

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

На правах рукописи

Яковлев Данила Алексеевич

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Исследование структурно-кинетических
особенностей ферментов эпигенетической
регуляции

Направление подготовки

04.06.01 Химические науки

Направленность

02.00.10 Биоорганическая химия

Новосибирск, 2019

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Стабильность генетической информации в живой клетке – ключ к ее нормальному функционированию. Носитель этой информации – ДНК – единственная биологическая молекула, которая не может быть полностью обновлена и заменена в отличие от других биополимеров, так как на протяжении всей жизни в большинстве клеток она представлена только одним экземпляром (материнской и отцовской ДНК, которые считаются различными).

ДНК в клетке постоянно подвергается разрушающим воздействиям: как химическому (эндо- и экзогенному) [1–5], так и физическому (УФ и ионизирующее излучение) [2,6]; в результате которых в молекуле могут появляться повреждения. ДНК накапливает повреждения на протяжении всей жизни организма, при этом сохранность ее строения определяется только системой собственной репарации. Нарушение процессов репарации, а также возникновение ошибок в ходе репликации, приводит к появлению мутаций, которые закрепляются в следующих поколениях клеток.

Суммарное количество спонтанных повреждений ДНК может достигать порядка 10^5 на клетку в день, а нахождение в течение дня под ярким солнечным светом дополнительно индуцирует до 10^5 фотосшивок в каждой клетке кожи [7]. По размеру повреждения можно разделить на крупные (разрывы цепи, сшивки, объемные аддукты) и небольшие, которые затрагивают только азотистое основание. В соответствии с разными типами повреждений выделяют несколько путей репарации ДНК [8].

Считается, что по пути эксцизионной репарации оснований ДНК удаляется большинство необъемных повреждений азотистых оснований и AP-сайты. Ключевыми ферментами в этом цикле являются ДНК-гликозилазы, которые узнают поврежденный нуклеотид. Несмотря на большой интерес к исследованию механизмов и выяснению природы высокой специфичности ферментов репарации и, в том числе, ДНК-гликозилаз, непонятным остается вопрос, каким образом они осуществляют поиск и узнавание поврежденных оснований в ДНК. Не установлен механизм, обеспечивающий высокую селективность и субстратную специфичность ферментов репарации к своим субстратам.

Цель работы

Целью работы является установление кинетических механизмов конформационных переходов фермента и ДНК в процессах, катализируемых урацил-ДНК-гликозилазами человека MBD4 и SMUG1 и выявление общих закономерностей процессов образования каталитически активных комплексов ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам.

Задачи работы

Для выполнения поставленной цели решались следующие задачи:

- Изучить уровень каталитической активности (k_{obs}) ферментов MBD4 и SMUG1 по отношению к ДНК, содержащей урацил.

- Провести анализ конформационной динамики ферментов MBD4 и SMUG1 в процессе взаимодействия с ДНК методом остановленной струи с наблюдением за изменениями флуоресценции остатков триптофана в белке.
- Провести анализ конформационной динамики ДНК при взаимодействии с ферментом методом остановленной струи с наблюдением за изменением флуоресцентных и FRET-меток, введенных в ДНК.
- Построить модель структуры комплексов SMUG1 дикого типа и мутантных форм SMUG1 F98W, H239A, R243A с ДНК-субстратом.
- Изучить влияние замен F98W, H239A, R243A на активность фермента SMUG1 и роль этих остатков в процессах узнавания ДНК и катализа.
- Сформулировать кинетический механизм взаимодействия ферментов MBD4 и SMUG1 с ДНК и описать кинетику конформационных переходов в процессе реакций.

Результаты работы

- Детально описана кинетика конформационных переходов ферментов и субстратов в процессах взаимодействия ферментов MBD4 и SMUG1 с ДНК.
- Установлена зависимость скорости работы MBD4 от длины ДНК-субстрата.
- Построена модель структуры свободного SMUG1 и его комплекса с ДНК-субстратом.
- Установлена роль некоторых аминокислотных остатков SMUG1 в поиске повреждения и катализе.

Научная новизна работы

Впервые охарактеризована кинетика конформационных превращений ферментов человека MBD4 и SMUG1 и их субстратов в процессе взаимодействия. Впервые получены модели комплексов SMUG1 с ДНК-субстратом.

Публикации и апробация работы

По материалам научной работы опубликовано 2 статьи в рецензируемых научных журналах. Основные результаты были представлены на 53-ой Международной Научной Студенческой Конференции (Новосибирск, Россия, 2015), международном симпозиуме «Белки и пептиды – 2015» (Новосибирск, Россия, 2015), Конгрессе FEBS – 2017 (Иерусалим, Израиль, 2017), симпозиуме «Белки и пептиды – 2017» (Москва, Россия, 2017), Конгрессе FEBS – 2018 (Прага, Чехия, 2018).

Публикации по теме работы

Статьи

1. Kuznetsova AA, Iakovlev DA, Misovets IV, Ishchenko AA, Saparbaev MK, Kuznetsov NA, Fedorova OS. Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1. // Mol Biosyst. 2017;13(12):2638-2649.
2. D. A. Yakovlev, A. A. Kuznetsova, O. S. Fedorova, and N. A. Kuznetsov. Search for Modified DNA Sites with the Human Methyl-CpG-Binding Enzyme MBD4 // Acta Naturae. 2017; 9(1): 88–98.

Тезисы конференций

1. Яковлев Д.А., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Поиск поврежденных участков ДНК метил-СрG-связывающим ферментом человека MBD4 — Симпозиум “Белки и Пептиды”, Новосибирск, 2015
2. Яковлев Д. А., Кладова О. А., Кузнецов Н. А., Федорова О. С. Влияние AP-эндонуклеазы APE1 на активность ДНК-гликозилаз MBD4 и TDG в процессе эксцизионной репарации оснований — Конференция “Химическая биология”, Новосибирск, 2016
3. Д. А. Яковлев, О. А. Кладова, О. С. Федорова, Н. А. Кузнецов. Предстаационарный кинетический анализ влияния апуриновой-апириимидиновой эндонуклеазы человека APE1 на активность ДНК-гликозилаз — Симпозиум “Белки и Пептиды”, Москва, 2017
4. D. A. Iakovlev, N. A. Timofeyeva, N. A. Kuznetsov, O. S. Fedorova. Conformational dynamics of human dioxygenase ABH2 in the course of action on methylated DNA — FEBS Congress–2017, Jerusalem, Israel, 10–14 September 2017
5. O. Kladova, D. Iakovlev, N. Kuznetsov, O. Fedorova. Effect of downstream enzymes of base excision DNA repair pathway on the action of human DNA glycosylase MBD4 — FEBS Congress–2017, Jerusalem, Israel, 10–14 September 2017
6. Danila A. Iakovlev, Inna V. Misovets, Irina A. Alekseeva, Yuri N. Vorobjev, Nikita A. Kuznetsov, Olga S. Fedorova New details of specific site recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1 — FEBS Congress–2017, Jerusalem, Israel, 10–14 September 2017

Содержание работы

Материалы и методы

В работе были использованы реактивы: мочеви́на, трисгидроксиметиламинометан (Tris), пероксодисульфат аммония, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), хлорид марганца, хлорид цинка, хлорид кальция, хлорид меди, сульфат никеля, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, дитиотреит (DTT), глицерин, тетраборат натрия, имидазол, одно- и двухзамещенный фосфат калия, хлорид калия, хлорид натрия (Sigma, США); культуральные среды SOC, LB и 2×YT; изопропил-β-тиогалактопиранозид (ИПТГ, Thermo Fisher Scientific, США). Также были использованы отечественные реактивы степени чистоты ос. ч. Все растворы готовились на дважды дистиллированной воде.

