, борная кислота, трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, сульфат никеля, имидазол, глицерин, дитиотриетол (DTT), агар, триптон, дрожжевой экстракт, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), соляная кислота, гидроксид калия, гидроксид натрия, ацетон, LiClO₄, персульфат аммония, бычий сывороточный альбумин (БСА).

Плазмида на основе вектора pET-28с, несущая ген TdT человека была любезно предоставлена Кузнецовой А.А. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск).

В работе были использованы олигонуклеотиды, приведенные в Таблица 1. В качестве ДНК-праймера для определения подвижности комплекса TdT : ДНК-праймер в неденатурирующем геле был использован 44-звенный FAM-меченный олигонуклеотид FAM-M44. Для регистрации накопления продуктов включения рибо- и 2'-дезоксирибонуклеотидов в полиакриламидном геле был использован FAM-меченный олигодезоксирибонуклеотид FAM-M6. Предстабионарный кинетический анализ взаимодействия фермента с ДНК проводили с использованием немеченого ДНК-праймера M6.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Сокращение	Последовательность
FAM-M44	5' FAM-ATGCTATGGATTGATGTGACTAAGGTTGGAATGATGTGAAGAGA 3'
FAM-M6	5' FAM-GGAAGA 3'
M6	5' GGAAGA 3'

Создание генетических конструкций, несущих мутантные формы TdT и C-TdT

Точечные мутации в гене TdT были получены методом сайт-направленного мутагенеза, который осуществлялся по стандартной методике. Для этого были синтезированы ДНК-праймеры, приведенные в Таблица 2. Продукты амплификации разделяли в 1%-агарозном геле и обрабатывали эндонуклеазой рестрикции M_{all}I для удаления матричной плазмиды. После чего трансформировали электрокомпетентные или хемикомпетентные клетки *E. coli* штаммов Emax или XL1Blue. Выделение плазмид

осуществляли с помощью набора реагентов для выделения плазмидной ДНК (ДИАЭМ, Россия). Наличие необходимых замен подтверждали секвенированием.

Таблица 2. Праймеры для сайт-направленного мутагенеза

Мутантная форма	Последовательность
R336Q	5'-GCTGTACAAAAGATCTCCAGTATT G TTGTCAGAGAAGAACCACTTTAAAC-3' 5'-GTTTAAAGTGGTTCCTCTCTGACA A CAATACTGGGAGATCTTTTGTACAGC-3'
H342A	5' GATGGGGCATGATGTAGAAATTTTAATTACCAGCCCAGG 3' 5' CCTGGGCTGGTAATTA AAAAAT T CTACATCATGCCCCATC 3'
D345E	5' CCGGAGGGGTAAAGAAGATGGGG G CCGATGTAGATTTTTTAATTACCAGCCC 3' 5' GGGCTGGTAATTA AAAAATCTACAT C GGCCCCCATCTTCTTACCCCTCCGG 3'
D395E	5'-GTTGCCTAGCAGGAAGGTT G AAGCTTTGGATCATTTTC-3' 5'-GAAAATGATCCAAAGC T CAACCTTCCTGCTAGGCAAC-3'
D395K	5'-CAGGTTGCCTAGCAGGAAGGTT A AAGCTTTGGATCATTTTC-3' 5'-GAAAATGATCCAAAGC T TAACCTTCCTGCTAGGCAACCTG-3'
D395N	5'-GTTGCCTAGCAGGAAGGTT A ATGCTTTGGATCATTTTC-3' 5'-GAAAATGATCCAAAGC A TTAACCTTCCTGCTAGGCAAC-3'
E456Q	5'-CTGGCTCCCGGCAGTTT C AGAGAGACCTCCGGCGCTATG-3' 5'-CATAGCGCCGGAGGTCTCT C TGAAACTGCCGGGAGCCAG-3'
E456N	5'-CTGGCTCCCGGCAGTTT A ATAGAGACCTCCGGCGCTATG-3' 5'-CATAGCGCCGGAGGTCTCT A TTAAACTGCCGGGAGCCAG-3'
L397A	5' GCCTAGCAGGAAGGTTGATGCT G CGGATCATTTTCAAAAGTGC 3' 5' GCACTTTTGAAAATGATCC G CAGCATCAACCTTCCTGCTAGGC 3'
F400A	5' GCAGGAAGGTTGATGCTTTGGATCAT G CTCAAAAGTGCTTTCTG 3' 5' CAGAAAGCACTTTTG A GCATGATCCAAAGCATCAACCTTCCTGC 3'
F404A	5' GGATCATTTTCAAAAGTG C GCTCTGATTTTCAAATTGCCTCGTCAAAG 3' 5' CTTTGACGAGGCAATTTGAAAATCAG A GCGCACTTTTGAAAATGATCC 3'
F404W	5' GGATCATTTTCAAAAGTG T GGCTGATTTTCAAATTGCCTCGTCAAAG 3' 5' CTTTGACGAGGCAATTTGAAAATCAG C CAGCACTTTTGAAAATGATCC 3'
D472A	5' GAGCGGAAGATGATTCTGG C TAAACCATGCTTTATATGAC 3' 5' GTCATATAAAGCATGGT T AGCCAGAATCATCTTCCGCTC 3'

Наработка и очистка препаратов белка TdT дикого типа и мутантных форм

Фермент TdT и его мутантные формы были выделены из клеток *E. coli* штамма Acrtic (DE3), трансформированных плазмидой pET-28с, содержащей гены вариантов TdT. Культуру клеток выращивали в среде 2YT (1 л), содержащей 50 мкг/мл канамицина, 20 мкг/мл гентамицина и 10 мкг/мл тетрациклина при 37°C до оптической плотности 0,55-0,65 при длине волны 600 нм. После достижения необходимой оптической плотности клетки

охлаждали на льду, добавляли ИПТГ до концентрации 0,2 мМ и инкубировали в течение 24 ч при 16°C. Далее клетки осаждали центрифугированием (4 000 об./мин, 10 мин) и ресуспендировали в 20 мл лизис-буфера (20 мМ HEPES-KOH, pH 7,8, 40 мМ NaCl). Клетки лизировали при помощи френч-пресса. Лизат центрифугировали (40 000 об./мин, 40 мин), к супернатанту добавляли NaCl до концентрации 500 мМ и имидазол до концентрации 30 мМ и наносили на колонку I (HiTrap-Ni-Helating). Хроматографию проводили в градиенте имидазола 30 → 600 мМ (Буфер А – 20 мМ HEPES-KOH, pH 7,8, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазол; Буфер Б – 20 мМ HEPES-KOH, pH 7,8, 500 мМ NaCl, 600 мМ имидазол). Фракции, содержащие целевой белок, разбавляли 20 мМ HEPES-KOH, pH 7,8 до концентрации NaCl 200 мМ и наносили на колонку II (HiTrap-Heparine). Хроматографию проводили в градиенте NaCl 200 → 1000 мМ (Буфер А – 20 мМ HEPES-KOH, pH 7,8, 200 мМ NaCl; Буфер Б – 20 мМ HEPES-KOH, pH 7,8, 1000 мМ NaCl). Чистоту белка проверяли методом гель-электрофореза по Леммли. Концентрацию определяли по методу Бредфорда, а также по оптической плотности при длине волны 280 нм.

Спектры кругового дихроизма (КД-спектры)

КД-спектры для белка TdT дикого типа и мутантных форм были зарегистрированы на спектрометре Jasco J-600 (Jasco, Токуо, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм. Концентрация белков в кювете составляла 2 мкМ. Эксперименты проводили в буфере 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, MgCl₂ 5 мМ при 25°C. Спектры были получены при ширине полосы пропускания 1.0 нм. Проводили не менее 15 сканирований, которые затем автоматически усреднялись.

Измерение температуры плавления (T_m)

Температуру плавления T_m измеряли при помощи QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Каждый образец содержал белок в концентрации 10 мкМ, 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, MgCl₂ 5 мМ а так же 5X красителя ProteOrange (Lumiprobe, Moscow, Russia). Температуру постепенно повышали с 25,0°C до 99,9°C шагом 0,015°C/с. Длина волны возбуждения красителя ProteOrange составляла 470 нм, длина волны испускания 588 нм. Для каждого белка были зарегистрированы по три кривые изменения интенсивности флуоресценции ProteOrange, которые были усреднены и нормализованы. Значение T_m здесь и далее было рассчитано в программном обеспечении OriginPro 15.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA) при помощи сигмовидного уравнения Больцмана:

$$F = F_u + (F_b - F_u) / [1 + \exp(T_m - T/k)] \quad (1)$$

где F – интенсивность флуоресценции ProteOrange, F_u – интенсивность флуоресценции ProteOrange при начальной температуре, F_b – интенсивность флуоресценции ProteOrange при максимальной температуре, T_m – температура плавления, T – температура, k – крутизна кривой.

Связывание ДНК-праймера

Для определения константы связывания TdT WT и мутантных форм с одноцепочечным ДНК-праймером был использован метод разделения в неденатурирующем полиакриламидном геле. Для эффективного разделения несвязанного ДНК-праймера и комплекса TdT с ДНК-праймером использовали олигонуклеотид FAM-M44 (Таблица 1). Белки последовательно разбавляли в реакционном буфере, содержащем 50 mM Tris-HCl pH 8,0, MnCl₂ 5 mM, 7% глицерин. Далее к ним был добавлен равный объем 1 мкМ FAM-M44 в том же реакционном буфере. Пробы выдерживали 10 мин. при 37°C затем 5 мин. при 0°C (на льду) после чего наносили на неденатурирующий 10% ПААГ (75:1) в 0,5×TBE. Гель-электрофорез проводили в течение 40 мин. при 150 В при 4°C. Полученные гели визуализировали в гель-документирующей системе VersaDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA). Степень образования комплекса белков с ДНК определяли в программе Gel-Pro Analyzer.

Расчет константы диссоциации комплекса фермента с ДНК проводили по уравнению:

$$\text{Доля комплекса (\%)} = F_u + (F_b - F_u) / (1 + (K_d/[E_0])h) \quad (2)$$

где F_u – вклад фона, F_b – интенсивность полосы, соответствующей комплексу TdT с ДНК, K_d – константа диссоциации комплекса TdT с ДНК, E_0 – начальная концентрация фермента, h – коэффициент Хилла.

Связывание dNTP

Для определения эффективности связывания TdT WT и его мутантных форм с dNTP использовали флуоресцентно-меченный нуклеозидтрифосфат Flu-dUTP, как описано ранее [24]. Влияние внесенных замен на связывание TdT с флуоресцентно меченным Flu-dUTP проводили при помощи системы Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) с использованием стандартных капилляров. Каждую точку на кривых титрования определяли путем измерения интенсивности флуоресценции индивидуальных растворов (16 мкл), содержащих Flu-dUTP (0,5 мкМ) и фермент (0,05–15 мкМ) в буфере 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM MgCl₂ при 37°C.

Расчет константы диссоциации комплекса фермента с dNTP проводили по уравнению:

$$F = F_u + (F_b - F_u)/(1+(K_d/[E_0])^h) \quad (3)$$

где F – интенсивность флуоресценции Flu, F_u – интенсивность флуоресценции Flu в отсутствии фермента, F_b – максимальная интенсивность флуоресценции Flu в комплексе с ферментом, K_d – константа диссоциации комплекса TdT с Flu-dUTP, E_0 – начальная концентрация фермента, h – коэффициент Хилла.

Анализ каталитической активности

Анализ накопления продуктов присоединения природных нуклеотидов hTdT в предстационарном режиме проводили методом разделения продуктов в полиакриламидном геле. Реакцию проводили в 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM MnCl₂ при 37°C. Реакцию инициировали смешением равных объемов 2 мкМ hTdT с раствором, содержащим 4 мкМ dNTP и 2 мкМ ДНК-праймера (FAM-M6). Из реакционной смеси отбирали аликвоты объемом 10 мкл в разных временных точках. Ферментативную реакцию останавливали добавлением равного объема стоп-раствора (9 M мочевины, 25 mM ЭДТА, 0,1% ксиленианол, 0,1% бромфеноловый синий). Остановку реакции во временных точках до 10 с проводили при помощи KinTek RQF-3 QuenchFlow (KinTek Corp., Snow Shoe, PA, USA). Далее реакционную смесь наносили на денатурирующий 20% ПААГ. Электрофорез проводили при напряжении 300 В в течение 5 часов. Степень образования и расходования $n+1$ продукта реакции определяли по отношению площадей пика $n+1$ продукта к сумме площадей пиков всех продуктов и пика исходного олигонуклеотида в программе Gel-Pro Analyzer. Наблюдаемые константы скорости накопления и расходования продукта $n+1$ рассчитывали по уравнению:

$$y = A_1 [1 - \exp(-k_1 t)] + A_2 [1 - \exp(-k_2 t)] \quad (4)$$

где A_i – амплитуда, k_i – наблюдаемые константы скорости накопления и расходования продукта $n+1$, t – время.

Анализ включения dεATP (Chemgenes corp., Wilmington, MA, USA) в растущую цепь проводили в реакционном буфере 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM MnCl₂ при 37°C. Реакцию инициировали смешением 50 мкл 0,1 – 8 мкМ hTdT с 50 мкл раствора, содержащим 6 мкМ dεATP и 2 мкМ FAM-M6. Далее пробы анализировали описанным выше способом. Наблюдаемую константу скорости включения первого нуклеотида k_{obs} рассчитывали по **ур. 4**. Для оценки каталитической константы скорости k_{pol} и константы диссоциации K_d зависимость наблюдаемой константы скорости k_{obs} от концентрации TdT WT и мутантной формы TdT D395N/E456N была обработана уравнением:

$$k_{obs} = K_d \times k_{pol} \times [TdT] / (K_d \times [TdT] + 1) \quad (5)$$

где k_{obs} – наблюдаемая константа скорости включения первого нуклеотида, k_{pol} – каталитическая константа скорости, $[TdT]$ – концентрация фермента, K_d – константа диссоциации $d\epsilon ATP$.

Предстационарный кинетический анализ

Для установления влияния внесенных аминокислотных замен на стадии связывания и катализа присоединения $d\epsilon ATP$ или $dC^{Py}TP$ к ДНК были получены кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции (ϵA и C^{Py} , соответственно) при помощи метода остановленного потока на приборе SX.20 (Applied Photophysics, Leatherhead, Surrey, UK). Спектрофлуориметр остановленного потока SX.20 оснащен ксеноновой лампой в качестве источника возбуждения. Мертвое время прибора составляет 1,3 мс. Каждую кинетическую кривую усредняли не менее чем по трем независимым экспериментам. Длина волны возбуждения флуоресценции λ_{ex} для ϵA составляла 316 нм, для C^{Py} 340 нм, интегральную интенсивность флуоресценции регистрировали на длинах волн более $\lambda_{em} > 370$ нм (светофильтр LG-370-F, Corion, США).

Предстационарный кинетический анализ взаимодействия фермента с ДНК проводили с использованием немеченого ДНК-праймера М6 (Таблица 1) либо в его отсутствии при 37°C в реакционном буфере 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0 и 1 мМ $MnCl_2$. Концентрация праймера М6 составляла 1 мкМ, концентрация $d\epsilon ATP/dC^{Py}TP$ — 3 мкМ, а концентрация ферментов варьировалась от 1 до 6 мкМ. Для расчета наблюдаемых констант скорости, характеризующих изменение интенсивности флуоресценции, использовали уравнение:

$$F = F_0 + A_1 \times \exp(k_1 \times t) + A_2 \times \exp(k_2 \times t) + A_3 \times \exp(k_3 \times t) \quad (6)$$

где F – экспериментальное значение флуоресценции, F_0 – значение фоновой флуоресценции, A_i – амплитуда изменения флуоресценции, k_i – наблюдаемая константа скорости.

Для расчета констант скорости конформационных переходов, зарегистрированных при взаимодействии TdT с ДНК и dNTP, полученные концентрационные серии кинетических кривых анализировали с использованием DynaFit 4.0 (BioKin, Pullman, WA, USA) [25].

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выбор аминокислотных остатков активного центра

Активный центр TdT человека обладает высокоорганизованной архитектурой, в которой ключевое значение имеют гидрофобные и гидрофильные остатки, формирующие dNTP-связывающий карман. В ходе данной работы проведен анализ архитектуры dNTP-связывающего кармана TdT человека, который позволил отобрать несколько потенциально важных аминокислотных остатков активного центра. Ключевую роль в координации ионов металлов, необходимых для активации 3'-ОН-группы праймера, ориентации входящего dNTP и стабилизации 3'-концевого нуклеотида праймера при отсутствии комплементарного основания ДНК-матрицы, играют остатки R336, H342 и D345. Остатки L397, F400 и F404 участвуют в формировании гидрофобного участка dNTP-связывающего кармана и, по-видимому, необходимы для правильного позиционирования входящего нуклеотида и 3'-концевого нуклеотида праймера. Остаток D472 расположен вне dNTP-связывающего кармана в SD2-регионе TdT. Известно, что SD2-регион участвует в формировании активного центра фермента за счет координации металла «С», обеспечивающего стабильность активного центра TdT и поддержание закрытой конформации фермента [24, 26]. Остатки D395 и E456 расположены в гидрофильной части кармана и вместе с R453 и R457 образуют сеть водородных связей с азотистым основанием входящего нуклеотида [24]. Формирование контактов с данными аминокислотными остатками dNTP-связывающего кармана, вероятно, стабилизирует координацию азотистого основания и может влиять как на положение dNTP в активном центре, так и на специфичность фермента по отношению к входящим dNTP.