Олигонуклеотиды синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК ASM-800 (Биоссет, Новосибирск, Россия) с использованием коммерческих амидофосфитов 2'-дезоксирибонуклеозидов и CPG-носителей (Glen Research, США). Структуры всех модифицированных нуклеотидов приведены на рис. 1. Гомогенность олигонуклеотидов проверяли с помощью денатурирующего гель-электрофореза в 20 % ПААГ. Концентрацию олигонуклеотидов определяли по закону Бугера-Ламберта-Бера, измеряя оптическую плотность растворов при длине волны 260 нм в электронных спектрах поглощения, молярный коэффициент экстинкции олигонуклеотидов рассчитывали в приближении метода ближайших соседей [9].

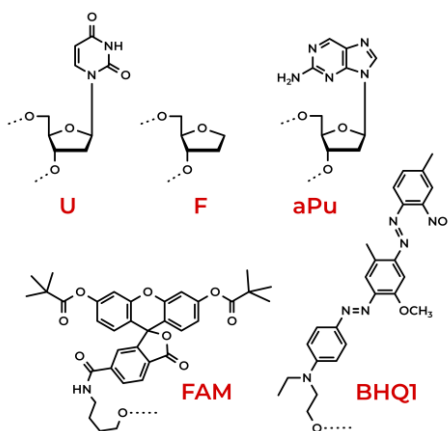


Рисунок 1. Структуры использованных в работе модифицированных нуклеотидов.

Субстраты и лиганды ферментов представляли собой ДНК-дууплексы, состоящие из олигонуклеотидов (таблица 1). ДНК-субстратом называется ДНК-дууплекс, который в который после связывания в активном центре фермента претерпевает химические превращения, лигандом – дууплекс, связывающийся с активным центром, но не претерпевающий химических превращений. Сокращенное название ДНК-субстратов и лигандов представлено в виде X/Y N, где X – олигонуклеотид, на который направлено действие фермента, Y – комплементарный олигонуклеотид, N – количество пар оснований в дууплексе, например, 5'-FAM AUG/CGT^{3'}-BHQ 17.

Таблица 1. ДНК-субстраты и ДНК-лиганды, использованные в работе.

12

U12	5'-CTCTC U	CCTTCC-3' >>
F12	5'-CTCTC F	CCTTCC-3'
FaPu12	5'-CTCTC FaPu	CCTTCC-3'
G12	3'-GAGAG G	GGAAGG-5' <<
A12	3'-GAGAG A	GGAAGG-5'
C12	3'-GAGAG C	GGAAGG-5'
T12	3'-GAGAG T	GGAAGG-5'

17

AUG17	5'-GCTC AU	GT ACAGAGCTG-3' >>
AFG17	5'-GCTC AF	GT ACAGAGCTG-3'
ACG17	5'-GCTC AC	GT ACAGAGCTG-3'
AUaPu17	5'-GCTC AUaPu	TACAGAGCTG-3'
AFaPu17	5'-GCTC AFaPu	TACAGAGCTG-3'
CGT17	3'-CGAG TG	CAT GTCTCGAC-5' <<

28

AUG28	5'-GTGTCACCACTGCTC AUG	TACAGAGCTG-3' >>
CGT28	3'-CACAGTGGTGACGAG TGC	CATGTCTCGAC-5' <<

FRET

^{5'} FAM	AUG17	5'-FAM-GCTC AUG	TACAGAGCTG-3' >>
^{5'} FAM	AFG17	5'-FAM-GCTC AFG	TACAGAGCTG-3'
^{5'} FAM	ACG17	5'-FAM-GCTC ACG	TACAGAGCTG-3'
^{5'} BHQ	CGT17	3'-CGAG TGC	CATGTCTCGAC-BHQ1-5' <<

Для получения препаратов каталитического домена MBD4^{cat} и белка SMUG1 человека использовали плазмидные вектор pET-29b (MBD4) и pET-28с (SMUG1), содержащий вставку, кодирующую соответствующий полипептид. Продуктами экспрессии являлись каталитический домен MBD4 426–580 и полноразмерный белок SMUG1, содержащие последовательность (His)₆ на N-конце. Ферменты были выделены из клеток *E. coli* Rosetta II (DE3), трансформированных соответствующими плазмидами как описано в методике [10]. Культуру клеток выращивали в среде LB (1 л), содержащей 25 мкг/мл канамицина, при 37 °C до оптической плотности среды 0,6 при длине волны 600 нм. После этого культуру

клеток оставляли в шейкере с комнатной температурой (25 °С) и индуцировали транскрипцию добавлением изопропил-β-тиогалактопиранозида до концентрации 0,2 мМ. После индукции клетки инкубировали в течение 16 ч, затем осаждали центрифугированием (10 мин, 4600 гcf×g) и ресуспендировали в 30 мл буферного раствора L (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8; 40 мМ NaCl). Клетки лизировали под давлением при помощи френч-пресса SIM AMINCO. Все последующие процедуры проводили при температуре +4 °С. Клеточный лизат центрифугировали 40 мин при 40 000 гcf×g. Концентрацию NaCl в супернатанте доводили до 200 мМ и наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8; 200 мМ NaCl для MBD4^{cat} и 150 мМ NaCl для SMUG1). Фракции, содержащие белок, собирали, и наносили на колонку II (HiTrap-Chelating™, Amersham Biosciences, Швеция) в буферном растворе I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7,8; 500 мМ NaCl; 20 мМ имидазол). Хроматографию проводили в буферном растворе I и линейном градиенте 20 → 500 мМ имидазола. Чистоту фракций определяли методом электрофореза по Лэмли.

Для введения ³²P метки в олигодезоксирибонуклеотиды 300 пмоль олигонуклеотида и 1,5 мкл раствора γ-³²P-АТФ (акт. 3,6 МБк/мкл) доводили киназным буфером до объема 30 мкл и выдерживали 2 ч с 30 е. а. полинуклеотидкиназы фага T4 (10000 е. а./мл, СибЭнзим) при 37 °С. Киназный буферный раствор (50 мкМ Tris-HCl (pH 7.6 при 25°C); 10 мкМ MgCl₂; 5 мкМ DTT) произведен компанией СибЭнзим. Олигонуклеотид выделяли на микроколонке с носителем Sefadex G25, центрифугируя в течении 1 минуты на скорости 2000 об/мин. Полученный раствор доводили до объема 100 мкл бидистиллированной водой.

Электрофорез в ДПААГ проводили при напряжении 20 В/см при комнатной температуре (для 12– и 17-звенных субстратов) или при температуре 45 °С (для 28-звенных) в течение 3–5 часов. В качестве буферного раствора для электрофореза использовался трис-боратный буфер (ТБЕ) с pH 8,3, полученный разбавлением из 20х концентрированного раствора (108 г Tris, 55 г H₃BO₃, 9,3 г ЭДТА на 500мл).

Для получения кинетических зависимостей накопления продукта от времени использовали следующую методику. Раствор меченого олигонуклеотидного дуплекса готовили отжигом меченого олигонуклеотида с «холодным» разведением до суммарной концентрации олигонуклеотида, содержащего урацил, с эквимольным комплементарным олигонуклеотидом в буферном растворе (50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT, 9 % глицерин). Для реакции к 19 мкл меченого олигонуклеотидного дуплекса при температуре 25 °С добавляли 19 мкл фермента в буферном растворе до концентрации 0,25 – 5,0 мкМ. После быстрого перемешивания пипеткой реакционной смеси через определенные интервалы времени из неё отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые помещали в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 2 мкл раствора 7 М мочевины, 0,1 % бромфенолового синего и 0,1 % ксиленианола. После чего реакционную смесь обрабатывали 1 мкл 1 М NaOH при 72 °С в течение 15 минут или 10 % раствором пиперидина при 37 °С в течение 30 минут. Раствор нейтрализовали добавлением эквивалентного количества 1 М соляной кислоты и наносили на 20% ДПААГ.

Степень расщепления субстрата определяли, обрабатывая радиоавтограф (фотопленка и реактивы для проявления фирмы «AGFA», время экспозиции 12 часов или на устройстве Phosphorimager, время экспозиции 8 часов), предварительно переведенный в цифровую

форму, в программном проекте «Gel Pro Analyzer 4.0» (Media Cybernetics, США). Величину степени расщепления рассчитывали как отношение площадей пика продукта к сумме площадей пиков продуктов и исходного олигонуклеотида.

Для экспериментов методом остановленной струи готовились растворы дуплексов олигонуклеотидов объемом 500 мкл с концентрациями дуплекса от 0,5 до 4 мкМ. Для этого к смеси необходимых количеств стоковых растворов дуплексов (100 мкМ) добавляли 100 мкл концентрированного (5х) буфера (250 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 250 мМ KCl, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ DTT, 45 % глицерин) и доводили объем раствора бидистиллированной водой до 500 мкл. В случаях с 28-звенными дуплексами проводился их отжиг: пробирки со стоковыми растворами дуплексов помещали на водяную баню (приблизительно, 95 °С) и оставляли охлаждаться до комнатной температуры.

Для приготовления растворов белка объемом 500 мкл с концентрацией фермента от 0,5 до 3 мкМ к 100 мкл концентрированного буфера (5х), описанного выше, добавляли необходимое количество стокового раствора белка и доводили до 500 мкл бидистиллированной водой.

Флуоресцентные кинетические кривые были зарегистрированы в спектрофотометрах остановленной струи SX18.MV и SX20 (Applied Photophysics, Великобритания). Растворы фермента и субстрата помещались в шприцы объемом 500 мкл и автоматически смешивались в кювете объемом 40 мкл. Устройства термостатировались, температура в кювете составляла 25 °С. При регистрации флуоресценции 2-аРи или триптофана длина волны возбуждения составляла 310 нм и 290 нм, соответственно. Изменение интенсивности флуоресценции остатков Trp наблюдали на длинах волн более 320 нм (Schott filter WG 320), а для субстратов, содержащих 2-аРи, регистрация флуоресценции проводилась на длинах волн более 370 нм (Corion filter LG 370). FRET-пару возбуждали на длине волны 495 нм, сигнал регистрировали на длинах волн более 530 нм (Corion filter OG 530). Мертвое время прибора составляло 1,30 мс, максимальное время регистрации было равно 1010 с. Каждую кинетическую кривую усредняли, как минимум, по двум экспериментальным кривым.

Для расчета констант скорости конформационных переходов получали набор кинетических кривых для разных концентраций фермента, субстрата или лиганда. Регистрацию проводили в условиях «одного оборота фермента», то есть при концентрациях одного порядка для фермента и субстрата/лиганда.

Количественную обработку результатов экспериментов проводили путем оптимизации параметров, входящих в кинетические схемы. Для этого использовали метод нелинейной регрессии, включающий численное интегрирование дифференциальных уравнений, описывающих кинетику процесса («Origin 7.0», OriginLab, США; «DynaFit», BioKin, США).

Первичная модель структуры свободного SMUG1 дикого типа получена методом моделирования по гомологии с использованием фермента SMUG1 *X. laevis* в качестве шаблона. Остатки F98, H239 и R243 заменены, соответственно, на W, A и A удалением атомов боковой цепи из исходного PDB-файла и реконструкцией остатка с использованием пакета UCSF Chimera [11] и библиотеки ротамеров [12]. Первичные модели оптимизировали методом молекулярной динамики с использованием модифицированного поля сил AMBER ff99 [13] с неявной гауссовской моделью воды и программного пакета BioPASED [14]. Си-

стема уравнивалась при 50 K и отжигалась до 300 K в течение 100 пс. Основная симуляция проводилась в течение 5 нс, потенциальная энергия системы и RMSD оставались стабильными в течение всего времени симуляции. Представительные структуры (центроиды в пространстве всех попарных полноатомных RMSD) использовались как шаблоны для построения моделей комплексов с ДНК.

Моделирование структуры фермент-субстратного комплекса. Так как для ферментов семейства UDG III не получено структур комплексов фермента с ДНК, мы расширили поиск шаблонов до всего суперсемейства UDG. Из базы данных консервативных доменов NCBI были отобраны структуры, к которым было применено последовательное структурное выравнивание (UCSF Chimera Match Maker, алгоритм Нидлмана-Вунша, матрицы BLOSUM-62 для выравнивания белков и Nucleotide для выравнивания ДНК) для достижения наиболее схожего положения ферментов и ДНК. В качестве шаблона для выравнивания использовали ранее полученную модель SMUG1 WT.