В связи с этим для определения функциональной роли нами отобран ряд потенциально важных аминокислотных остатков R336, H342, D345, D395, L397, F400, F404, E456, D472, формирующих dNTP-связывающий карман TdT человека, и проведен мутационный и кинетический анализ их участия в процессах связывания ДНК-праймера, входящего dNTP и каталитической реакции присоединения нуклеотида (рис. 1).

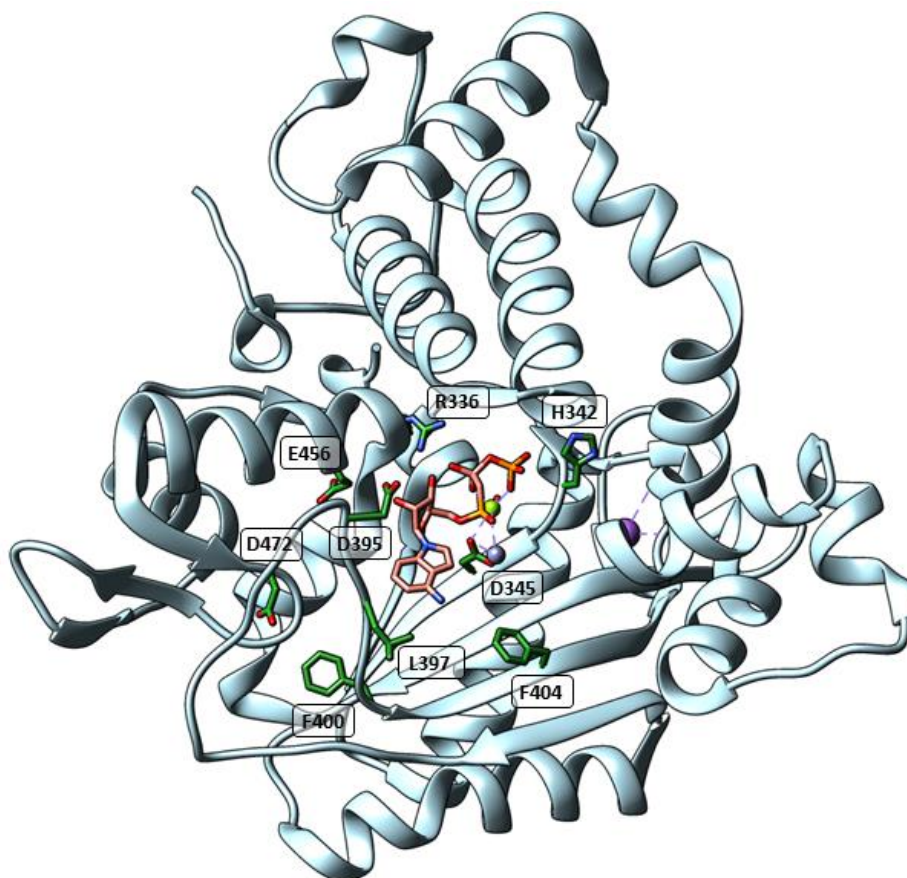


Рис. 1. Расположение выбранных аминокислотных остатков TdT. Белковая глобула обозначена светло-голубым цветом, выбранные аминокислотные остатки - зеленым, входящий dNTP - персиковым. (PDB ID: 4I2D)

2. Роль аминокислотных остатков R336, H342 и D345

2.1 Влияние аминокислотных замен на вторичную структуру

Для оценки влияния аминокислотных замен на структуру и стабильность TdT были получены спектры кругового дихроизма (КД) и определена температура плавления (T_m) (рис. 2).

Профили КД-спектров, полученных для мутантных форм H342A и D345E, практически совпадали с профилем КД-спектра фермента дикого типа, что свидетельствует о том, что внесенные аминокислотные замены не вызывают изменения вторичной структуры белка. В то же время замена R336Q приводила к уменьшению интенсивности сигнала в КД-спектре, что подтверждает изменение структуры мутантной формы белка и свидетельствует о роли остатка R336 не только в процессе взаимодействия с dNTP и ДНК-праймером, но и в стабилизации общей архитектуры белковой глобулы.

Температура плавления белковой глобулы, определенная методом дифференциального термического анализа, характеризует относительную стабильность

белковой глобулы мутантных форм фермента по сравнению с ферментом WT. Полученные данные показали, что температура плавления мутантных форм H342A и D345E, рассчитанная по **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, оказалась на 1,4-2,1°C меньше температуры плавления фермента дикого типа (Таблица 3), что подтверждает лишь незначительное влияние данных замен на стабильность белковой глобулы. При этом в случае замены R336Q рост интенсивности флуоресценции происходил в широком диапазоне температур от 30°C до 46°C, что не позволило использовать **ур. 1** для определения температуры плавления. Температура, при которой достигается половина максимального значения нормализованного сигнала составила ~41,0°C. Полученные для TdT R336Q данные свидетельствуют как о дестабилизации структуры белка (уменьшение температуры), так и локальном поэтапном плавлении белковой глобулы (широкий диапазон плавления).

Таким образом, локальные изменения, вызванные аминокислотными заменами H342A и D345E, не оказывают значительного влияния на глобальную вторичную структуру белка, но приводят к несколько более высокой гибкости белковой молекулы незначительно снижая устойчивость к термической денатурации. При этом замена R336Q приводит к значительной дестабилизации структуры белковой глобулы, что в совокупности с данными МД позволяет предположить о негативном эффекте данной замены на каталитическую активность фермента.

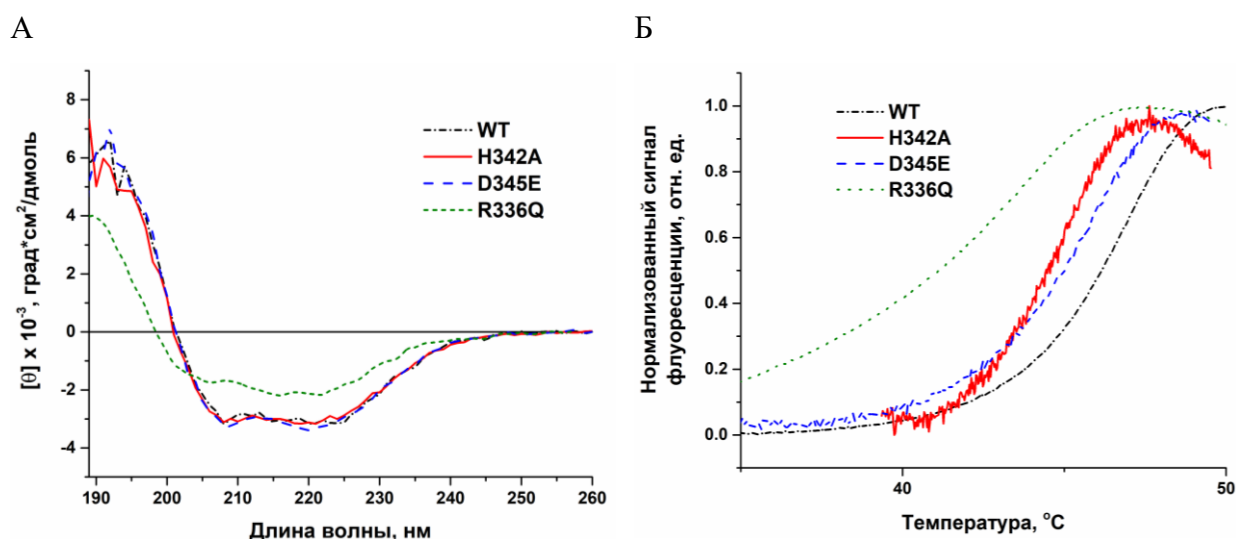


Рис. 2. Экспериментальная характеристика вторичной структуры мутантных форм TdT по сравнению с ферментом дикого типа. (А) Спектры кругового дихроизма TdT WT и мутантных форм R336Q, H342A и D345E. [TdT] = 2 мкМ, 25°C. (Б) Кривые плавления TdT WT и мутантных форм R336Q, H342A и D345E. [TdT] = 10 мкМ.

Таблица 3. Температура плавления TdT WT и его мутантных форм

	WT	R336Q	H342A	D345E
T _{пл} , °C	46,2 ± 0,2	~41,0*	44,1 ± 0,3	44,8 ± 0,2

* Температура, при которой достигается половина максимально значения нормализованного сигнала.

2.2 Эффективность связывания с ДНК и dNTP

Для оценки влияния внесенных аминокислотных замен на эффективность связывания фермента с одноцепочечным ДНК-праймером и входящим dNTP были определены значения констант диссоциации соответствующих комплексов. Методом задержки в геле (EMSA) были проанализировали параметры связывания TdT с 44-звенным одноцепочечным ДНК-праймером FAM-M44 (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Константы диссоциации комплексов TdT с ДНК были рассчитаны по [ур. 2](#) (**Таблица 4**).

Полученные данные свидетельствуют о том, что замена H342A не оказывает влияния на эффективность связывания с ДНК, что согласуется с данными моделирования (моделирование проведено Т.Е. Тюгашевым, ЛИМБ ИХБФМ СО РАН, см. Сенчурова и др., Биохимия, 2025). При этом замена D345E, дестабилизирующая взаимодействие с ионами Mg^{2+} , приводит лишь к незначительному (~1,6 раза) увеличению константы диссоциации с ДНК-праймером, подтверждая, что ключевые контакты с ДНК не нарушены. Полученные данные свидетельствуют о том, что замена R336Q действительно дестабилизирует взаимодействие с ДНК, как было предсказано с помощью МД-анализа, и вызывает увеличение константы диссоциации комплекса с ДНК более чем в 3 раза по сравнению с ферментом дикого типа.

Анализ влияния внесенных замен на связывание входящего dNTP проводили методом микромасштабного термофореза (**Ошибка! Источник ссылки не найден.В, Г**). В качестве лиганда был использован флуоресцентно меченный Flu-dUTP. Кроме того, для того чтобы выявить роль природы иона металла-кофактора и его потенциальное влияние на эффективность связывания dNTP с мутантными формами TdT титрование выполняли в присутствии ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} . Константы диссоциации комплексов TdT с Flu-dUTP были рассчитаны по [ур. 3](#) (**Таблица 4**).

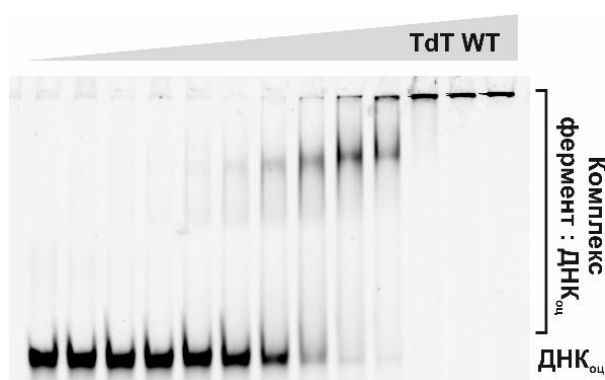
Следует отметить, что ранее было показано [18,19,27–32], что константа скорости каталитической реакции существенно зависит от природы иона металла-кофактора. Так, в присутствии ионов Mg^{2+} эффективность включения снижалась в ряду $dGTP > dTTP > dATP > dCTP$, при этом в случае dGTP ДНК-праймер удлинялся в процессивном режиме, тогда как в случае других dNTP удлинение происходило в дистрибутивном режиме. При этом, в

присутствии ионов Mn^{2+} способ удлинения dATP и dTTP менялся с дистрибутивного на процессивный, что значительно увеличивало эффективность их присоединения. Более того, сравнение констант скорости показало, что ионы Mn^{2+} увеличивают наблюдаемую каталитическую константу скорости присоединения dNTP примерно в 10 раз, независимо от природы азотистого основания.

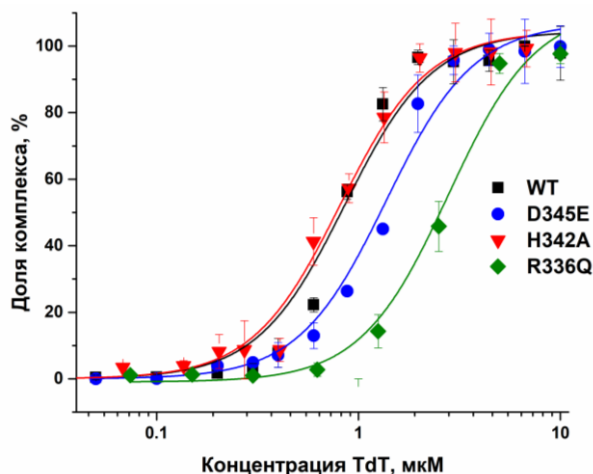
Полученные в данной работе данные, характеризующие эффективность связывания Flu-dUTP в присутствии и Mn^{2+} и Mg^{2+} , выявили, что значение K_d увеличивается в ряду $WT < H342A < D345E < R336Q$ (Таблица 4). Как можно было ожидать на основании моделирования (моделирование проведено Т.Е. Тюгашевым, ЛИМБ ИХБФМ СО РАН, см. Сенчурова и др., Биохимия, 2025), замена H342A приводила лишь к незначительному увеличению K_d по сравнению с ферментом дикого типа, что подтверждает второстепенное участие H342 в позиционировании входящего нуклеотида. При этом замена D345E оказывала более значимый эффект в случае ионов Mg^{2+} (увеличение в ~3,4 раза), чем в случае ионов Mn^{2+} (увеличение ~ в 1,7 раз). В целом, удлинение цепи бокового радикала D345 нарушает координацию как ионов Mg^{2+} , так и Mn^{2+} , что должно оказывать влияние и на эффективность каталитической реакции.

В случае замены R336Q не удалось получить кривую титрования, характеризующую связывание с Flu-dUTP в присутствии ионов Mg^{2+} , а в присутствии ионов Mn^{2+} увеличение константы составило 4,4 раза по сравнению с TdT WT. Полученные данные подтверждают, что участие остатка R336 в стабилизации входящего dNTP является критически важным для формирования комплекса. При этом природа иона металла-кофактора также играет большую роль в процессе координации фосфатных групп входящего нуклеотида в активном центре TdT.

А



Б



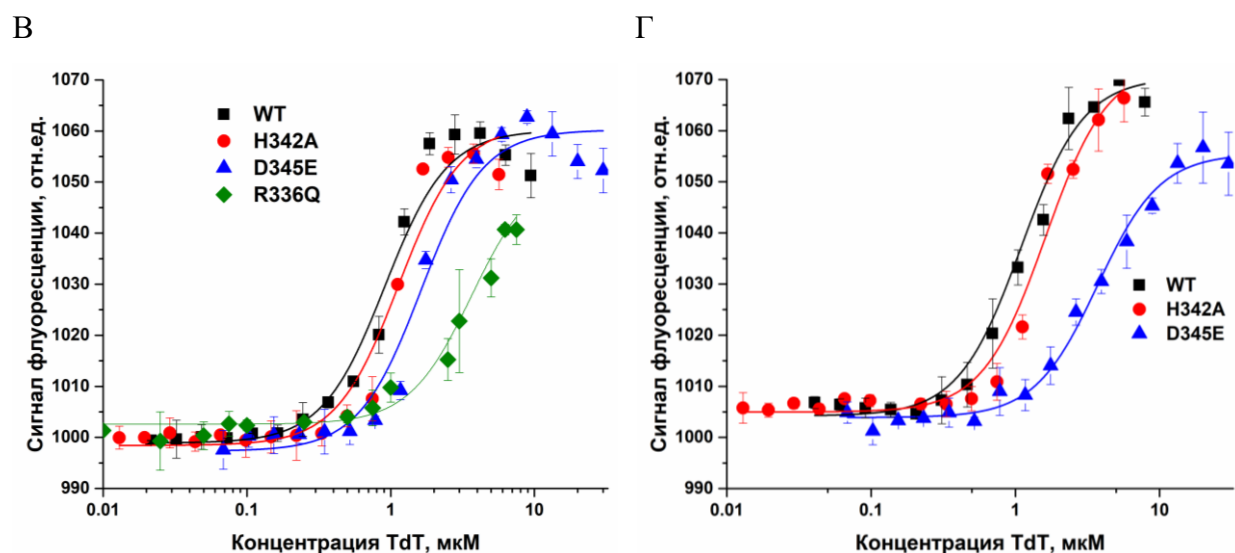


Рис. 3. Анализ связывания ДНК-праймера FAM-M44 и dNTP (Flu-dUTP) мутантными формами TdT. (А) Пример EMSA анализа, характеризующий связывание мутантной формы TdT D395N с FAM-M44 в присутствии ионов Mg^{2+} . (Б) Кривые титрования FAM-M44 всеми мутантными формами TdT. Диапазон концентраций фермента составлял от 0,016 мкМ до 10 мкМ. [FAM-M44] = 0,5 мкМ. Кривые титрования MST, характеризующие взаимодействие TdT WT и мутантных форм с Flu-dUTP в присутствии ионов Mn^{2+} (В) или Mg^{2+} (Г).

Таблица 4. Значение констант диссоциации с нуклеозид-трифосфатом (Flu-dUTP) в присутствии ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} , и одноцепочечным ДНК-праймером (FAM-M44)

K_d , мкМ	Flu-dUTP (Mn^{2+})	Flu-dUTP (Mg^{2+})	FAM-M44
WT	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$0,86 \pm 0,09$
R336Q	4 ± 1	ND	$2,8 \pm 0,3$
H342A	$1,2 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$0,81 \pm 0,05$
D345E	$1,6 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$

2.3 Эффективность присоединения dNTP к растущей цепи

Общая эффективность встраивания dNTP мутантными формами была проанализирована в присутствии двух ионов-кофакторов, а именно Mg^{2+} или Mn^{2+} (**Ошибка! Источник ссылки не найден.**). В присутствии ионов Mg^{2+} для всех мутантных форм наблюдалось значительное падение эффективности включения всех природных dNTP. В то же время добавление в реакционную смесь ионов Mn^{2+} приводило к частичному восстановлению полимеразной активности мутантных форм. При этом активация мутантной формы TdT R336Q ионами Mn^{2+} была наименее эффективной. Для мутантных форм H342A и D345E в присутствии ионов Mg^{2+} наблюдали только незначительное присоединение 1-2 dGTP (дистрибутивный тип присоединения), но в случае Mn^{2+} происходило переключение обеих мутантных форм в процессивный режим работы и

присоединение более 10 нуклеотидов с восстановлением активности до уровня фермента дикого типа. При этом для dATP такого переключения не происходило и ионы Mn^{2+} лишь незначительно активировали вариант D345E и, в еще меньшей степени, вариант H342A. Для dTTP и dCTP переход от Mg^{2+} к ионам Mn^{2+} также не приводил к переключению режимов присоединения нуклеотида, но активировал как фермент дикого типа, так и обе мутантные формы.

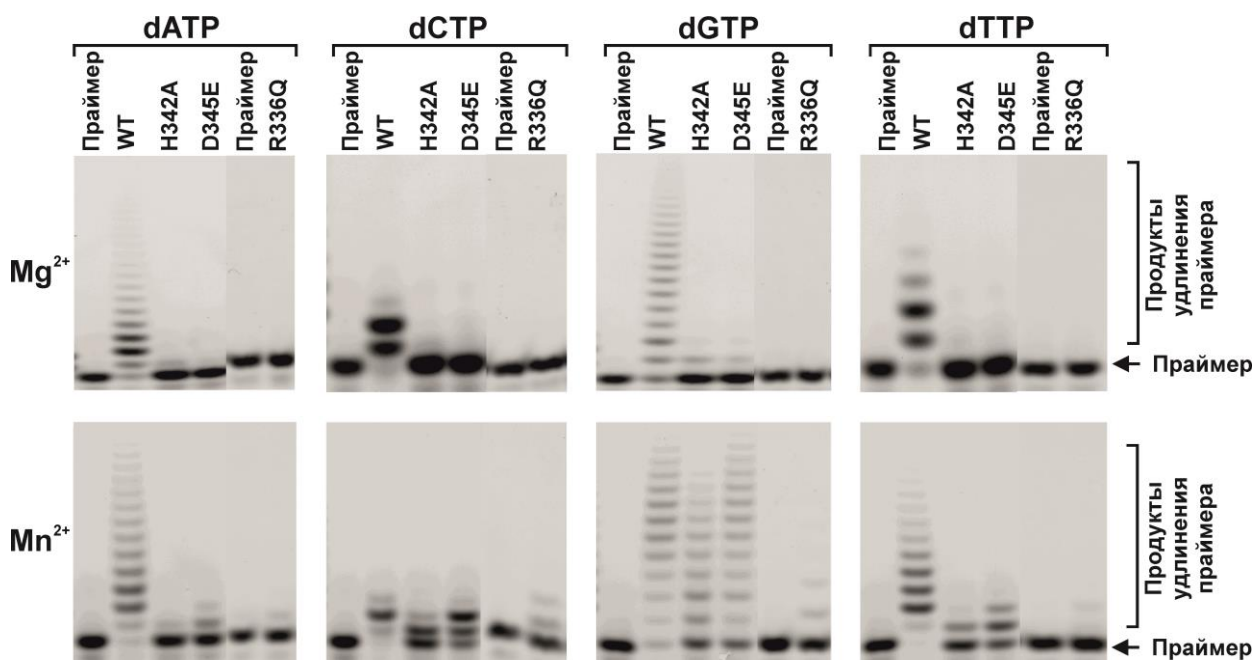


Рис. 4. Сравнение субстратной специфичности между TdT WT и мутантными формами H342A, D345E и R336Q в присутствии Mg^{2+} или Mn^{2+} . [TdT] = [ДНК-праймер] = 1,0 мкМ, [dNTP] = 10 мкМ, время реакции 5 мин.

Анализ кинетики накопления продукта присоединения $n+1$ нуклеотида (рис. 5) показал, что в одинаковых экспериментальных условиях в присутствии ионов Mn^{2+} мутантные формы, содержащие замены H342A и D345E, гораздо медленнее встраивают природные нуклеотиды, чем фермент дикого типа (табл. 5). Для обеих мутантных форм, также, как и для фермента дикого типа, было обнаружено, что самая высокая скорость включения наблюдалась при встраивании dGTP. Причем для обеих мутантных форм наблюдался схожий с диким типом порядок уменьшения наблюдаемой константы скорости в ряду $dGTP > dCTP > dATP \sim dTTP$. Полученные данные подтверждают, что несмотря на уменьшение наблюдаемой константы скорости присоединения dNTP, введенные замены не оказывают влияние на селективность фермента по отношению к различным азотистым основаниям.

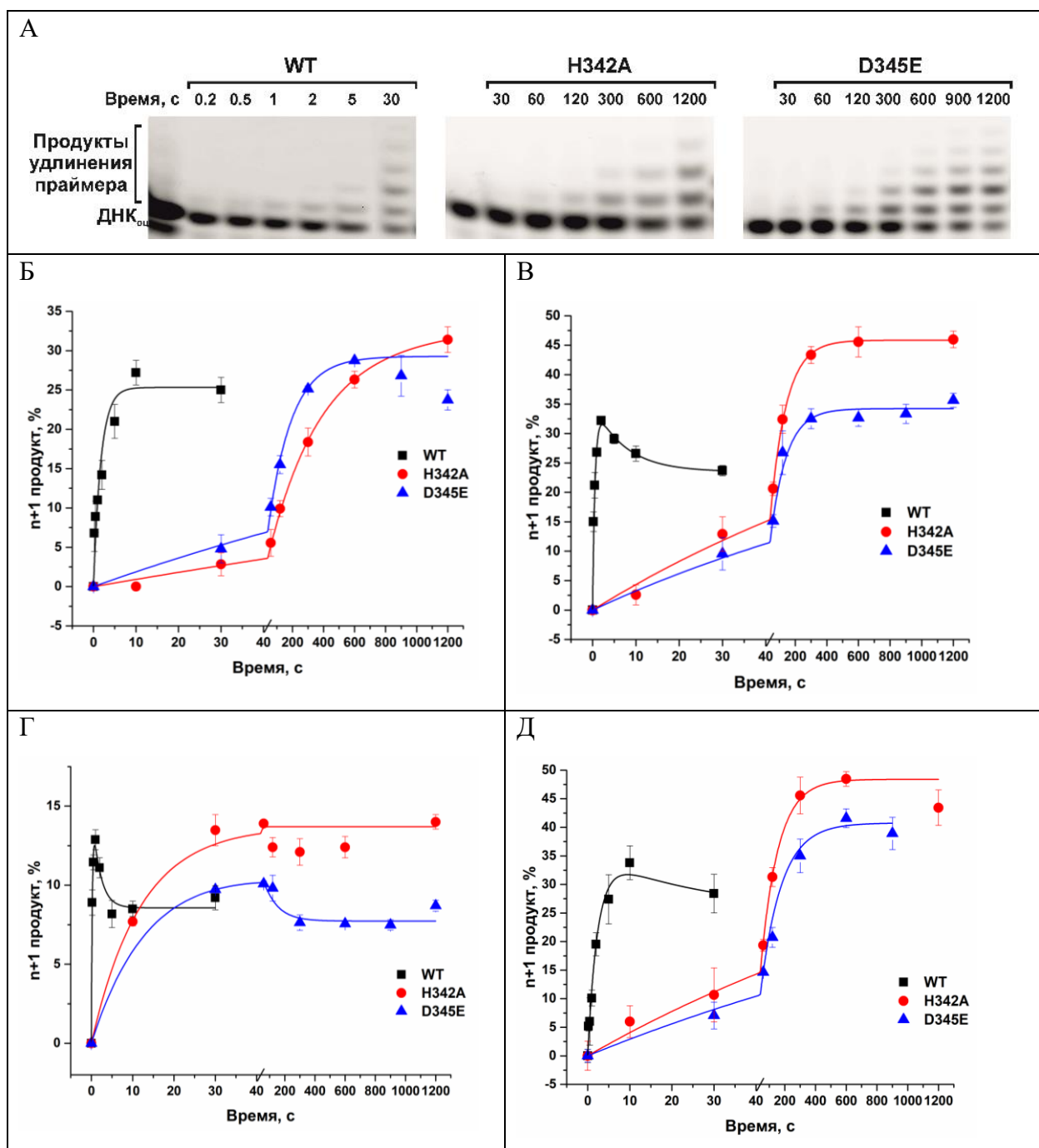


Рис. 5. Анализ продуктов присоединения dATP к ДНК-праймеру в присутствии ионов Mn^{2+} . Электрофореграммы разделения продуктов реакции (А). Кривые накопления продуктов присоединения dATP (Б), dCTP (В), dGTP (Г), dTTP (Д). Условия реакции: 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), [TdT] = [ДНК-праймер] = 1,0 мкМ, [dNTP] = 2,0 мкМ, $[Mn^{2+}]$ = 1,0 мМ.

Таблица 4. Наблюдаемые константы скорости $k_{набл}$ встраивания p+1 нуклеотида

$k_{набл}, c^{-1}$	dATP	dCTP	dGTP	dTTP
WT	$0,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,6$	$0,37 \pm 0,05$

H342A	0,003 ± 0,001	0,010 ± 0,002	0,046 ± 0,006	0,009 ± 0,001
D345E	0,007 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,066 ± 0,008	0,007 ± 0,002
<i>k_{набл}</i> рассчитана по ур. 4				

2.4 Конформационная динамика ДНК в ходе включения флуоресцентных аналогов нуклеозидтрифосфатов

Метод остановленного потока широко используется для изучения конформационных переходов биомолекул. Данный метод позволяет быстро смешивать растворы фермента и субстрата и непрерывно регистрировать сигнал флуоресценции. Для детекции конформационных переходов ДНК в ходе каталитического цикла TdT был использован синтетический флуоресцентный аналог 2'-дезоксирибонуклеозидтрифосфат, содержащий 1,N6-этенoadенин (εA) в качестве азотистого основания (dεATP).

Известно, что интенсивность флуоресценции εA уменьшается при формировании стэкинга с соседними азотистыми основаниями за счет фотоиндуцированного переноса заряда [33]. Эта особенность может позволить зарегистрировать как стадию связывания dεATP в кармане dNTP-связывающего центра, так и стадию катализа с последующей транслокацией удлиненного продукта в ДНК-связывающем центре. В связи с этим мы использовали dεATP для определения кинетических параметров присоединения нуклеотида к ДНК при взаимодействии как с TdT дикого типа, так и мутантными формами.

При взаимодействии dεATP с предформированным комплексом TdT с ДНК-праймером для фермента дикого типа и всех мутантных форм было зарегистрировано уменьшение интенсивности флуоресценции εA до 5 с. ([рис. 6А-Г](#)), в то время как при смешении dεATP с буфером изменения сигнала не были обнаружены ([рис. 6Д](#)), из чего можно заключить, что эти изменения вызваны взаимодействием с ферментом. Для оценки скорости включения εA в растущую цепь мы так же проанализировали накопление продуктов присоединения dεATP к ДНК в полиакриламидном геле ([рис. 7](#)).

Следует отметить, что встраивание флуоресцентного нуклеотида, согласно данным геля электрофореза происходит медленно, и за первые 10 с в растущую цепь включается не более ~10% нуклеотида ([рис. 7](#)), поэтому можно заключить, что фаза падения интенсивности флуоресценции εA до 5 с характеризует стадии связывания dNTP и формирования предкаталитического комплекса. В связи с этим, кинетические кривые описывали **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, включающей обратимые стадии первичного связывания и формирования предкаталитического комплекса, что позволило рассчитать кинетические параметры этих стадий ([Таблица 6](#)). Наблюдаемые константы

скорости включения dεАТР в растущую цепь, полученные методом разделения продуктов реакции в геле, приведены в **Таблице 6**.

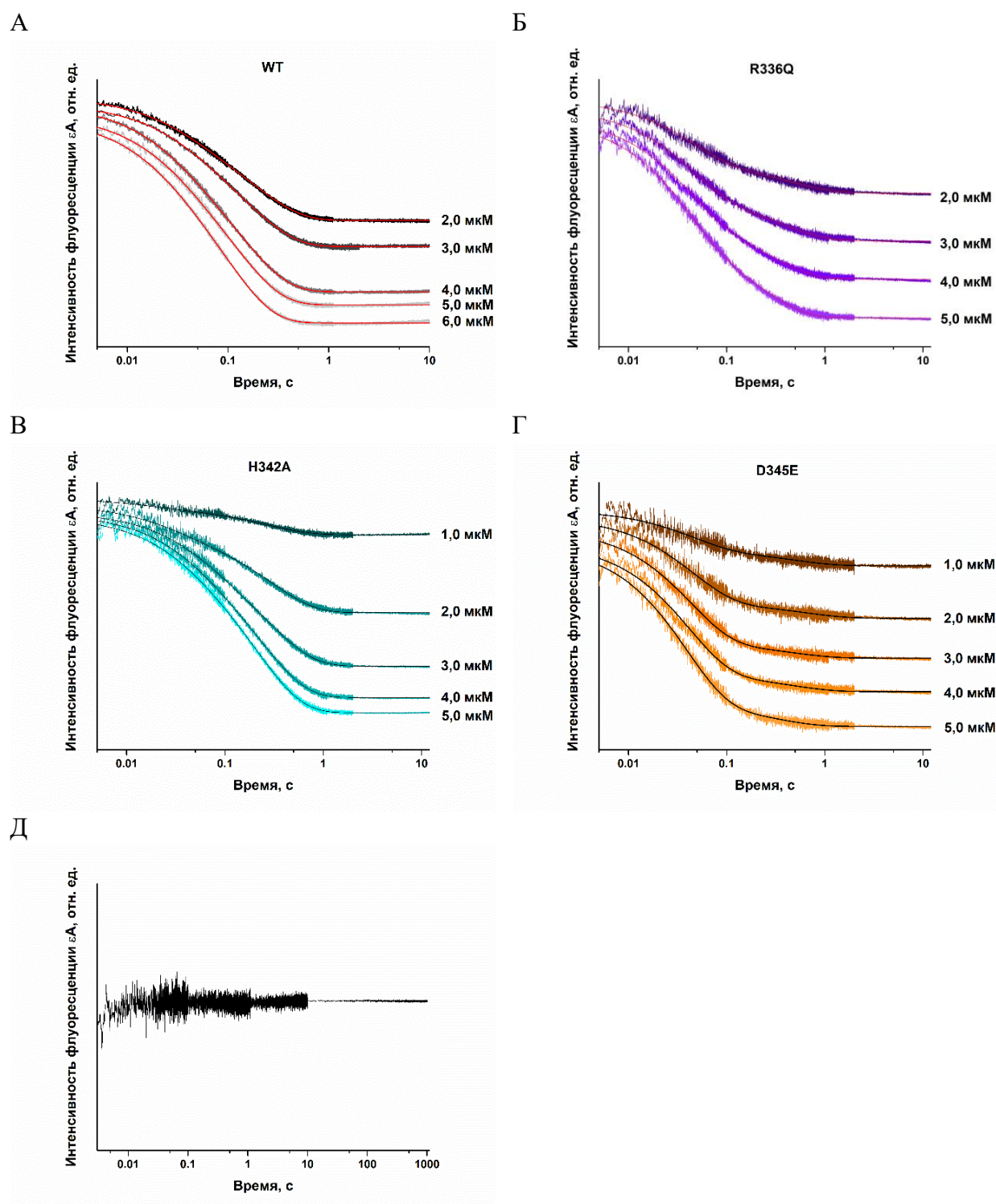


Рис. 6. Изменения интенсивности флуоресценции εА в ходе взаимодействия с предформированным комплексом фермента с ДНК для TdT WT (А), R336Q (Б), H342A (В), D345E (Г). [dεАТР] = 3,0 мкМ, [M6] = 1,0 мкМ, [TdT] = 3,0 мкМ. (Д) Изменения интенсивности флуоресценции εА при инкубации с буфером не содержащем фермента.

Схема 1. Схема, описывающая механизм связывания dεATP с предформированным комплексом [TdT•M6-AGA].

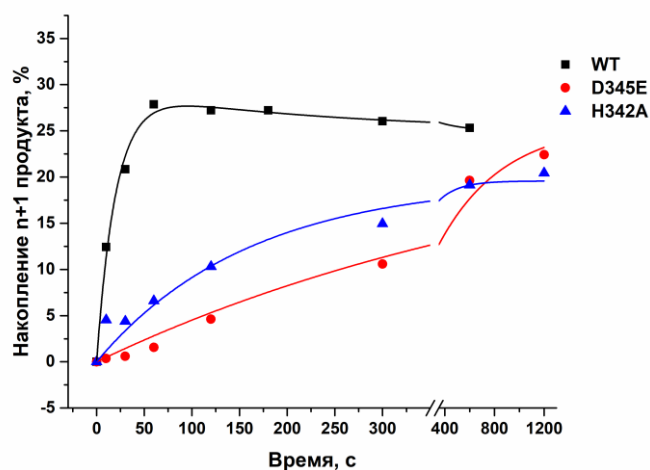
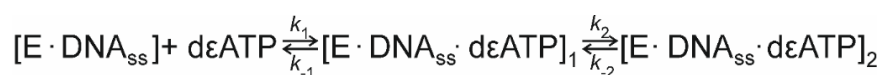


Рис. 7. Кинетические кривые накопления n+1 продукта присоединения dεATP TdT WT и мутантными формами, полученные методом разделения продуктов реакции в геле.