Наилучшим образом с точки зрения совпадения организации активного центра, интеркалирующей петли и области контакта белка с ДНК подошла структура комплекса TDG человека с ДНК (PDB ID: 5T2W). Начальная модель комплекса SMUG1 с ДНК была сконструирована из комбинации модели свободного SMUG1 и ДНК из структуры 5T2W, часть нуклеотидов в которой была удалена, а поврежденное основание заменено на U, что дало в точности модельный субстрат AUG/CGT 17 (таблица 1).

Начальную модель оптимизировали в течение 10 с согласно описанному выше протоколу для свободного фермента. Полученная структура была модифицирована для получения структур комплексов SMUG1 F98W, H239A и R243A с ДНК. Структуры комплексов мутантных форм SMUG1 так же оптимизировали в течение 10 нс, представительные структуры использовались в дальнейшем анализе. Иллюстрации структур подготовлены с использованием программ UCSF Chimera и Blender.

Результаты и обсуждение работы

Изучение предстационарной кинетики позволяет проводить детальный анализ поэтапного механизма реакции. Преимущество метода остановленной струи в том, что он позволяет исследовать быстропротекающие стадии реакций. При регистрации изменений интенсивности флуоресценции этот метод позволяет в режиме реального времени изучать конформационные изменения фермента и субстрата. Хотя данный подход технически сложнее стационарных кинетических исследований и предполагает более трудоемкий математический анализ экспериментальных данных, изучение взаимодействия фермента с ДНК в нестационарных условиях приводит к более глубокому пониманию механизма работы изучаемого фермента.

Конформационная динамика взаимодействия MBD4^{cat} с ДНК

Можно предположить, что взаимодействие MBD4^{cat} с ДНК в начальный момент времени приводит к образованию неспецифического комплекса. После образования такого комплекса фермент скользит вдоль двойной спирали в поиске поврежденного нуклеотида. При этом, образующиеся контакты между атомами белка и ДНК должны приводить к дискриминации участков ДНК, содержащих и не содержащих повреждение. В то же время, сеть образующихся связей должна быть достаточно лабильной, чтобы фермент был способен перемещаться вдоль ДНК. При взаимодействии MBD4^{cat} с ДНК-дуплексами, имеющими разную длину, кинетические параметры процесса должны быть разными вследствие различий в скорости поиска остатка урацила.

На рис. 2 представлены кинетические кривые, характеризующие процесс взаимодействия MBD4^{cat} с двенадцатизвенным субстратом U₁₂/G₁₂. Из кривых флуоресценции триптофана видно наличие двух стадий: падения интенсивности (10–500 мс) и роста (0,5–10 с) с выходом на плато (или медленный рост). Данные изменения, скорее всего, отражают лишь начальные конформационные изменения фермента: образование фермент-субстратного комплекса и дальнейшую взаимную подстройку. В дополнительном эксперименте методом разделения реакционной смеси электрофорезом в ПААГ (рис. 3) было установлено время накопления значительного количества продуктов реакции, которое составляет, приблизительно 500 с, что значительно превышает временной интервал наблюдения в эксперименте методом остановленной струи. Следовательно, мы не можем наблюдать на кинетических кривых, полученных методом остановленной струи, каталитическую стадию, что следует учесть при установлении механизма.

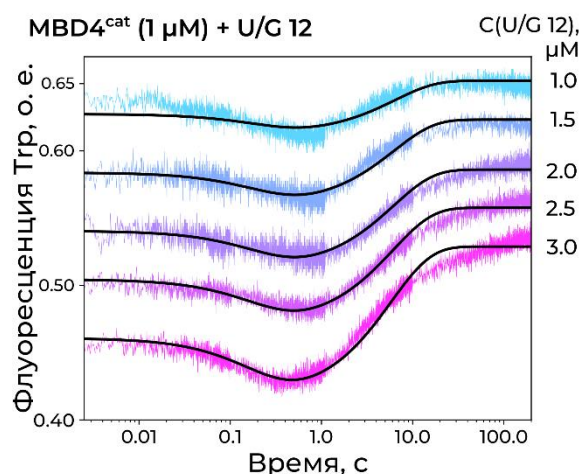


Рисунок 2. Концентрационная серия экспериментальных (цветных) и теоретических (черных) кинетических кривых флуоресценции остатков Trp, полученная при взаимодействии $MBD4^{cat}$ и U_{12}/G_{12} -субстрата. Концентрация белка постоянна (2 мкМ), концентрация U_{12}/G_{12} изменяется от 1 до 3 мкМ.

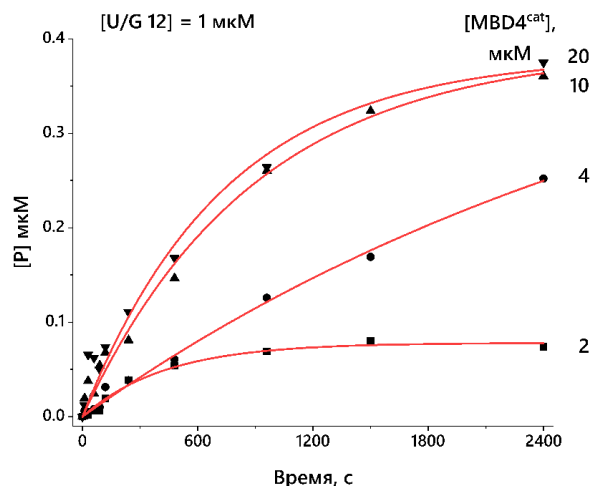


Рисунок 3. Кинетические кривые накопления продукта реакции $MBD4^{cat}$ с U_{12}/G_{12} -субстратом. На рисунке представлены концентрационные зависимости накопления продукта от времени (0 с, 10 с, 30 с, 60 с, 120 с, 240 с, 480 с, 960 с, 1360 с и 2400 с) для разных концентраций фермента (2, 4, 10 и 20 мкМ). Концентрация ДНК постоянна, 1 мкМ.

Результатом математической обработки кинетических кривых взаимодействия $MBD4^{cat}$ с 12-звенным субстратом является кинетический механизм (схема 1), содержащий две равновесные стадии (стадии соответствуют изменениям флуоресценции на кинетических кривых).

Схема 1. Кинетический механизм взаимодействия $MBD4^{cat}$ с U_{12}/G_{12}



В то же время для субстратов большей длины форма кинетических кривых (рис. 6) несколько отличается: падение более растянуто во времени (глобальный минимум около 10

с) и имеет двухфазный характер (медленное падение на 10–100 мс и более быстрое на 0,1–10 с). Такой процесс взаимодействия уже нельзя описать двухстадийным механизмом.