Следует также отметить, что присоединение dεAMP к растущей цепи ферментом дикого типа, происходит более медленно, по сравнению с присоединением природных dNMP (Таблицы 5 и 6), что может быть связано с влиянием объемного флуоресцентного основания на позиционирование dεATP в активном центре фермента и нарушению оптимального для катализа взаимного расположения взаимодействующих остатков.

Таблица 6. Константы скорости стадий связывания dεATP TdT WT и его мутантными формами

Константы	WT	R336Q	H342A	D345E
$k_1, (\text{мкМ} \cdot \text{с})^{-1}$	$0,61 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$
$k_{-1}, \text{с}^{-1}$	$12,2 \pm 0,3$	$19,4 \pm 0,4$	$11,0 \pm 0,2$	$18,8 \pm 0,2$
$K_1, \text{мкМ}^{-1}$	$0,051 \pm 0,005$	$0,006 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,001$	$0,0148 \pm 0,0007$
$k_2, \text{с}^{-1}$	$11,4 \pm 0,5$	$1,25 \pm 0,04$	$4,7 \pm 0,2$	$0,23 \pm 0,01$
$k_{-2}, \text{с}^{-1}$	$6,8 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$	$4,71 \pm 0,07$	$1,8 \pm 0,2$
K_2	$1,7 \pm 0,1$	$0,39 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,1$	$0,13 \pm 0,02$
$K^{d\epsilon ATP}_d, \text{мкМ}$	7 ± 1	120 ± 20	50 ± 10	59 ± 7
$k_{набл}, \text{с}^{-1}$	$0,050 \pm 0,006$	ND	$0,006 \pm 0,001$	$0,0019 \pm 0,0004$

$$K_{\text{дeATP}}^{\text{d}} = 1/(K_1 + K_1 \times K_2), K_i = k_i / k_{-i}, k_{\text{набл}} \text{ рассчитана по } \text{ур. 4}$$

Полученные данные показывают, что все замены негативно влияют на эффективность первичного связывания dNTP и формирования предкаталитического комплекса. При замене Н342А константа ассоциации K_1 снижается в 5 раз, в то время как константа формирования предкаталитического комплекса K_2 снижается незначительно (< 2 раз). При замене D345Е константа ассоциации K_1 снижается в 3 раза, а K_2 в 13 раз. Наблюдаемая константа скорости включения нуклеотида падает в 8 раз при замене Н342А и в 25 раз при замене D345Е. Таким образом обе замены нарушают координирование входящего нуклеотида в активном центре фермента. Замена R336Q приводит к падению константы ассоциации K_1 практически в 10 раз, а K_2 в 4 раза, что свидетельствует о нарушении как первоначального узнавания нуклеотида, так и формирования предкаталитического комплекса.

Таким образом, на основании совокупности полученных результатов можно сделать заключение о роли остатков R336, Н342 и D345. Экспериментальный анализ каталитических свойств мутантных форм TdT, содержащих замены R336Q и D345Е, подтвердил влияние данных замен на связывание с ДНК-праймером, входящим dNTP и катализ. При этом, замена D345Е приводит к критическому нарушению координации металла и стабилизации переходного состояния ($K_2 < 1$), что говорит о том, что D345 является ключевым элементом каталитической триады для координации ионов металла. В то же время, было установлено, что замена Н342А также приводит к значительному уменьшению каталитической активности. Можно предположить, что остаток Н342 вовлечён в правильное позиционирование субстрата и/или металлов, а его замена на Ala разрушает данную сеть координационных связей. При этом фермент TdT Н342А остаётся частично активным, но значительно менее эффективным. Следует отметить, что негативное влияние замен Н342А и D345Е на активность фермента может быть уменьшено в присутствии ионов Mn^{2+} , стимулирующих эффективность присоединения всех dNTP. Однако дестабилизация структуры фермента, вызванная заменой R336Q, не может быть компенсирована природой металла-кофактора.

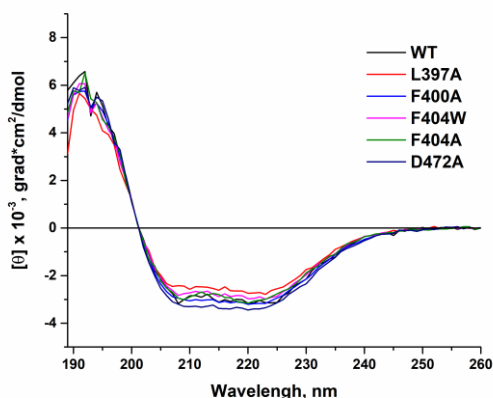
3. Роль аминокислотных остатков L397, F400, F404 и D472

3.1 Влияние внесенных аминокислотных замен на вторичную структуру белка

КД-спектры мутантных вариантов практически не отличались от спектра белка дикого типа, что указывает на отсутствие значительных изменений в их вторичной структуре (рис. 8А). В то же время температура плавления (T_m) мутантных форм L397А и

F404A немного снижена по сравнению с WT, что может указывать на вклад в стабильность белка за счет гидрофобных взаимодействий (рис. 8Б, Таблица 7). Полученные данные позволяют заключить, что замены аминокислот не нарушают общую вторичную структуру белка, но в ряде случаев несколько увеличивают гибкость молекулы, делая её менее устойчивой к тепловой денатурации.

А



Б

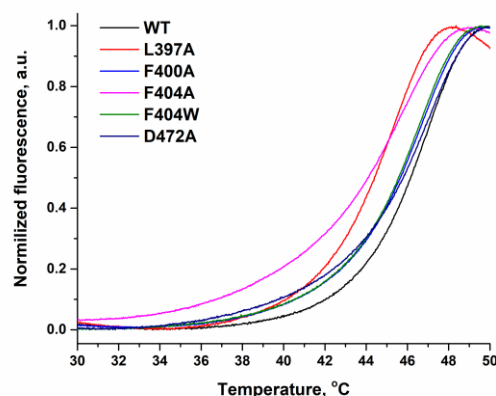


Рис. 8. Экспериментальная характеристика вторичной структуры мутантных форм TdT по сравнению с ферментом дикого типа. (А) Спектры кругового дихроизма TdT WT и мутантных форм L397A, F400A, F404A, F404W и D472A. [TdT] = 2 мкМ, 25°C. (Б) Кривые плавления TdT WT и мутантных форм L397A, F400A, F404A, F404W и D472A. [TdT] = 10 мкМ.

Таблица 7. Температура плавления TdT WT и его мутантных форм

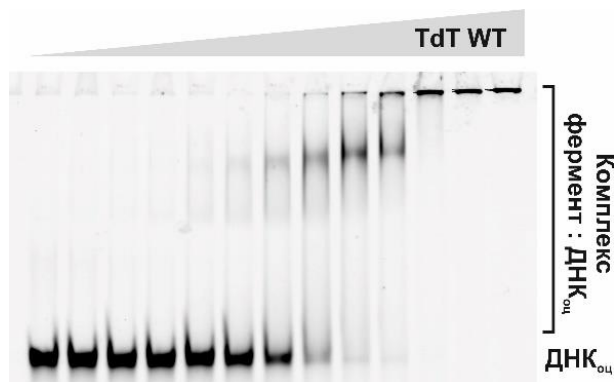
	WT	L397A	F400A	F404A	F404W	D472A
T _m , °C	46,2 ± 0,2	44,4 ± 0,4	46,2 ± 0,5	44,7 ± 0,4	46,0 ± 0,3	46,9 ± 0,3

3.2 Влияние внесенных замен на эффективность связывания с ДНК и Flu-dUTP

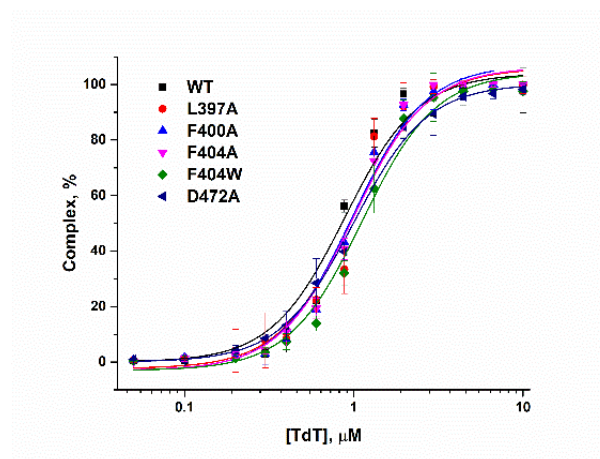
Влияние замен анализируемых аминокислотных остатков на эффективность связывания с ДНК и Flu-dUTP проводили по методике, описанной в предыдущем разделе. Сродство мутантных форм и фермента дикого типа к ДНК-праймеру, определенное методом задержки в геле незначительно уменьшалось в ряду WT ≈ L397A ≈ F400A ≈ F404W ≈ D472A < F404A, что свидетельствует о том, что внесенные замены не нарушают контакты с ДНК-праймером (рис 9А, Б., Таблица 8). Сродство вариантов TdT к флуоресцентно-меченому аналогу нуклеотида (Flu-dUTP) было измерено с помощью микромасштабного

термофореа (рис. 9В). Полученные данные также не выявили значительного нарушения связывания dNTP, константа диссоциации увеличивалась в ряду: WT $\approx$ F404W $\approx$ F400A < L397A $\approx$ F404A $\approx$ D472A (Таблица 8).

А



Б



В

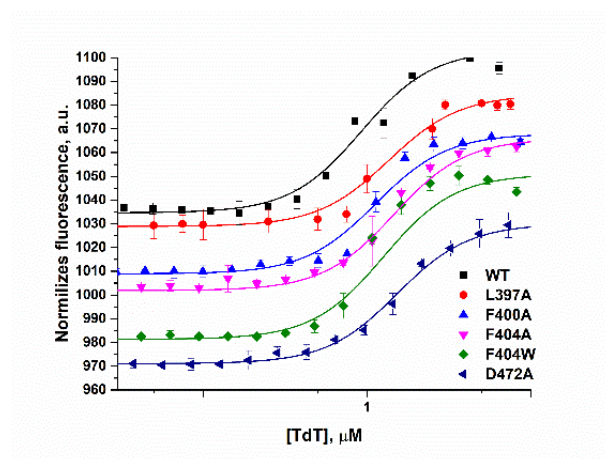


Рис. 9. Анализ связывания ДНК-праймера FAM-M44 и dNTP (Flu-dUTP) мутантными формами TdT. (А) Пример EMSA анализа, характеризующий связывание мутантной формы TdT D395N с FAM-M44 в присутствии ионов Mg^{2+} . (Б) Кривые титрования FAM-M44 всеми мутантными формами TdT. Диапазон концентраций фермента составлял от 0,016 мкМ до 10 мкМ. $[FAM-M44] = 0,5$ мкМ. (В) Кривые титрования MST, характеризующие взаимодействие TdT WT и мутантных форм с Flu-dUTP в присутствии ионов Mn^{2+} .

Следует отметить, что остатки L397 и F404 являются гидрофобными остатками, формирующими карман dNTP-связывающего центра. В случае замен этих остатков на аланин пропадает боковая цепь, которая обеспечивает гидрофобную упаковку и контакт с основанием/сахаро-фосфатным остовом нуклеотида. Замена F404W сохраняет ароматический характер боковой цепи и даже добавляет дополнительные π - π или

гидрофобные контакты, что может объяснить то, что аффинность остаётся на уровне дикого типа. При этом несмотря на то, что F400 также является ароматическим остатком в активном центре, его замена на аланин почти не влияет на K_d . Это свидетельствует о том, что F400 либо не формирует прямых критичных контактов с dNTP, либо его вклад может быть компенсирован соседними остатками. D472 может либо напрямую участвовать в формировании водородных связей либо осуществлять координацию ионов Mg^{2+}/Mn^{2+} и, таким образом, косвенно стабилизировать положение dNTP. При замене D472A теряются ионные и водородные контакты и таким образом может нарушаться правильное позиционирование фосфатных групп входящего dNTP, что приводит к увеличению константы диссоциации с dNTP.

Таблица 8. Значение констант диссоциации с нуклеозид-трифосфатом (Flu-dUTP) в присутствии ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} , и одноцепочечным ДНК-праймером (FAM-M44)

K_d, мкМ	WT	L397A	F400A	F404A	F404W	D472A
Flu-dUTP	$0,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$1,53 \pm 0,08$
FAM-M44	$0,88 \pm 0,08$	$0,97 \pm 0,08$	$0,98 \pm 0,07$	$1,10 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,1$	$1,00 \pm 0,04$

3.3 Эффективность присоединения dNTP к растущей цепи

Чтобы оценить влияние внесенных аминокислотных замен на эффективность включения природных dNTP, мы проанализировали накопление продуктов присоединения dNTP мутантными формами в присутствии ионов металлов-кофакторов Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} (рис. 10). В присутствии нативных ионов Mg^{2+} все мутантные формы обладали пониженной каталитической активностью. При этом наибольшая остаточная активность была выявлена в случае замены F404W, тогда как замены L397A, F400A и D472A приводили к значительной потере активности, а вариант F404A приводил к полной потере активности фермента. Интересно отметить, что металлы-кофакторы Mn^{2+} и Co^{2+} приводили к частичному восстановлению активности всех мутантных форм, кроме варианта F404A.

Замена F404W не оказала значительного влияния на эффективность включения трифосфатов, вероятно, потому что в случае данной замены сохраняется гидрофобность dNTP-связывающего кармана. С другой стороны, больший размер аминокислотного остатка может привести к стерическим затруднениям что в конечном итоге может объяснить небольшое снижение процессивности фермента по сравнению с ферментом

дикого типа. Частичное возвращение процессивности в присутствии ионов Mn^{2+} и Co^{2+} может быть обусловлено тем, что более массивный аминокислотный остаток триптофана приводит к локальным изменениям архитектуры активного центра, а данные ионы менее требовательны к точной координации dNTP, чем в случае ионов Mg^{2+} .

Замена F400A в присутствии ионов Mg^{2+} проявляет низкую активность, которая частично восстанавливается в присутствии Mn^{2+} и Co^{2+} . D472A показал большую активность в присутствии ионов Mn^{2+} , чем F400A, и в то же время уровень активности обеих мутантных форм в присутствии ионов Co^{2+} оказался схожим. Вариант L397A в присутствии ионов Mg^{2+} был практически не активен, однако, как и в случае F400A и D472A добавление в реакционную смесь ионов Co^{2+} или Mn^{2+} приводило к частичному восстановлению его полимеразной активности.

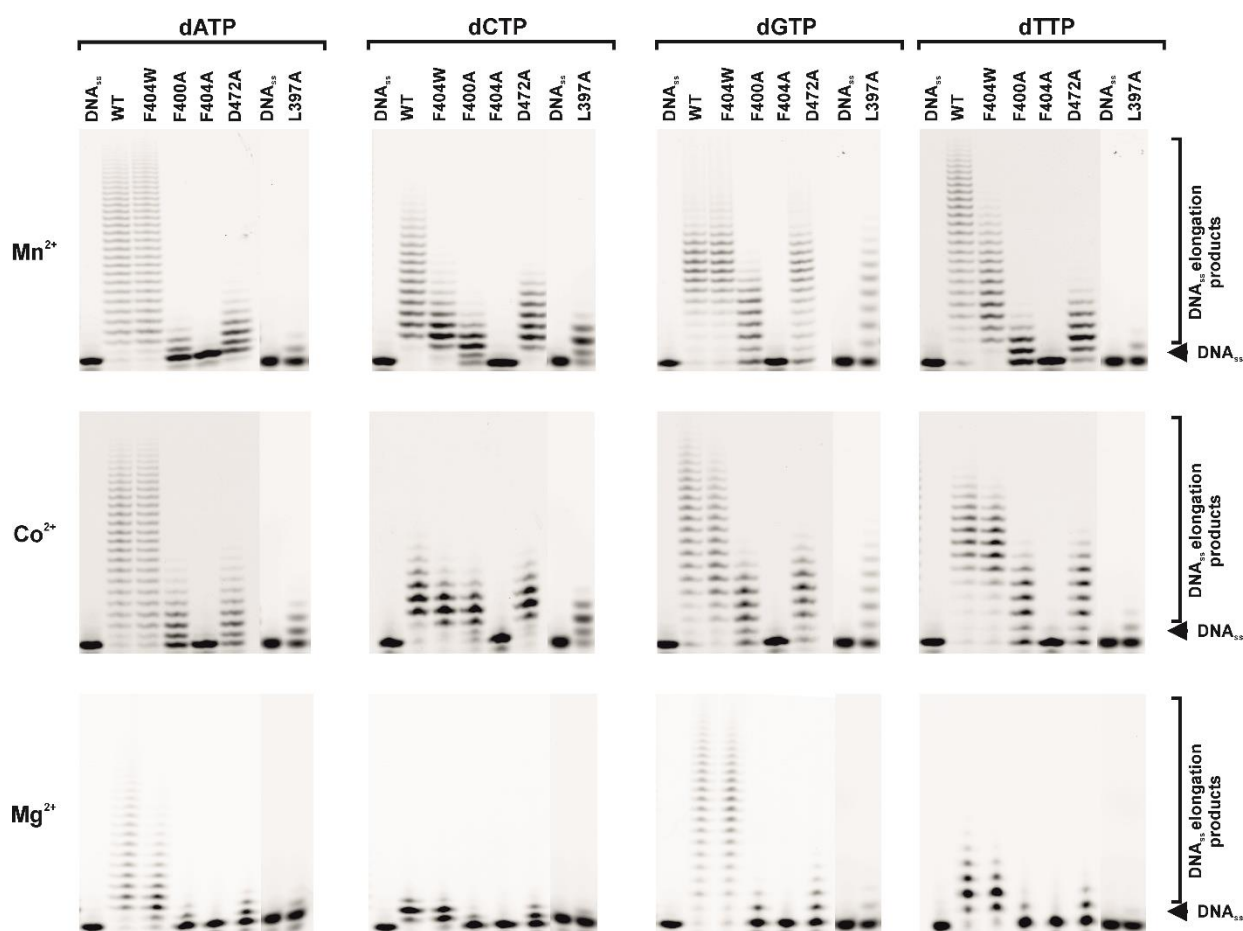


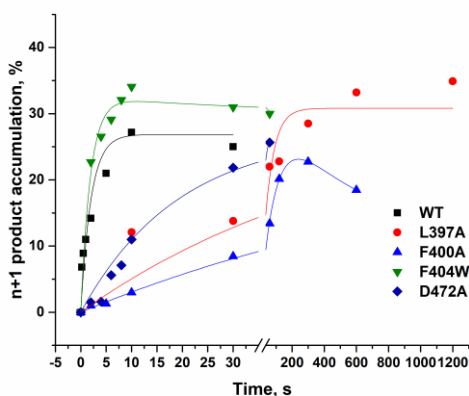
Рис. 10. Сравнение эффективности присоединения dNTP к растущей цепи TdT WT и мутантными формами L397A, F400A, F404A, F404W и D472A в присутствии ионов Mg^{2+} , Co^{2+} или Mn^{2+} . $[TdT] = [ДНК] = 1,0$ мкМ, $[dNTP] = 10$ мкМ, время реакции - 5 мин.