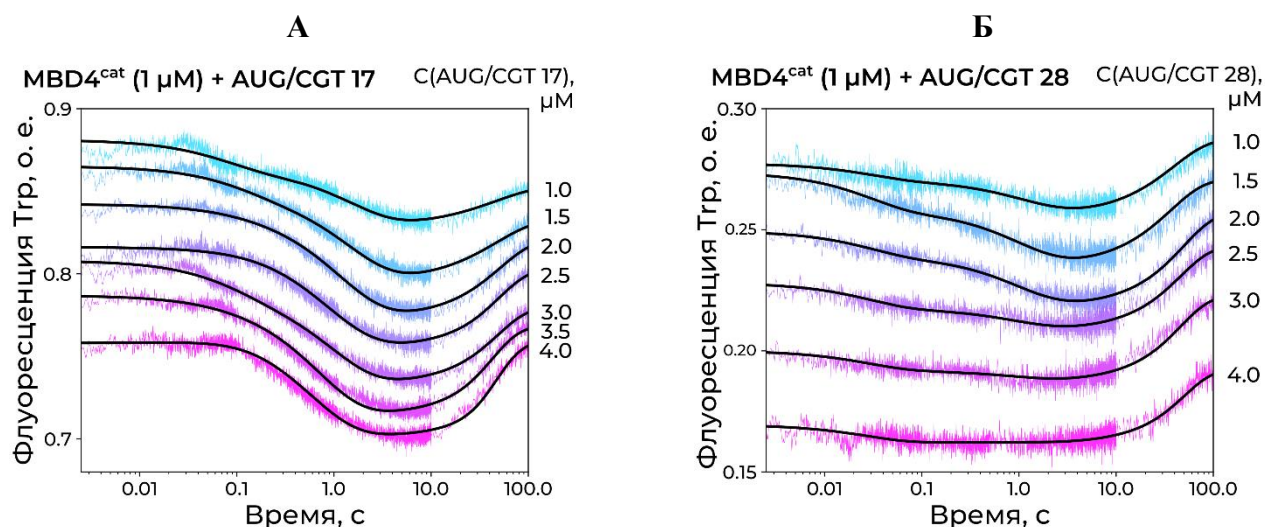


Рисунок 4. Концентрационные серии экспериментальных (цветных) и теоретических (черных) кинетических кривых флуоресценции остатков Trp, полученные при взаимодействии MBD4^{cat} с AUG₁₇/CGT₁₇ (а) и AUG₂₈/CGT₂₈-субстратами (б). Концентрация белка постоянна (2 мкМ), концентрация субстратов изменяется от 1 до 4 мкМ.

Использование в качестве субстрата 28-звенного ДНК-дуплекса должно приводить к наибольшему вкладу неспецифических взаимодействий и эффекта скольжения фермента по цепи ДНК в процессе поиска урацила. Действительно, на полученных кинетических кривых (Рис. 6, б) видно, что фаза уменьшения интенсивности флуоресценции Trp, характеризующая образование специфического комплекса, происходит в широком диапазоне времени 2 мс–10 с.

В пользу необходимости увеличения количества стадий свидетельствуют также результаты экспериментов с радиоактивно меченным субстратом (рис. 5; а, б), из которых видно, что накопление продукта происходит за более короткое время, следовательно, в дополнение к стадиям связывания можно наблюдать каталитическую стадию методом остановленной струи. Из всего вышеперечисленного можно сделать вывод о наличии, как минимум, четырех стадий в кинетическом механизме взаимодействия MBD4^{cat} с достаточно длинными ДНК-субстратами: две стадии первичного связывания, стадия гидролиза (необратимая) и диссоциация фермента и ДНК-продукта (схема 2).

А

Б

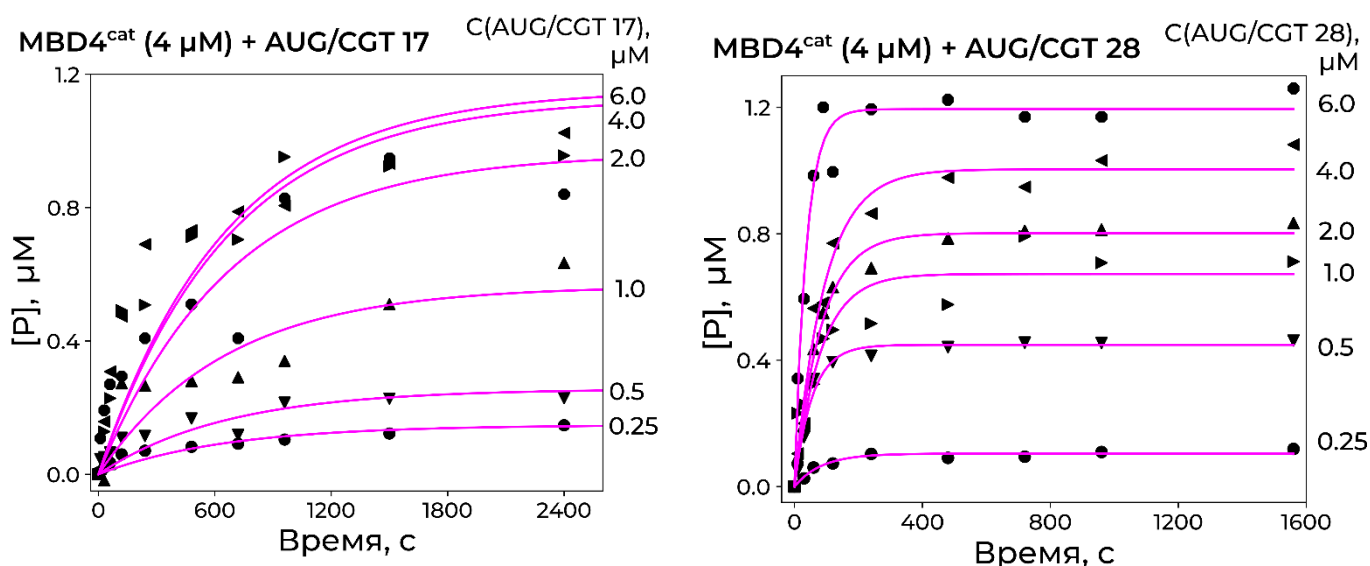


Рисунок 5. Кинетические кривые накопления продукта реакции $MBD4^{cat}$ с AUG_{17}/CGT_{17} (а) и AUG_{28}/CGT_{28} -субстратом (б). Видна зависимость скорости расщепления от концентрации субстрата (0,25 – 6 мкМ). Концентрация фермента постоянна, 4 мкМ.

Схема 2. Кинетический механизм взаимодействия $MBD4^{cat}$ с 17- и 28-звенными субстратами (AUG_{17}/CGT_{17} , AUG_{28}/CGT_{28}).



Из Рис. 6а следует, что на кинетической кривой взаимодействия с семнадцатизвенным субстратом начальный участок (до 1 с.) не является экспоненциальным, в отличие от двух других кривых (для 12- и 28-звенных субстратов; рис. 2 и 6б, соответственно).

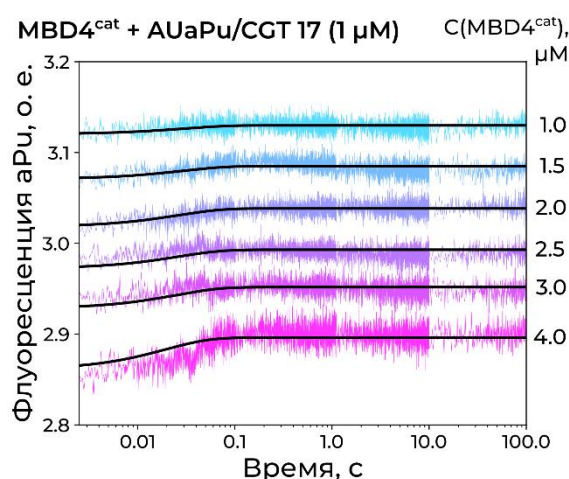


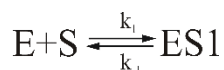
Рисунок 6. Концентрационная серия экспериментальных (цветных) и теоретических (черных) кинетических кривых флуоресценции остатков aPi , полученная при взаимодействии $MBD4^{cat}$ и $AUaPu_{17}/CGT_{17}$ -субстрата. Концентрация ДНК постоянна (1 мкМ), концентрация $MBD4^{cat}$ изменяется от 0,5 до 3 мкМ.

Использование субстратов, несущих остаток aPi , позволило зарегистрировать конформационные изменения ДНК. Разумно предположить, что интенсивность флуоресценции aPi в субстратах может изменяться в результате изгибания молекулы ДНК и встраивания

остатков аминокислот в дуплекс. Как видно из Рис. 6, на кинетических кривых имеются фазы быстрого роста (1–80 мс) интенсивности флуоресценции аРи с последующим выходом на плато. Сравнение с кинетическими кривыми изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана показало, что в этот момент времени (до 100 мс) фермент не претерпевает значительных конформационных изменений.

Полученные кинетические данные удовлетворительно описываются одностадийной кинетической схемой (Схема 3):

Схема 3. Кинетический механизм взаимодействия MBD4^{cat} с AUaPu₁₇/CGT₁₇-субстратом.



Удаление поврежденного основания ферментом MBD4^{cat} включает образование промежуточного продукта реакции, содержащего AP-сайт, который далее претерпевает две последовательные реакции β-элиминирования. Для того чтобы идентифицировать природу конформационных изменений фермента, происходящих в процессе связывания ДНК, содержащей AP-сайт, был использован его нерасщепляемый аналог – F-лиганд. Взаимодействие с F-лигандом приводит только к формированию каталитически-активного комплекса, тогда как химического превращения субстрата не происходит.

Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии MBD4^{cat} и F₁₂/G₁₂-лиганда имеют многофазный профиль и характеризуют процесс первичного связывания и дальнейшую перестройку конформации фермента (рис. 7).

При визуальном анализе кинетических кривых можно выделить две области изменения интенсивности флуоресценции Trp. Первая из них – 1–200 мс – характеризуется небольшим падением интенсивности, а вторая (после 200 мс) – медленным ростом. Полученные кинетические данные удовлетворительно описываются двухстадийной кинетической схемой (Схема 4)

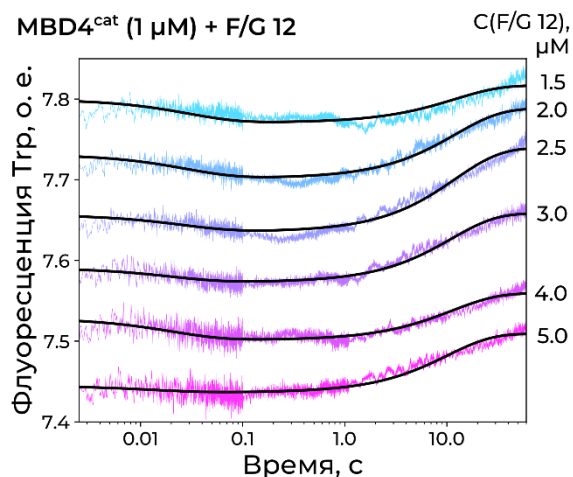


Рисунок 7. Концентрационная серия экспериментальных (цветных) и теоретических (черных) кинетических кривых флуоресценции остатков Trp, полученная при взаимодействии MBD4^{cat} и F₁₂/G₁₂-субстрата. Концентрация ДНК изменяется (1 – 4 мкМ), концентрация MBD4^{cat} постоянна, 2 мкМ.

Схема 4. Кинетический механизм связывания F_{12}/G_{12} дуплекса с $MBD4^{cat}$ (наблюдение флуоресценции Trp).



Для выяснения природы процессов, происходящих с F_{12}/G_{12} -лигандом при связывании с ферментом $MBD4^{cat}$ были проведены эксперименты по взаимодействию с флуоресцентно меченым $FaPu_{12}/CGG_{12}$ лигандом (Рис. 8). На полученных кинетических кривых, соответствующих изменению интенсивности флуоресценции аРи от времени, можно выделить три стадии – рост (1–20 мс), последующее падение (20 мс–2 с) и стадию выхода на плато (после 2 с). Полученные кинетические данные удовлетворительно описываются одностадийной кинетической схемой (схема 5), аналогичной схеме 3.

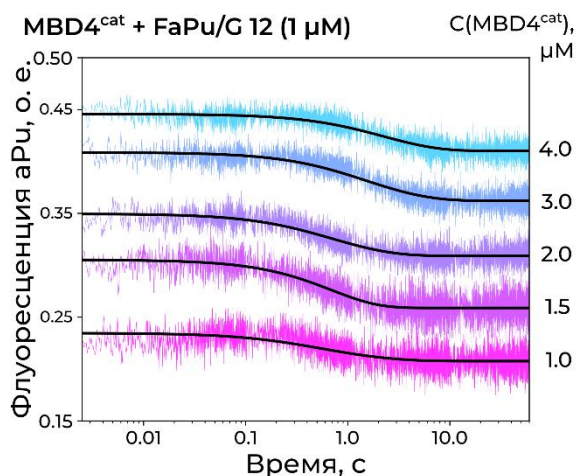
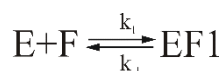


Рисунок 8. Концентрационная серия экспериментальных (цветных) и теоретических (черных) кинетических кривых флуоресценции остатков аРи, полученная при взаимодействии $MBD4^{cat}$ и $FaPu_{12}/CGG_{12}$ -субстрата. Концентрация ДНК постоянна (1 мкМ), концентрация $MBD4^{cat}$ изменяется от 0,5 до 3 мкМ.