Кривые накопления продукта присоединения n+1 нуклеотида, представленные на **рис. 11**, показывают, что анализируемые замены аминокислотных остатков на аланин

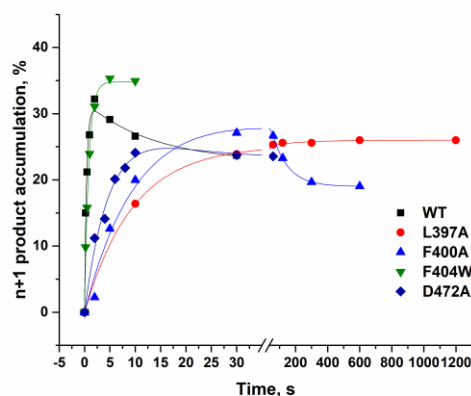
(удаление бокового радикала) приводили к падению скорости включения всех dNTP по сравнению с ферментом дикого типа, в то время как замена F404W приводила к небольшому падению скорости включения лишь dCTP (Таблица 9). Скорость нуклеотидилтрансферазной реакции для природных субстратов у фермента дикого типа снижается в ряду: dGTP > dCTP >> dATP ≈ dTTP. Все мутантные формы в той или иной мере сохранили специфичность по отношению природным dNTP с наибольшей скоростью включения dCTP и dGTP.

Следует отметить, что замена L397A приводила к тому, что скорость включения dGTP оказалась сопоставима со скоростью включения dATP и dCTP. Такой эффект может быть обусловлен тем, что уменьшение жесткости dNTP-связывающего кармана может нарушать взаимодействие с азотистым основанием входящего нуклеотида. Для данной мутантной также наблюдали наибольшее уменьшение скорости включения dNTP (от 10 до 40 раз). Аналогичное, хотя и менее выраженное, снижение скорости наблюдается в случае замены F400A, при которой наибольший эффект проявляется для пуринов (dATP и dGTP), указывая на важность F400 в позиционировании азотистого основания входящего нуклеотида. Для D472A наблюдается равномерное снижение скорости включения всех нуклеотидов (примерно в 10–20 раз), что согласуется с ролью этого остатка в стабилизации трифосфатной группы и координации металлов. Таким образом, можно заключить, что остатки L397 и F400 критичны для общей эффективности присоединения всех нуклеотидов, тогда как D472 необходим для оптимального позиционирования трифосфатной группы нуклеотида и катализа.

А



Б



В

Г

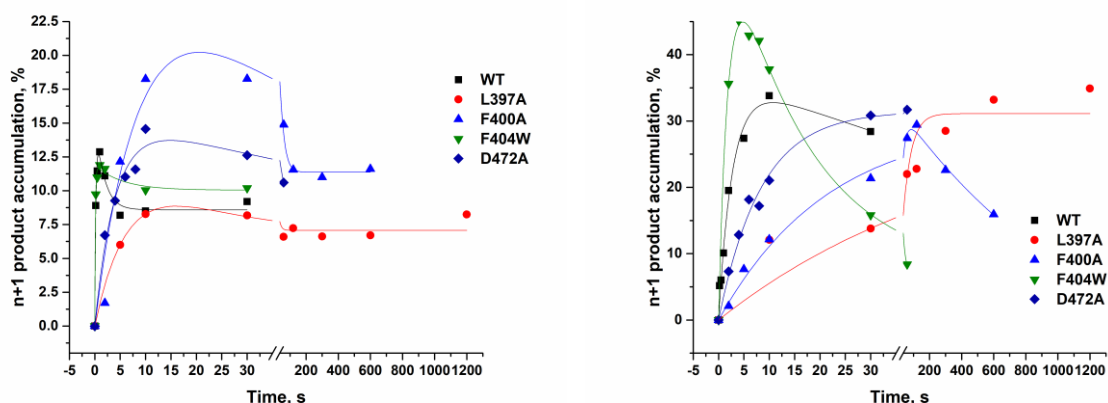


Рис. 11. Анализ продуктов присоединения dN TP к ДНК-праймеру в присутствии ионов Mn^{2+} . Кривые накопления продуктов присоединения dATP (А), dCTP (Б), dGTP (В), dTTP (Г). Условия реакции: 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), $[TdT] = [ДНК-праймер] = 1,0$ мкМ, $[dNTP] = 2,0$ мкМ, $[Mn^{2+}] = 1,0$ мМ.

Таблица 9. Наблюдаемые константы скорости $k_{набл}$ встраивания n+1 нуклеотида

$k_{набл}, c^{-1}$	dATP	dCTP	dGTP	dTTP
WT	$0,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,5$	$4,3 \pm 0,6$	$0,37 \pm 0,05$
L397A	$0,06 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$	$0,019 \pm 0,006$
F400A	$0,011 \pm 0,003$	$0,095 \pm 0,009$	$0,23 \pm 0,05$	$0,044 \pm 0,006$
F404W	$0,5 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	7 ± 2	$0,53 \pm 0,04$
D472A	$0,045 \pm 0,005$	$0,16 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,03$
$k_{набл}$ рассчитана по ур. 4 .				

3.4 Конформационная динамика ДНК в ходе включения флуоресцентных аналогов нуклеозидтрифосфатов

Для определения влияния аминокислотных замен L397A, F400A, F404A, F404W и D472A на отдельные этапы каталитического цикла мы проанализировали кривые изменения интенсивности флуоресценции ϵA при взаимодействии предформированных комплексов $[TdT-M6]$ с $d\epsilon ATP$ ([рис. 12](#)). Падение интенсивности флуоресценции ϵA , соответствующее стадиям формирования тройного комплекса с ДНК-праймером и $d\epsilon ATP$ для всех мутантных форм, описывали [схемой 1](#), содержащей две последовательные стадии связывания. Константы соответствующих стадий представлены в [Таблице 10](#). Для оценки скорости включения $d\epsilon ATP$ в растущую цепь так же были получены кривые накопления n+1 продукта присоединения для всех мутантных форм ([рис. 13](#)).

А

Б

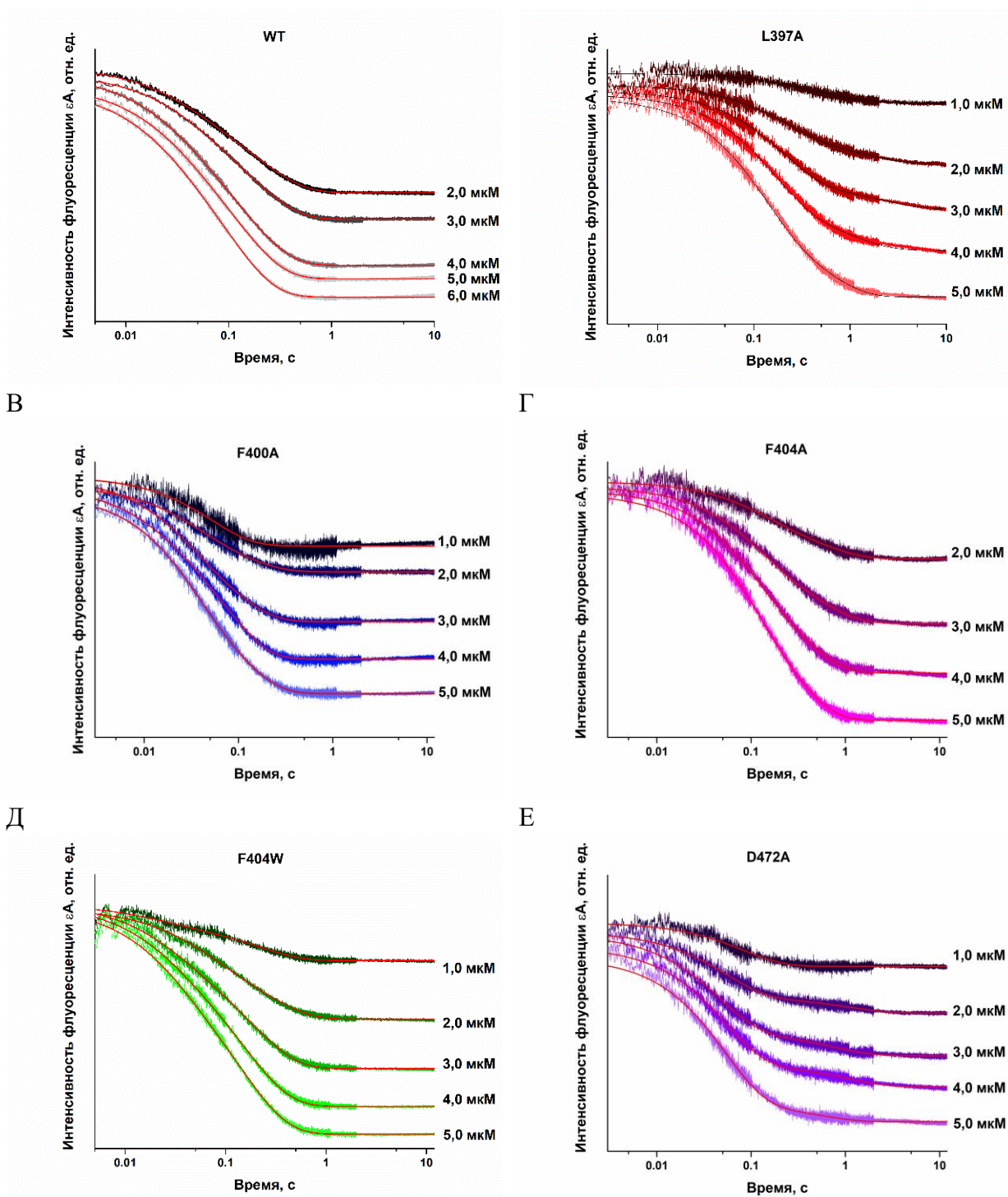


Рис. 12. Изменения интенсивности флуоресценции ϵA в ходе взаимодействия с предформированным комплексом фермента с ДНК для TdT WT (А), L397A (Б), F400A (В), F404A (Г), F404W (Д), D472A (Е). $[d\epsilon ATP] = 3,0 \mu M$, $[M6] = 1,0 \mu M$, $[TdT] = 3,0 \mu M$.

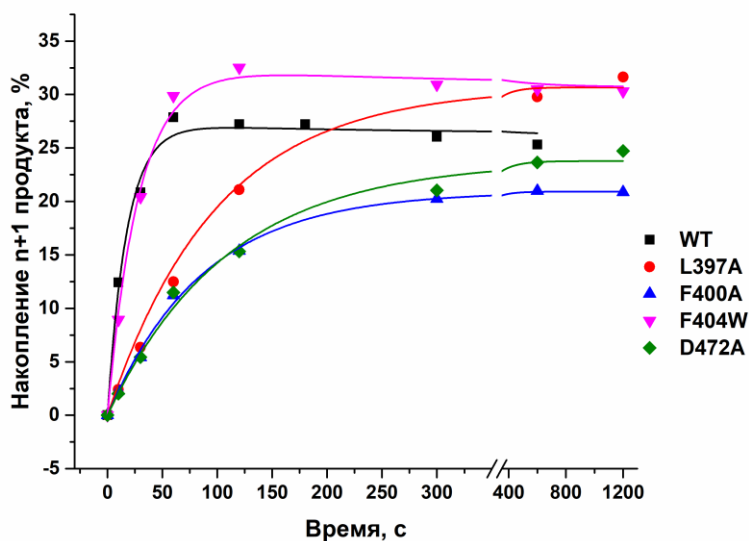


Рис. 13. Кривые накопления n+1 продукта присоединения dεATP при взаимодействии с TdT WT и мутантными формами, содержащими замены L397A, F400A, F404A, F404W или D472A.

Таблица 10. Константы скорости этапов взаимодействия предформированных комплексов с ДНК-праймером TdT WT и мутантных форм с dεATP

Константы	WT	L397A	F400A	F404A	F404W	D472A
$k_1, (\text{мкМ} \cdot \text{с})^{-1}$	$0,61 \pm 0,04$	$0,116 \pm 0,005$	$0,42 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,02$
$k_{-1}, \text{с}^{-1}$	$12,2 \pm 0,3$	$4,35 \pm 0,06$	22 ± 1	$7,7 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,5$
$K_1, \text{мкМ}^{-1}$	$0,051 \pm 0,005$	$0,027 \pm 0,002$	$0,018 \pm 0,002$	$0,023 \pm 0,002$	$0,060 \pm 0,004$	$0,048 \pm 0,005$
$k_2, \text{с}^{-1}$	$11,4 \pm 0,5$	$0,46 \pm 0,02$	$6,2 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,3$	$0,59 \pm 0,03$
$k_{-2}, \text{с}^{-1}$	$6,8 \pm 0,2$	$1,17 \pm 0,02$	$11,9 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$
K_2	$1,7 \pm 0,1$	$0,39 \pm 0,03$	$0,5$	$0,9 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,03$
$K^{\text{dεATP}}_{\text{d}}, \text{мкМ}$	7 ± 1	26 ± 3	37 ± 3	26 ± 5	9 ± 2	16 ± 2
$k_{\text{набл}}, \text{с}^{-1}$	$0,050 \pm 0,006$	$0,0086 \pm 0,0007$	$0,012 \pm 0,01$	ND	$0,035 \pm 0,003$	$0,009 \pm 0,001$
$K^{\text{dεATP}}_{\text{d}} = 1/(K_1 + K_1 \times K_2)$, $K_i = k_i / k_{-i}$, $k_{\text{набл}}$ рассчитана по ур. 4						

Сравнение констант скорости, полученных для фермента дикого типа, с константами, полученными для мутантных форм ([Таблица 10](#)), показало, что аминокислотные замены F404W и D472A слабо влияют на эффективность первичного связывания dεATP. Замена на триптофан привела к небольшому (в 1,5 раза) падению

константы скорости образования первичного комплекса k_1 , вероятно за счет большего размера аминокислотного остатка, но тем не менее константа ассоциации первой стадии K_1 повышалась в 1,8 раз, что говорит о большей стабилизации dεATP в кармане активного центра. При этом на второй стадии связывания замена F404W умеренно замедляет переход в каталитически компетентное состояние (значение k_2 падает в 2 раза), но почти не влияет на обратный процесс. Общее сродство к dεATP и наблюдаемая константа скорости включения нуклеотида падают незначительно (в 1,2 и 1,5 раз, соответственно), что в совокупности с полной потерей активности мутантной формой F404A позволяет заключить, что сохранение гидрофобности dNTP-связывающего кармана является критическим для каталитической активности TdT.

Замена D472A не оказала влияния на значение констант скорости первого этапа связывания, что говорит о том, что данный остаток не является критическим при первичном связывании нуклеотида. И, напротив, вторая стадия связывания данной мутантной формой показала резкое (в 20 раз) падение скорости перехода в каталитически компетентное состояние, которое частично компенсируется понижением константы обратного процесса k_{-2} в 3 раза. Однако общее падение константы второй стадии связывания K_2 в 8 раз говорит о том, что равновесие смещено в сторону неактивной формы, что приводит к значительному уменьшению каталитической активности мутантной формы. D472, вероятно, стабилизирует конформацию TdT, необходимую для катализа путем взаимодействия с ионами металла или фосфатными группами входящего dNTP.

Замена F404A приводит к уменьшению скорости образования первичного комплекса более чем в 3 раза, что отражает слабое связывание нуклеотида. На второй стадии константа скорости перехода в предкаталитический комплекс также уменьшена, также как и константа скорости обратного процесса (3,2 и 1,7 раз, соответственно). Такое сочетание приводит к росту K_d до 26 мкМ и полной потере каталитической активности. Таким образом, боковая цепь F404 играет решающую роль в поддержании гидрофобных контактов, необходимых для стабильного перехода в каталитически активное состояние.

При замене F400A наблюдается небольшое снижение константы скорости ассоциации k_1 , но при этом резко возрастает константа скорости диссоциации k_{-1} , что уменьшает стабильность первичного комплекса. Вторая стадия связывания протекает медленнее, чем для фермента дикого типа, тогда как обратный процесс ускоряется. Такие изменения сдвигают равновесие в сторону неактивного комплекса, ослабляя способность фермент-субстратного комплекса переходить в каталитически компетентное состояние. В итоге K_d увеличивается до 37 мкМ, а наблюдаемая скорость включения dεATP падает почти

в 4 раза (0,012 против 0,05 у F400A и фермента WT). Это подтверждает важность F400 для стабилизации азотистого основания входящего нуклеотида.

4. Роль аминокислотных остатков Asp345 и Glu456 в субстратной специфичности TdT

Углубленный мутационный анализ двух аминокислотных остатков, расположенных в кармане связывания dNTP, а именно Asp395 и Glu456, был проведен для экспериментальной проверки их влияния на специфичность фермента по отношению к включаемому нуклеотиду. Для этой цели были созданы мутанты TdT, содержащие либо одинарную замену (D395N, D395E или E456N), либо двойную замену (D395N/E456N или D395K/E456Q) (Таблица 11). Эти аминокислотные замены были выбраны для перемещения отрицательного заряда (вариант D395E), его нейтрализации (вариант D395N), нейтрализации заряда и расширения внутреннего пространства (варианты E456N и D395N/E456N) или даже создания положительно заряженной области (вариант D395K/E456Q) в кармане связывания dNTP.

Таблица 11. Мутантные формы TdT, содержащие замены остатков Asp395 и Glu456

Аминокислотная замена	Последствия аминокислотных замен
D395N	Нейтрализация заряда Asp395
D395E	Перемещение заряда Asp395
D395K/E456Q	Изменение заряда Asp395 + нейтрализация заряда Glu456
E456N	Нейтрализация заряда Glu456, увеличение внутреннего объема dNTP – связывающего кармана
D395N/E456N	Нейтрализация заряда Asp395 и Glu456, увеличение внутреннего объема dNTP – связывающего кармана
D395N/E456Q	Нейтрализация заряда Asp395 и Glu456.

4.1 Влияние аминокислотных замен на структуру белка

Влияние внесенных аминокислотных замен на вторичную структуру вариантов TdT было проанализировано методом спектроскопии кругового дихроизма, а также определена температура плавления (T_m) с помощью дифференциального термического анализа (рис. 14). КД-спектры мутантных форм практически не отличались от спектра нативного белка, что указывает на отсутствие значительных изменений в их вторичной структуре (рис. 14А). Анализ термической стабильности показал, что наибольшее снижение устойчивости к

тепловой денатурации наблюдается для мутантных форм E456N и D395K/E456Q, тогда как замены D395N и D395E вызывают лишь умеренное уменьшение температуры плавления (рис. 14А, Таблица 12). Двойные мутантные формы D395N/E456Q и D395N/E456N в свою очередь сохраняют стабильность по сравнению с белком дикого типа.

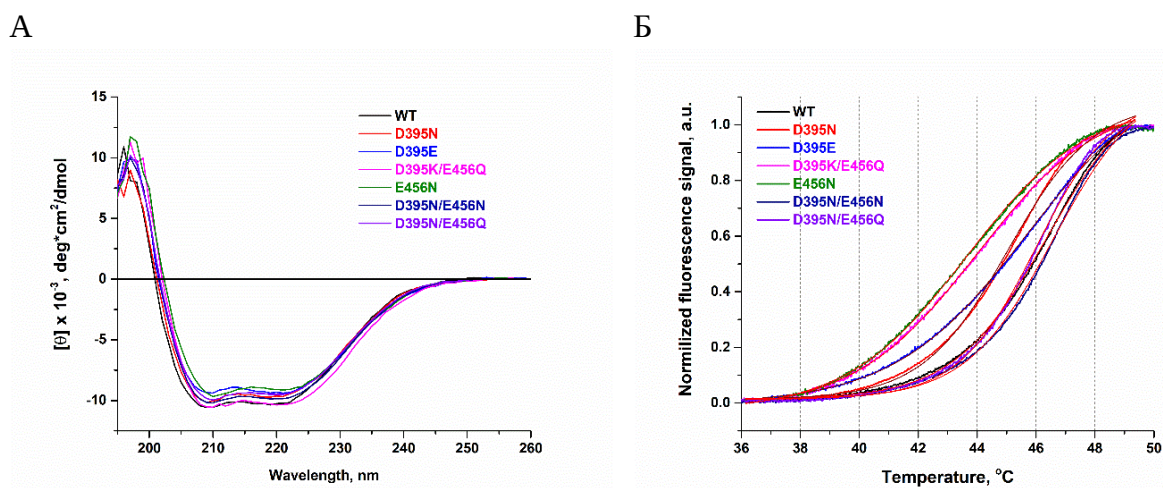


Рис. 14. Экспериментальная характеристика вторичной структуры мутантных форм TdT по сравнению с ферментом дикого типа. (А) Спектры кругового дихроизма TdT человека и мутантных форм, содержащих замены D395N, D395E, D395K/E456Q, E456N, D395N/E456N и D395N/E456Q. [TdT] = 2 мкМ, 25°C. (Б) Кривые плавления TdT WT и мутантных форм D395N, D395E, D395K/E456Q, E456N, D395N/E456N и D395N/E456Q. [TdT] = 10 мкМ.

Таблица 12. Температура плавления TdT WT и его мутантных форм

	WT	D395N	D395E	D395K/ E456Q	E456N	D395N/ E456N	D395N/ E456Q
T_m, °C	46,4 ± 0,1	45,0 ± 0,1	45,7 ± 0,1	44,0 ± 0,1	43,6 ± 0,1	46,6 ± 0,1	46,0 ± 0,1

4.2 Влияние внесенных замен на эффективность связывания с ДНК и Flu-dUTP

Сравнение параметров связывания форм TdT с праймером FAM-M44 показало, что большинство замен в позициях 395 и 456 лишь незначительно изменяют сродство фермента к ДНК. Замены D395N и особенно двойная D395N/E456N несколько усиливают связывание праймера, тогда как комбинация D395K/E456Q приводит к умеренному ослаблению. Для остальных вариантов (D395E, E456N, D395N/E456Q) сродство остаётся близким к дикому типу (рис. 15А, Б, Таблица 13). Анализ констант диссоциации с флуоресцентно-меченым Flu-

dUTP показал, что замена D395N сама по себе и в совокупности с заменой E456N приводит к увеличению сродства к нуклеозидтрифосфату в 1,5 раза (рис. 15В, Таблица 13). Вероятно, удаление отрицательного заряда сопровождается уменьшением электростатического отталкивания с отрицательно заряженным нуклеозидтрифосфатом. К такому же эффекту привело введение положительного заряда за счет замены D395K с одновременной потерей отрицательного заряда E456Q. В то же время мутантные формы, несущие замены D395E, E456N и двойная замена D395N/E456Q сохранили тот же уровень сродства к трифосфату что и белок дикого типа.

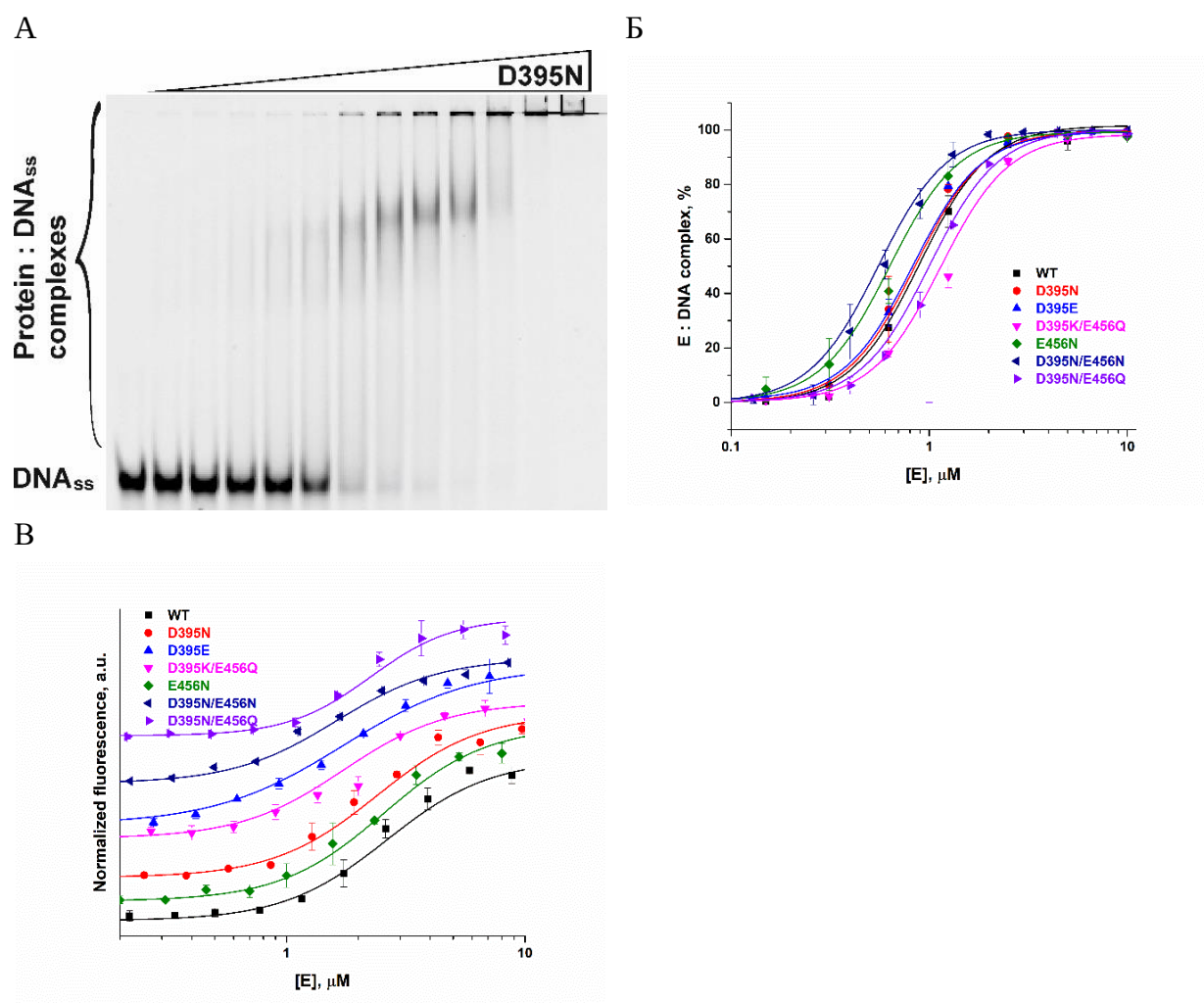


Рис. 15. Анализ связывания ДНК-праймера FAM-M44 и dNTP (Flu-dUTP) мутантными формами TdT. (А) Пример EMSA анализа, характеризующий связывание мутантной формы TdT D395N с FAM-M44 в присутствии ионов Mg^{2+} . (Б) Кривые титрования FAM-M44 всеми мутантными формами TdT. Диапазон концентраций фермента составлял от 0,016 мкМ до 10 мкМ. [FAM-M44] = 0,5 мкМ. (В) Кривые титрования MST, характеризующие взаимодействие TdT WT и мутантных форм с Flu-dUTP в присутствии ионов Mg^{2+} .

Таблица 13. Значение констант диссоциации комплексов TdT WT и мутантных форм с ДНК-праймером и Flu-dUTP

Мутантная форма TdT	K_d , мкМ; Flu-dUTP	K_d , мкМ; FAM-M44
WT	$2,6 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$
D395E	$2,4 \pm 0,2$	$1 \pm 0,1$
D395N	$1,7 \pm 0,2$	$0,73 \pm 0,04$
D395K/E456Q	$1,7 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
E456N	$2,6 \pm 0,3$	$1,11 \pm 0,04$
D395N/E456N	$1,6 \pm 0,2$	$0,72 \pm 0,03$
D395N/E456Q	$3,0 \pm 0,4$	$1,04 \pm 0,02$

4.3 Эффективность присоединения dNTP к растущей цепи

Анализ ПААГ показал (рис. 16), что в присутствии ионов Mg^{2+} замена D395N незначительно снижала процессивность включения dTTP, dGTP и dATP (но не dCTP), тогда как замены D395E и D395K/E456Q приводили к более выраженному эффекту. При смене металла-кофактора на ион Co^{2+} влияние одиночной замены D395N становилось незначительным, улучшалась эффективность присоединения dATP, dGTP и dTTP, а для dCTP происходил переход от дистрибутивного к процессивному типу синтеза ДНК. Двойная замена D395K/E456Q даже в этих условиях оставалась менее эффективной, тогда как в присутствии ионов Mn^{2+} происходило ещё больше усиление процессивности, что нивелировало различия между WT и мутантными формами. Мутантные формы E456N и D395N/E456N, за счёт нейтрализации заряда и расширения кармана, повышали процессивность присоединения нуклеотидов по сравнению с WT даже в присутствии ионов Mg^{2+} (например, удлинение праймера до 10 dT или 6 dC против 6 и 3 у WT). В присутствии же ионов Co^{2+} или Mn^{2+} оба варианта демонстрировали эффективный процессивный синтез с включением $\geq 8-10$ нуклеотидов независимо от природы dNTP.

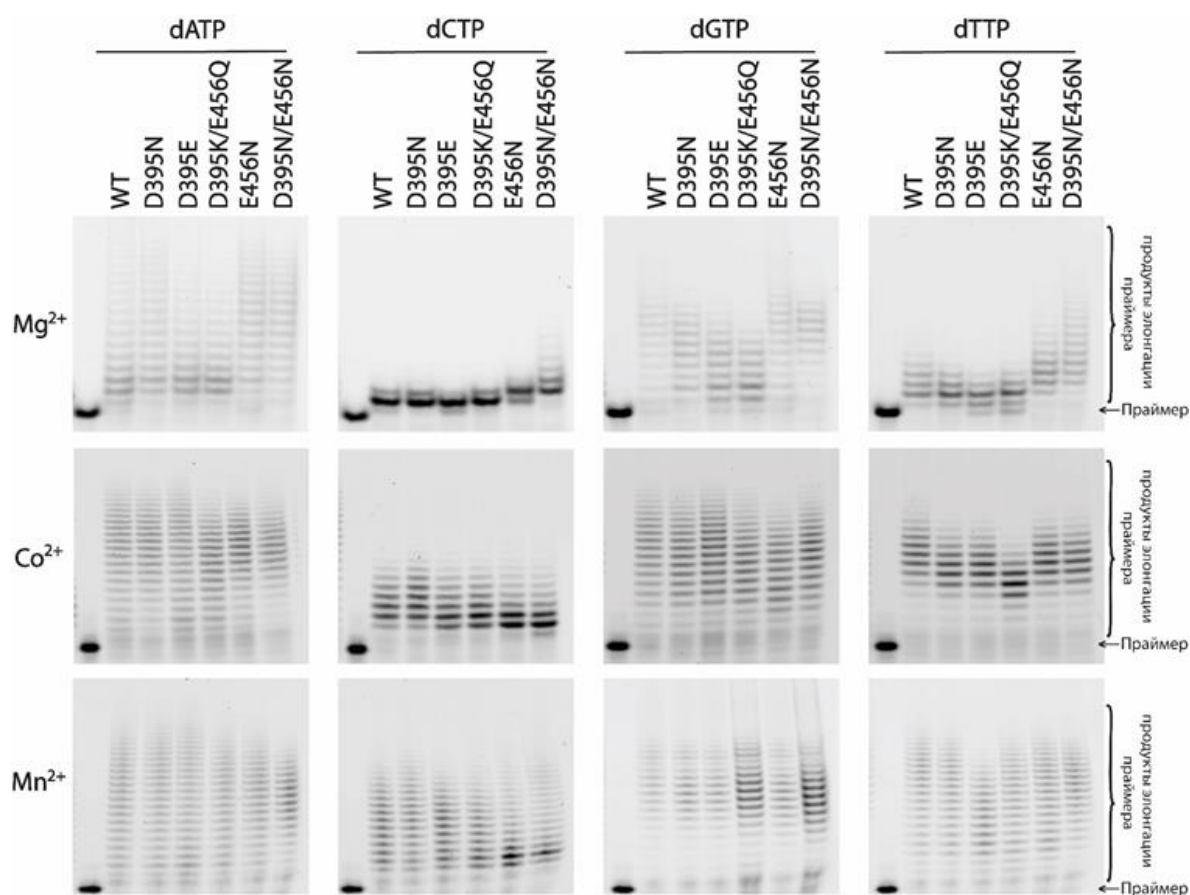
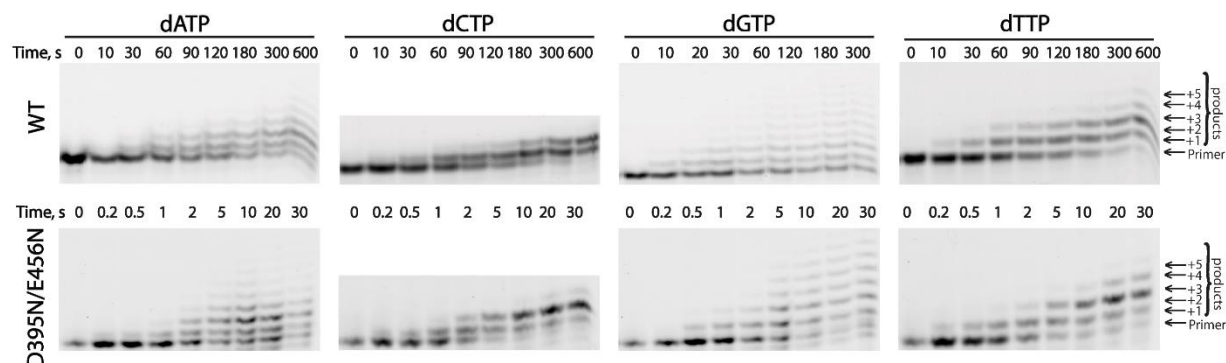


Рис. 16. Сравнение субстратной специфичности TdT WT и мутантных форм D395N, D395E, E456N, D395K/E456Q и D395N/E456N в присутствии ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} и Co^{2+} . $[TdT] = [ДНК] = 1,0$ мкМ, $[dNTP] = 10$ мкМ, время реакции - 1 мин.