Схема 5. Кинетический механизм связывания $FaPu_{12}/CGG_{12}$ дуплекса с $MBD4^{cat}$ (наблюдение флуоресценции аРи).



Можно заметить, что минимуму на кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции триптофана (Рис. 7) соответствует падение интенсивности аРи (Рис. 8), что указывает на синхронность процесса конформационной перестройки фермента и ДНК.

Проанализировав кривые, можно предположить, что кинетический механизм не зависит от длины субстрата, а значит, существует возможность проследить зависимость параметров реакции от количества оснований в субстрате, для чего была проведена математическая обработка экспериментальных кривых.

Аппроксимация данных, представленных на рис. 2–8, проводилась исходя из соответствующих схем. В таблице 2 представлены полученные константы скорости.

Из эксперимента и последующих расчетов можно предположить, каким процессам соответствуют стадии кинетического механизма. Так, стадия 1 ($k_{1/-1}$), скорее всего, указывает

на образование сети электростатических и ван-дер-ваальсовых связей, формирование неспецифического комплекса фермент-ДНК. На стадии 2 ($k_{2/-2}$) происходит «узнавание» субстрата и поиск поврежденного основания. В этом процессе прослеживается зависимость скорости от длины субстрата – чем больше оснований, тем медленнее поиск (рис. 6). Стадия 3 – необратимый гидролиз N-гликозидной связи, стадия 4 – диссоциация фермента и продукта реакции – ДНК, содержащей AP-сайт.

Таблица 2. Значения кинетических параметров отдельных стадий механизмов взаимодействия MBD4^{cat} с разными субстратами.

	U ₁₂ /G ₁₂	AUG ₁₇ /CGT ₁ 7	AUG ₂₈ /CGT ₂ 8	F ₁₂ /G ₁₂	FaPu ₁₂ /CGG ₁ 2	AUPu ₁₇ /CGT ₁₇ 3
Схема	1	2	2	4	5	3
$k_1, \text{с}^{-1} \cdot \text{М}^{-1} \times 10^{-6}$	0.5±0.2	12±3	7±2	11±4	0.48±0.02	0.50±0.02
$k_{-1}, \text{с}^{-1}$	3.3±0.5	43±16	26±7	8±4	0.002±0.001	0.003±0.001
$k_2, \text{с}^{-1}$	0.18±0.04	3±1	2.1±0.3	0.08±0.01		
$k_{-2}, \text{с}^{-1}$	0.120±0.007	0.23±0.05	0.38±0.05	0.030±0.008		
$k_3, \text{с}^{-1}$		0.046±0.002	0.056±0.007			
$K_{\text{dis}}, \text{М}; \times 10^6$		0.15±0.02	0.10±0.02			

На основании сравнения значений полученных констант скорости можно проследить некоторые закономерности. Стадия первичного связывания (k_1) протекает несколько быстрее для субстрата AUG₁₇/CGT₁₇, с ним же образуется и наиболее прочный комплекс [E·U]₁, вероятно, потому что концы семнадцатизвенного дуплекса достаточно далеко от повреждения и не мешают связыванию. При этом субстрат достаточно короткий, из-за чего вероятность связывания MBD4^{cat} с повреждением, а значит и дальнейшей реакции, увеличивается.

Конформационная динамика взаимодействия SMUG1 с ДНК

Для изучения конформационных изменений SMUG1 в процессе взаимодействия с продуктом реакции, были использованы модельные олигонуклеотидные дуплексы, содержащие F-сайт (AFG/CGT 17). Взаимодействие фермента с аналогом продукта приводит к двухфазному изменению флуоресценции остатков триптофана (рис. 9). До 5 мс происходит небольшой рост флуоресценции, за которым следует падение продолжительностью до 1 мс. Эти изменения, по-видимому, соответствуют встраиванию остатков белка в ДНК и конформационной подстройке.

Природа специфических взаимодействий с ДНК изучалась при помощи введения в аналог продукта остатка 2-аминопурина (AFaPu/CGT 17). Смешивание фермента с AFaPu/CGT 17 также вызывает двухфазное изменение флуоресценции 2-аминопурина (рис. 9): рост до 5 мс, показывающий увеличение гидрофильности окружения остатка 2-аминопурина, вызванное образованием первичных неспецифических контактов фермента с ДНК и последующее падение до 0,1 с, показывающее встраивание остатков фермента в полость в ДНК.

Наблюдение за сигналом, полученным с FRET-лигандом (5^{FAM} AUG/ 5^{BHQ} CGT 17), дает картину трехстадийного связывания: быстрый рост до 5 мс с последующим медленным двухфазным падением (рис. 9). Быстрый рост, по-видимому, свидетельствует о связывании фермента с ДНК и встраивании интеркалирующей петли, а дальнейшее падение – об изгибании молекулы ДНК и ее частичном расплавлении.

Изменения конформации фермента и ДНК-продукта, содержащего 2-аминопурин, описываются двухстадийным механизмом, а изменения FRET-сигнала в процессе связывания SMUG1 с аналогом продукта – трехстадийным (схема 6).

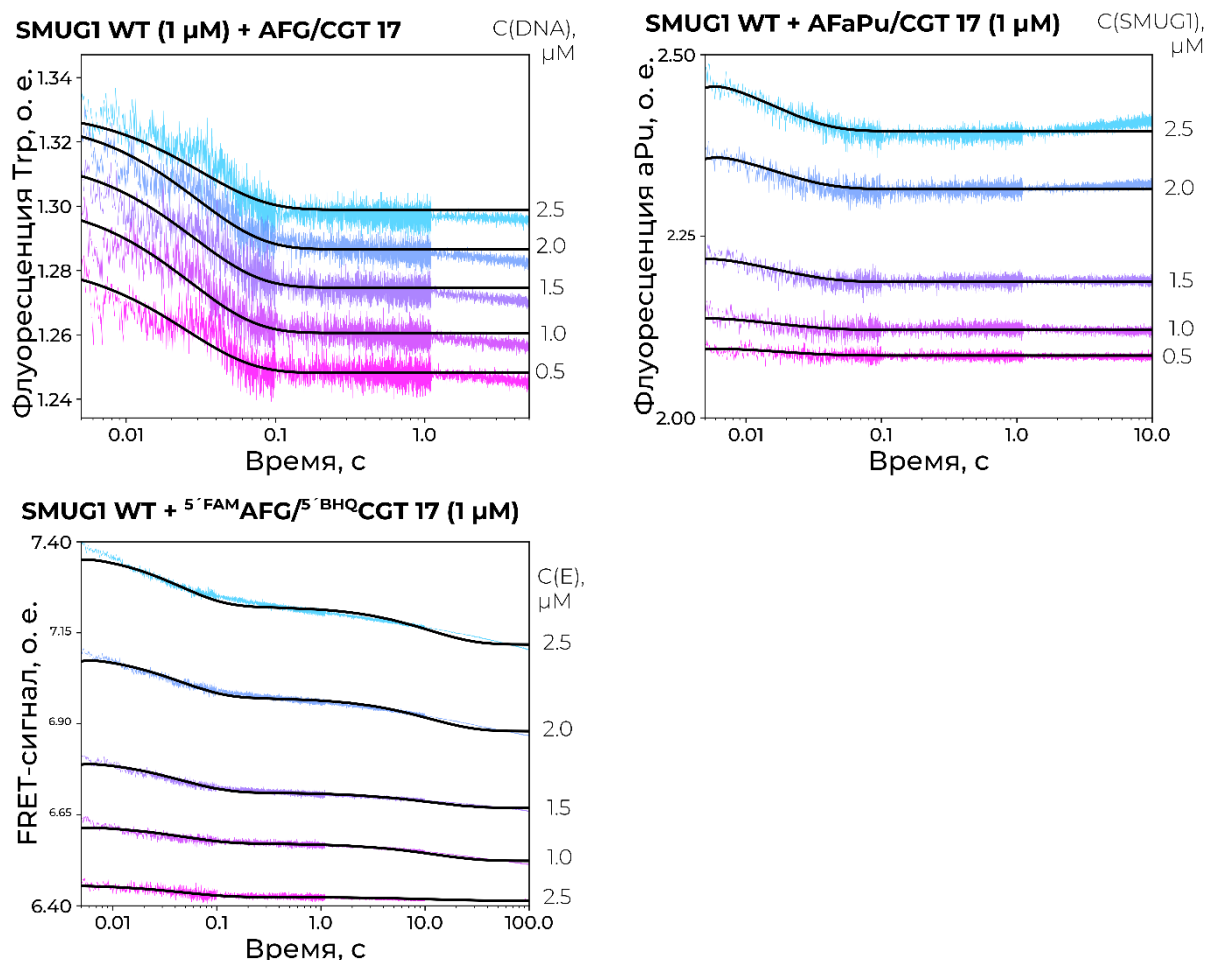
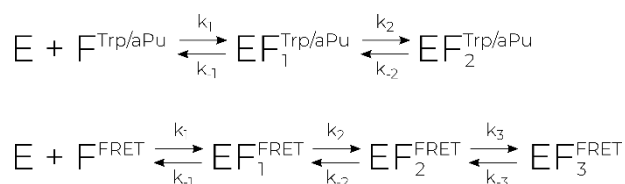


Рисунок 9. Концентрационные серии процесса взаимодействия SMUG1 с ДНК-аналогом продукта. Верхняя левая панель: изменение флуоресценции остатков Trp, правая верхняя: изменение флуоресценции остатков aPu, нижняя: изменение FRET-сигнала.

Схема 6. Кинетический механизм связывания SMUG1 с аналогом продукта.



Подводя итог, можно описать механизм связывания SMUG1 с аналогом продукта следующим образом. Первым шагом является неспецифическое связывание, приводящее к локальному плавлению ДНК и движению интеркалирующей петли. Второй этап, где интенсивность флуоресценции Trp и aPu, а также FRET-сигнала снижаются, можно объяснить образованием геометрически компактного комплекса белок-ДНК, заполнением пустот и изгибом спирали ДНК. Третий этап, наблюдаемый для F-FRET-лиганда при длительных периодах (> 10 с), означает медленный процесс конформационного изменения ДНК в комплексе с SMUG1. Константы скорости каждой стадии представлены в таблице 3.

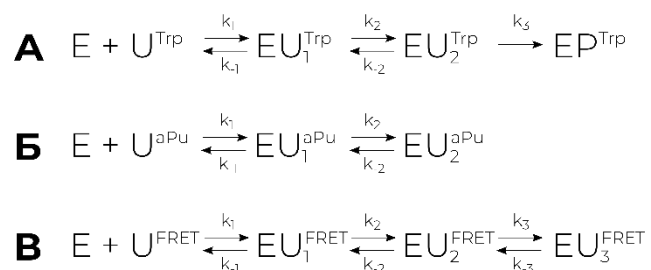
Таблица 3. Значения рассчитанных параметров стадий взаимодействия SMUG1 с аналогом продукта.

Константа	Trp	aPu	FRET
$k_1, \text{с}^{-1} \cdot \text{М}^{-1} \times 10^{-6}$	120 ± 30	130 ± 10	200 ± 50
$k_{-1}, \text{с}^{-1}$	1000 ± 250	490 ± 60	650 ± 70
$k_2, \text{с}^{-1}$	60 ± 23	25 ± 16	$7,7 \pm 3,5$
$k_{-2}, \text{с}^{-1}$	24 ± 7	55 ± 21	18 ± 1
$k_3, \text{с}^{-1}$			$0,13 \pm 0,02$
$k_{-3}, \text{с}^{-1}$			$0,067 \pm 0,004$

Полный ферментативный процесс изучали с использованием ДНК-субстратов, содержащих урацил. В ходе ферментативной реакции происходит связывание фермента с субстратом, формирование каталитически компетентного комплекса, гидролиз N-гликозидной связи и диссоциация фермента с продуктом.

Кинетические кривые флуоресценции триптофана (рис. 10) демонстрируют трехстадийный процесс, состоящий из быстрого (до 5 мс) роста интенсивности флуоресценции, падения до 0,5 с и роста с выходом на плато к 5 с. Сравнение этих кривых с кривыми для процесса связывания с продуктом показывает, что связывание с ДНК и образование каталитического комплекса приводят к похожим изменениям в интенсивности флуоресценции триптофана. Таким образом, последнюю стадию на кинетических кривых можно отнести к процессу катализа разрыва N-гликозидной связи. Наблюдаемый процесс можно описать кинетической схемой 7А.

Схема 7. Кинетический механизм связывания SMUG1 с ДНК-субстратом.



Анализ скорости накопления продуктов реакции методом разделения реакционной смеси в ПААГ дает значение наблюдаемой константы скорости приблизительно $0,01 \text{ с}^{-1}$ (рис. 12Б), что существенно ниже k_3 , полученной из экспериментов методом остановленной струи. По-видимому, это является следствием сильного связывания фермента с продуктом,

которое уменьшает значение наблюдаемой константы скорости, уменьшая эффективную концентрацию фермента.