Для оценки скорости включения нуклеотидов мутантными формами мы проанализировали накопление продуктов присоединения природных нуклеотидов в ПААГ (рис. 17). Константы скорости включения первого нуклеотида, определенные по [ур. 4](#) представлены в [Таблице 14](#).

А



Б

В

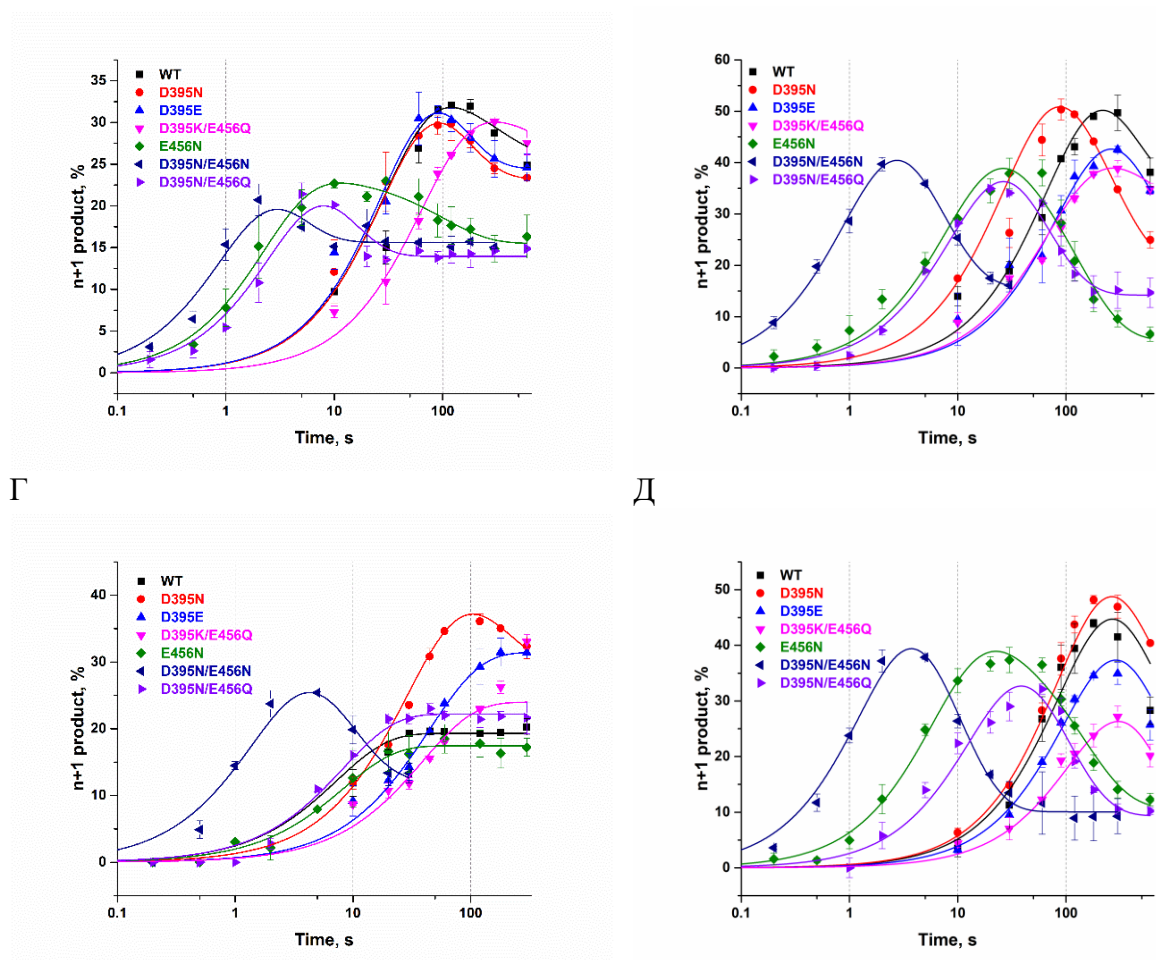


Рис. 17. Анализ продуктов присоединения dNTP к ДНК-праймеру в присутствии ионов Mn^{2+} . (А) Электрофореграммы разделения продуктов реакции. Кривые накопления n+1 продукта присоединения dATP (Б), dCTP (В), dGTP (Г), dTTP (Д). Условия реакции: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), $[TdT] = [ДНК-праймер] = 1,0$ мкМ, $[dNTP] = 2,0$ мкМ, $[Mn^{2+}] = 1,0$ мМ.

Таблица 14 . Наблюдаемые константы скорости образования n+1 продукта реакции

$k_{набл}, c^{-1}$	WT	D395N	D395E	D395K/ E456Q	E456N	D395N/ E456N	D395N/ E456Q
dATP	$0,033 \pm 0,007$	$0,030 \pm 0,004$	$0,03 \pm 0,01$	$0,015 \pm 0,006$	$0,43 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,1$	$0,31 \pm 0,02$
dCTP	$0,012 \pm 0,002$	$0,031 \pm 0,003$	$0,010 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,003$	$0,11 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,07$	$0,09 \pm 0,01$
dGTP	$0,14 \pm 0,02$	$0,037 \pm 0,002$	$0,022 \pm 0,005$	$0,025 \pm 0,005$	$0,12 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,01$
dTTP	$0,009 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001$	$0,0077 \pm 0,0008$	$0,0064 \pm 0,0006$	$0,16 \pm 0,01$	$0,61 \pm 0,09$	$0,06 \pm 0,01$
$k_{набл}$ рассчитана по ур. 4							

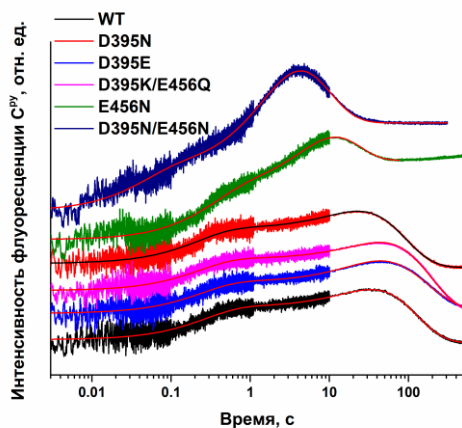
Из полученных данных можно сделать вывод, что для фермента дикого типа в присутствии ионов Mg^{2+} наблюдается выраженное предпочтение к dGTP, тогда как

включение dATP, dCTP и особенно dTTP протекает значительно медленнее. Замены D395N и D395E снижают скорость включения dGTP и выравнивают скорости для dATP и dCTP, тогда как двойная замена D395K/E456Q нивелирует специфичность к природе азотистого основания при общем падении активности. Напротив, замена E456N резко смещает предпочтение в сторону dATP, а комбинация D395N/E456N делает фермент практически универсальным, повышая процессивность для всех четырёх нуклеотидов. Мутантная форма, содержащая двойную замену D395N/E456Q, занимает промежуточное положение: она более активна по сравнению с ферментом WT, но сохраняет избирательность к пуриновым нуклеотидам.

4.4 Конформационная динамика ДНК в ходе включения флуоресцентных аналогов нуклеозидтрифосфатов

Для анализа влияния аминокислотных замен в кармане связывания dNTP на взаимодействие фермента с субстратом был проведён анализ присоединения dC^{Py}TP к ДНК-праймеру в присутствии Mg²⁺ (рис. 18А). Как для дикого типа, так и для всех мутантов наблюдались три стадии изменения сигнала флуоресценции, соответствующие связыванию нуклеотида, образованию каталитического комплекса и присоединению второго флуоресцентного нуклеотида [27]. Кинетические кривые были аппроксимированы [ур. 6](#), что позволило рассчитать наблюдаемые константы скорости всех стадий и оценить относительную активность мутантных форм фермента.

А



Б

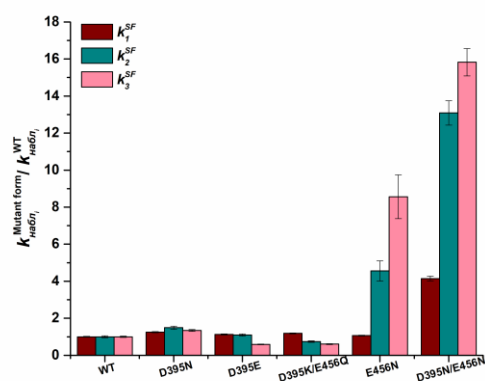
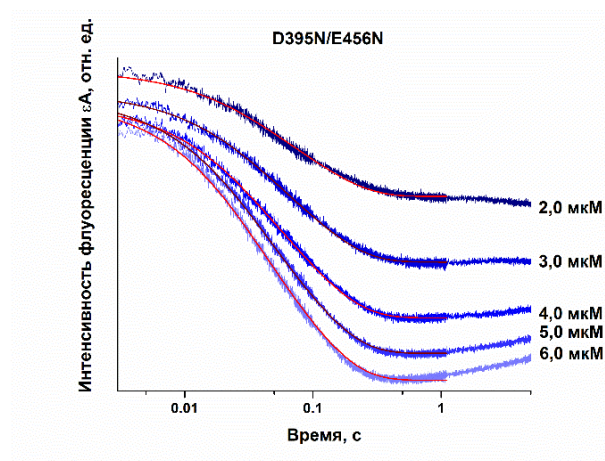


Рис. 18. (А) Изменение интенсивности флуоресценции C^{Py} при взаимодействии предформированного комплекса [TdT-M6] с dC^{Py}TP. [dC^{Py}TP] = 3,0 мкМ, [M6] = 1,0 мкМ, [TdT] = 3 мкМ. (Б) Сравнение наблюдаемых констант стадий взаимодействия предформированного комплекса [TdT-M6] с dC^{Py}TP.

Сравнение мутантных форм показало, что замены D395N, D395E и D395K/E456Q лишь незначительно влияют на связывание и включение dC^{Py}TP; при этом у вариантов D395E и D395K/E456Q отмечено небольшое (<2 раз) снижение скорости присоединения dC^{Py}TP, согласующееся с данными ПААГ (Таблица 14, рис. 18Б). Напротив, замена E456N не приводила к изменению скорости первичного связывания, но увеличивала скорость образования каталитического комплекса и стадии присоединения dC^{Py}TP в ~4 и ~8 раз, соответственно. Наибольший эффект наблюдался при двойной замене D395N/E456N: связывание усиливалось в ~4 раза, формирование комплекса — в ~13 раз, а присоединение — в ~16 раз, что, вероятно, обеспечивает переход фермента из дистрибутивного в процессивный режим удлинения ДНК.

Так же мы проанализировали влияние аминокислотных замен D395N/E456N на все стадии каталитического цикла встраивания dεАТР в растущую цепь. На кинетических кривых, характеризующих взаимодействие предформированного комплекса [D395N/E456N-M6] с dεАТР видна фаза падения сигнала до 1 с, которая, по-видимому, соответствует процессу связывания dεАТР (рис. 19А). Падение сигнала описывали **Ошибка! Источник ссылки не найден.**, включающей стадию первичного связывания и формирования предкаталитического комплекса (Таблица 15). Так же мы получили зависимость наблюдаемой константы скорости включения dεАТР (рис. 19Б) от концентрации ферментов TdT WT и D395N/E456N, которую аппроксимировали по [ур. 5](#) и получили значение каталитической константы скорости k_{pol} и константы диссоциации с dεАТР $K^{dεАТР}_d$ в соответствии со [схемой 2](#).

А



Б

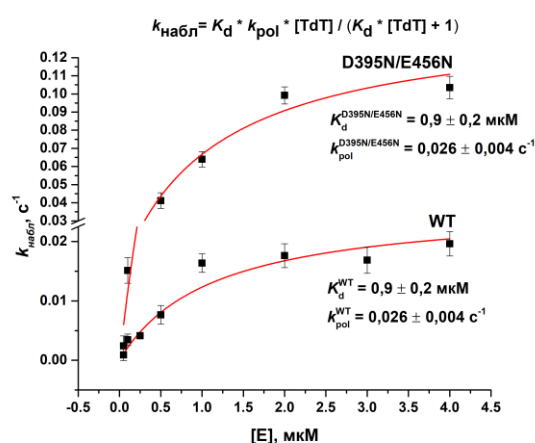


Рис. 19. (А) Изменение интенсивности флуоресценции εА при взаимодействии dεАТР с предформированным комплексом TdT D395N/E456N-M6. [dεАТР] = 3,0 мкМ, [M6] = 1,0

мкМ, концентрация фермента указана на рисунке. (Б) Зависимость наблюдаемых констант скорости образования $n+1$ продукта от концентрации TdT D395N/E456N.

Схема 2. Схема, описывающая механизм присоединения dεATP к ДНК-праймеру TdT.

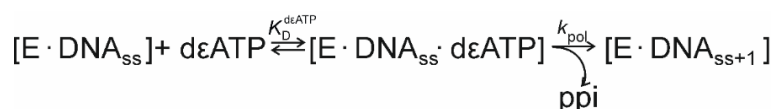


Таблица 15. Константы скорости стадий взаимодействия TdT WT и мутантных форм с dεATP в составе предформированных комплексов с ДНК

Константы	WT	D395N/E456N
$k_1, (\text{мкМ} \cdot \text{с})^{-1}$	$0,61 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,05$
$k_{-1}, \text{с}^{-1}$	$12,2 \pm 0,3$	13 ± 1
$K_1, \text{мкМ}^{-1}$	$0,050 \pm 0,005$	$0,093 \pm 0,004$
$k_2, \text{с}^{-1}$	$11,4 \pm 0,5$	$16,0 \pm 0,6$
$k_{-2}, \text{с}^{-1}$	$6,8 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,3$
K_2	$1,7 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,06$
$K^{d\epsilon\text{ATP}}_d, \text{мкМ}$	7 ± 1	$2,2 \pm 0,4$

$$K^{d\epsilon\text{ATP}}_d = 1/(K_1 + K_1 \times K_2), K_i = k_i / k_{-i}.$$

Из полученных данных можно сделать заключение о том, что двойная замена D395N/E456N приводит к существенному улучшению параметров связывания фермента с dεATP как за счёт ускорения образования первичного комплекса, так и последующего образования предкаталитического комплекса при одновременном снижении константы скорости обратной реакции. Константа равновесия первой стадии K_1 увеличивается почти в 2 раза, а второй K_2 — более чем в 2 раза, что приводит к более чем трёхкратному росту общего сродства. Кроме того, по данным анализа ПААГ наблюдается 5-кратный рост константы полимеризации k_{pol} . Эти данные указывают, что комбинация нейтрализации заряда с увеличением внутреннего объема dNTP-связывающего кармана способствует стабилизации каталитически активного комплекса TdT с нуклеотидом и значительно повышает эффективность катализа.

ВЫВОДЫ

- 1) Впервые проведен функциональный анализ аминокислотных остатков R336, H342 и D345, входящих в состав dNTP-связывающего кармана TdT человека и участвующих во взаимодействии с фосфатными группами входящего dNTP и 3'-концевого участка ДНК-праймера. Показано, что замены R336Q и D345E оказывают влияние как на эффективность связывания с ДНК-праймером и входящим dNTP, так и на эффективность каталитической реакции. Установлено, что замена H342A также приводит к значительному снижению каталитической активности при сохранении общей конфигурации активного центра. Такой эффект может быть связан с увеличением пластичности dNTP-связывающего кармана за счёт потери контактов имидазольного остатка H342 с dNTP и ДНК-праймером. Показано, что негативное влияние замен H342A и D345E на активность фермента может уменьшаться в присутствии ионов Mn^{2+} , стимулирующих эффективность присоединения всех dNTP, тогда как дестабилизация, вызванная заменой R336Q, ионами металла не компенсируется.
- 2) Анализ аминокислотных остатков, формирующих гидрофобную часть dNTP-связывающего кармана, выявил, что остатки L397 и F400 критичны для позиционирования азотистого основания входящего dNTP в активном центре и поддержания общей эффективности катализа, а остаток F404 необходим для стабилизации гидрофобных взаимодействий в dNTP-связывающем кармане, сохранение которых обеспечивает активность при замене на триптофан. Установлено, что остаток D472, участвующий в стабилизации закрытой конформации фермента, играет ключевую роль на второй стадии связывания dNTP, обеспечивая позиционирование трифосфатной группы и металла кофактора в активном центре. Показано, что нарушение взаимодействий за счет аминокислотных замен снижает как процессивность, так и скорость включения нуклеотидов в присутствии ионов Mg^{2+} в качестве кофактора реакции, а использование ионов Mn^{2+} и Co^{2+} может компенсировать снижение ферментативной активности. Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что сохранение гидрофобных взаимодействий в dNTP-связывающем кармане и его жёсткость играют важное значение для правильной координации dNTP и эффективного функционирования TdT.
- 3) Мутационный и кинетический анализ влияния одиночных и двойных замен аминокислотных остатков D395 и E456, образующих сеть водородных связей с азотистым основанием входящего dNTP, позволил установить, что замены D395N, D395E и D395K/E456Q, приводящие к нейтрализации, перемещению и изменению

заряда в положении D395 незначительно уменьшают активность фермента. В то время как замены E456N, D395N/E456Q и D395N/E456N, приводящие как к нейтрализации заряда в положении E456, так и увеличению внутреннего объема dNTP-связывающего кармана приводят к увеличению активности TdT человека в присутствии ионов Mg^{2+} , изменению субстратной специфичности фермента по отношению к природным dNTP и переходу в процессивный режим удлинения ДНК-праймера.

Публикации по теме диссертации

1. Kuznetsova A. A., **Senchurova S. I.**, Gavrilova A. A., Tyugashev T. E., Mikushina E. S., и Kuznetsov N. A., Substrate Specificity Diversity of Human Terminal Deoxynucleotidyltransferase May Be a Naturally Programmed Feature Facilitating Its Biological Function // Int J Mol Sci. 2024. Т. 25, № 2. *Опубликована*
2. **Сенчурова С.И.**, Тюгашев Т.Е., Кузнецов Н.А., Координация нуклеозидтрифосфатов в активном центре TdT человека при матрица-независимом синтезе ДНК. // Биохимия. 2025. *В редакции.*
3. **Сенчурова С.И.**, Тюгашев Т.Е., Кузнецов Н.А. Предстационарный кинетический анализ механизмов координации dNTP в активном центре TdT человека. *Подготовка рукописи*
4. **Сенчурова С.И.**, Тюгашев Т.Е., Кузнецов Н.А. Роль гидрофобных взаимодействий и структурной жёсткости dNTP-связывающего кармана TdT человека в обеспечении катализа. *Подготовка рукописи*

Тезисы конференций:

1. Senchurova S.I., Kuznetsova A.A., Laprina D.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The role of active-site amino acids in template-independent DNA synthesis by human terminal deoxynucleotidyl transferase. BGRS/SB-2022 July
2. Кузнецова А.А., Сенчурова С.И., Тюгашев Т.Е., Кузнецов Н.А. Кинетические особенности безматричного синтеза ДНК, катализируемого терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой человека TdT. БИОКАТАЛИЗ-2023 Июнь
3. Сенчурова С. И., Кузнецова А. А., Тюгашев Т. Е., Кузнецов Н. А. Роль аминокислотных остатков D395 и E456 терминальной дезоксинуклеотидил трансферазы человека в

механизме узнавания нуклеозидтрифосфатов. От микробиологии к генетическим технологиям - 2023 Сентябрь

4. Сенчурова С. И., Кузнецова А. А., Тюгашев Т. Е., Кузнецов Н. А. Мутационный и кинетический анализ полимеразной активности TdT человека. Материалы конференции «Физико-химическая биология»
5. Senchurova S.I, Kuznetsova A.A., Tyugashev T.E., Kuznetsov N.A. The Role of Amino Acid Residues D395 and E456 of Human Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in The Mechanism of dNTP Recognition. FAOBMB-2023 (Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists) Abstract & Proceeding

Список литературы

1. Chiruvella K.K., Liang Z., Wilson T.E. Repair of double-strand breaks by end joining. // Cold Spring Harb Perspect Biol. United States, 2013. Т. 5, № 5. С. a012757.
2. Karanam K. и др. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. // Mol Cell. United States, 2012. Т. 47, № 2. С. 320–329.
3. Difilippantonio M.J. и др. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. // Nature. England, 2000. Т. 404, № 6777. С. 510–514.
4. Gu J., Lieber M.R. Mechanistic flexibility as a conserved theme across 3 billion years of nonhomologous DNA end-joining. // Genes Dev. United States, 2008. Т. 22, № 4. С. 411–415.
5. Kato K.I. и др. Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal deoxynucleotidyltransferase. // Journal of Biological Chemistry. 1967. Т. 242, № 11. С. 2780–2789.
6. Brack C. и др. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination // Cell. Cell, 1978. Т. 15, № 1. С. 1–14.
7. Saito H. и др. A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes // Nature. Nature, 1984. Т. 312, № 5989. С. 36–40.
8. Sadofsky M. The RAG proteins in V(D)J recombination: More than just a nuclease // Nucleic Acids Res. 2001. Т. 29, № 7. С. 1399–1409.
9. Schatz D.G., Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination // Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group, 2011. Т. 11, № 4. С. 251–263.
10. Janeway C. и др. Immunobiology: the immune system in health and disease. Garland Pub. New York, 2001. Т. 2.
11. Lieber M.R. и др. Lymphoid V(D)J recombination: nucleotide insertion at signal joints as well as coding joints. // Proc Natl Acad Sci U S A. United States, 1988. Т. 85, № 22. С. 8588–8592.
12. Mickelsen S. и др. Modulation of terminal deoxynucleotidyltransferase activity by the DNA-dependent protein kinase. // J Immunol. United States, 1999. Т. 163, № 2. С. 834–843.

13. Feeney A.J. Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. // J Exp Med. United States, 1990. T. 172, № 5. C. 1377–1390.
14. Bangs L.A., Sanz I.E., Teale J.M. Comparison of D, JH, and junctional diversity in the fetal, adult, and aged B cell repertoires. // J Immunol. United States, 1991. T. 146, № 6. C. 1996–2004.
15. Basu M., Hegde M. V, Modak M.J. Synthesis of compositionally unique DNA by terminal deoxynucleotidyl transferase. // Biochem Biophys Res Commun. United States, 1983. T. 111, № 3. C. 1105–1112.
16. Delarue M. и др. Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: murine terminal deoxynucleotidyltransferase. // EMBO J. England, 2002. T. 21, № 3. C. 427–439.
17. Steitz T.A., Steitz J.A. A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA // Proc Natl Acad Sci U S A. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. T. 90, № 14. C. 6498–6502.
18. Kuznetsova A.A. и др. Insight into the mechanism of DNA synthesis by human terminal deoxynucleotidyltransferase // Life Sci Alliance. 2022. T. 5, № 12. C. 1–16.
19. Chang L.M.S., Bollum F.J. Multiple roles of divalent cation in the terminal deoxynucleotidyltransferase reaction // Journal of Biological Chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 1990. T. 265, № 29. C. 17436–17440.
20. Kuznetsova A.A. и др. Insight into the mechanism of DNA synthesis by human terminal deoxynucleotidyltransferase // Life Sci Alliance. 2022. T. 5, № 12. C. 1–16.
21. Gouge J. и др. Structures of intermediates along the catalytic cycle of terminal deoxynucleotidyltransferase: Dynamical aspects of the two-metal ion mechanism // J Mol Biol. Elsevier Ltd, 2013. T. 425, № 22. C. 4334–4352.
22. Delarue M. и др. Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: Murine terminal deoxynucleotidyltransferase // EMBO Journal. 2002. T. 21, № 3. C. 427–439.
23. Sarac I., Hollenstein M. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in the Synthesis and Modification of Nucleic Acids // ChemBioChem. 2019. T. 20, № 7. C. 860–871.
24. Kuznetsova A.A. и др. Insight into the mechanism of DNA synthesis by human terminal deoxynucleotidyltransferase // Life Sci Alliance. 2022. T. 5, № 12. C. 1–16.
25. Kuzmič P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase // Anal Biochem. 1996. T. 237, № 2. C. 260–273.

26. Gouge J. и др. Structural basis for a novel mechanism of DNA bridging and alignment in eukaryotic DSB DNA repair // *EMBO J.* 2015. Т. 34, № 8. С. 1126–1142.
27. Kuznetsova A.A. и др. Substrate Specificity Diversity of Human Terminal Deoxynucleotidyltransferase May Be a Naturally Programmed Feature Facilitating Its Biological Function // *Int J Mol Sci.* 2024. Т. 25, № 2.
28. Berdis A.J., McCutcheon D. The Use of Non-natural Nucleotides to Probe Template-Independent DNA Synthesis // *ChemBioChem.* John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Т. 8, № 12. С. 1399–1408.
29. Horáková P. и др. Tail-labelling of DNA probes using modified deoxynucleotide triphosphates and terminal deoxynucleotidyl transferase. Application in electrochemical DNA hybridization and protein-DNA binding assays. // *Org Biomol Chem.* England, 2011. Т. 9, № 5. С. 1366–1371.
30. Hollenstein M. Deoxynucleoside triphosphates bearing histamine, carboxylic acid, and hydroxyl residues-synthesis and biochemical characterization // *Org Biomol Chem.* Org Biomol Chem, 2013. Т. 11, № 31. С. 5162–5172.
31. Röthlisberger P. и др. Facile immobilization of DNA using an enzymatic his-tag mimic // *Chemical Communications.* Royal Society of Chemistry, 2017. Т. 53, № 97. С. 13031–13034.
32. Gouge J. и др. Structures of intermediates along the catalytic cycle of terminal deoxynucleotidyltransferase: Dynamical aspects of the two-metal ion mechanism // *J Mol Biol.* Elsevier Ltd, 2013. Т. 425, № 22. С. 4334–4352.
33. Xu W., Chan K.M., Kool E.T. Fluorescent nucleobases as tools for studying DNA and RNA // *Nature Chemistry.* Nature Publishing Group, 2017. Т. 9, № 11. С. 1043–1055.



Отчет о проверке

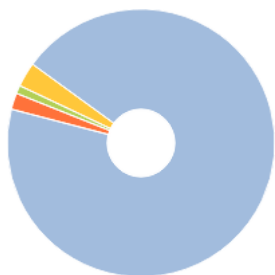
Автор: Сенчурова Светлана Игоревна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: ВКР_Сенчурова С.И_wg.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
1,95%



Оригинальность:
94,5%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0,34%



Самоцитирования:
3,21%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

- Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 36

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 09.09.2025 12:11:37

Дата корректировки: 09.09.2025 12:19:54

Количество страниц: 43

Символов в тексте: 76877

Слов в тексте: 11279

Число предложений: 723

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да
Исключение элементов документа из проверки: Нет
Выполнено распознавание текста (OCR): Да
Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

Модули поиска: Цитирование, Рувики, Диссертации НББ, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Переводные заимствования, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Коллекция НБУ, Медицина, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Шаблонные фразы, IEEE, ИПС Адилет, Сводная коллекция ЭБС, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразирования по коллекции IEEE, СПС ГАРАНТ: аналитика, Патенты СССР, РФ, СНГ, Публикации eLIBRARY, СМИ России и СНГ, Кольцо вузов, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Публикации РГБ, Переводные заимствования IEEE, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Интернет Плюс

❗ **Модули, недоступные в рамках тарифа:** Интернет Free

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	5,9%	0%	Мутационный и кинетический ан...	25 Ноя 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание растворов и реактивов, не является плагиатом
[02]	3,42%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	21 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание растворов и реактивов, не является плагиатом
[03]	3,02%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	16 Фев 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание растворов и реактивов, не является плагиатом
[04]	2,87%	0%	Диплом Сенчурова С.И.	31 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[05]	2,62%	1,79%	Роль аминокислотных остатков D...	19 Окт 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[06]	2,35%	0%	Диплом Бойченко С.С.	26 Мая 2022	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[07]	2,28%	0%	Диплом Сенчурова С.И.	31 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[08]	2,06%	0%	Диплом Бойченко С.С.	26 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[09]	1,8%	0%	Яковлев, Данила Алексеевич Кон... http://dlib.rsl.ru	18 Сен 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание растворов и реактивов, не является плагиатом
[10]	1,58%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	21 Фев 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	1,27%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	19 Янв 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[12]	1,25%	0%	Пушкаревская АА - диплом_бакал...	26 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание растворов и реактивов, не является плагиатом

[13]	1,24%	0%	davletgildeeva_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	01 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[14]	1,2%	0%	Кузнецов, Никита Александрович... http://dlib.rsl.ru	25 Авг 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[15]	1,17%	0%	%D0%BD%D0%B0%D1%83%D1%8... http://niboch.nsc.ru	17 Июн 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[16]	1,08%	0%	Кузнецов, Никита Александрович... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2007	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[17]	1,07%	0%	Дипломная работа Укладова Егора	21 Мая 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[18]	1,01%	1,01%	https://mdpi-res.com/d_attachmen... https://mdpi-res.com	19 Янв 2024	Переводные заимствования	
[19]	0,95%	0,53%	Мутационный и кинетический ан...	20 Сен 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[20]	0,91%	0%	Алексеева, Ирина Владимировна... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[21]	0,89%	0%	Давлетгильдеева, Анастасия Тим... http://dlib.rsl.ru	18 Сен 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[22]	0,89%	0,89%	Роль аминокислотных остатков D...	19 Окт 2023	Публикации eLIBRARY	
[23]	0,79%	0%	Диплом_Соловьев 1.3_ — ФИНАЛ	22 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[24]	0,79%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,71%	0%	Диссертация на тему «Конформа... https://dissercat.com	25 Окт 2022	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,66%	0%	ЯкимовДВ_Диплом_финальный	09 Июн 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[27]	0,65%	0%	Ковешникова Е.А. диплом	31 Мая 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	0,63%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	20 Авг 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,59%	0%	Дипломная работа-Чжао Минсин	22 Мая 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[30]	0,58%	0%	Конформационная динамика ДН... http://niboch.nsc.ru	11 Июл 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,58%	0%	СоловьеваМА_Диплом_2025	15 Мая 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание растворов и реактивов, не является плагиатом
[32]	0,56%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	20 Авг 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[33]	0,56%	0%	Диплом_Соловьев 1.3_ — ФИНАЛ	22 Мая 2022	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методик, не является плагиатом
[34]	0,53%	0%	Судебная экспертиза контролиру...	24 Июл 2025	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[35]	0,49%	0%	Мутационный и кинетический ан...	20 Сен 2024	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[36]	0,47%	0%	pcb_2024_sbornik.pdf http://niboch.nsc.ru	14 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[37]	0,45%	0%	ЯкимовДВ_Диплом_финальный	09 Июн 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,42%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	09 Апр 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39]	0,42%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	09 Мар 2022	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[40]	0,37%	0%	Пушкарёвская АА - диплом_бакал...	26 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,35%	0,35%	Рациональный дизайн терминал...	14 Дек 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[42]	0,34%	0,34%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	
[43]	0,34%	0,34%	2025.05.15_диплом_Колесникова...	15 Мая 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[44]	0,32%	0,25%	Ковешникова Е.А. диплом	31 Мая 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[45]	0,29%	0%	Лазерные методы дистанционно...	19 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,28%	0%	Лилия_Аксенова_диплом	11 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,28%	0%	High pressure inactivation kinetics ... https://doi.org	22 Окт 2019	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,27%	0%	Бурнышева, Ксения Михайловна ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2016	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,27%	0%	МирошниковАА_диплом_магистр...	21 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,25%	0%	Особенности взаимодействия ад... http://elibrary.ru	01 Янв 2017	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,23%	0%	In silico получение и анализ мута...	19 Июл 2025	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,21%	0%	https://papyrus.bib.umontreal.ca/x... https://papyrus.bib.umontreal.ca	03 Сен 2024	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,2%	0%	Список кавалеров ордена Алекса... https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,2%	0%	Формирование подходов к оценк... https://book.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,2%	0%	Способ очистки вируса осповакц... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,2%	0%	Алкилирующие фторированные ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,2%	0%	Средство для нейтрализации вир... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,2%	0%	Способ получения наноразмерн... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,2%	0%	Новые 5-модифицированные пи... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,2%	0%	Патентованные инновации в мо... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,2%	0%	Три бердских предприятия назва... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,2%	0%	Президент Российской Федераци... http://dou.nso.ru	02 Июл 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,2%	0%	Дайджест решений в сфере конт... http://regionfas.ru	12 Янв 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,2%	0%	Дайджест решений в сфере конт... http://novosibirsk.bezformata.ru	12 Янв 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,2%	0%	ИХБФМ_ПушкарёвскаяА.А.	30 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,2%	0%	Государственная фармакопея Ро... http://ivo.garant.ru	15 Мая 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,2%	0%	Государственная фармакопея Ро... http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[68]	0,2%	0%	Приказ Министерства здравоохранения... http://ivo.garant.ru	26 Дек 2018	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,2%	0%	Олжаев, Фархад Сайдикаримови... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,2%	0%	Черноносков, Александр Анатольевич... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,15%	0%	Гаврилова АА	24 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,15%	0%	Рекомбинантная двухдоменная л... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,13%	0%	Всероссийская научно-практическая конференция... http://emil.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,13%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,12%	0%	Acta Naturae. 2017. Т. 9, № 1(32) http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,12%	0%	Поиск поврежденных участков ДНК... http://elibrary.ru	03 Янв 2017	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,11%	0%	Петрова, Ольга Алексеевна Струков... http://dlib.rsl.ru	18 Сен 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Сенчунова Светлана Игоревна

«Кинетические механизмы безматричного синтеза нуклеиновых кислот ДНК-
полимеразами семейства X»

Оригинальность работы составляет 94.5%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко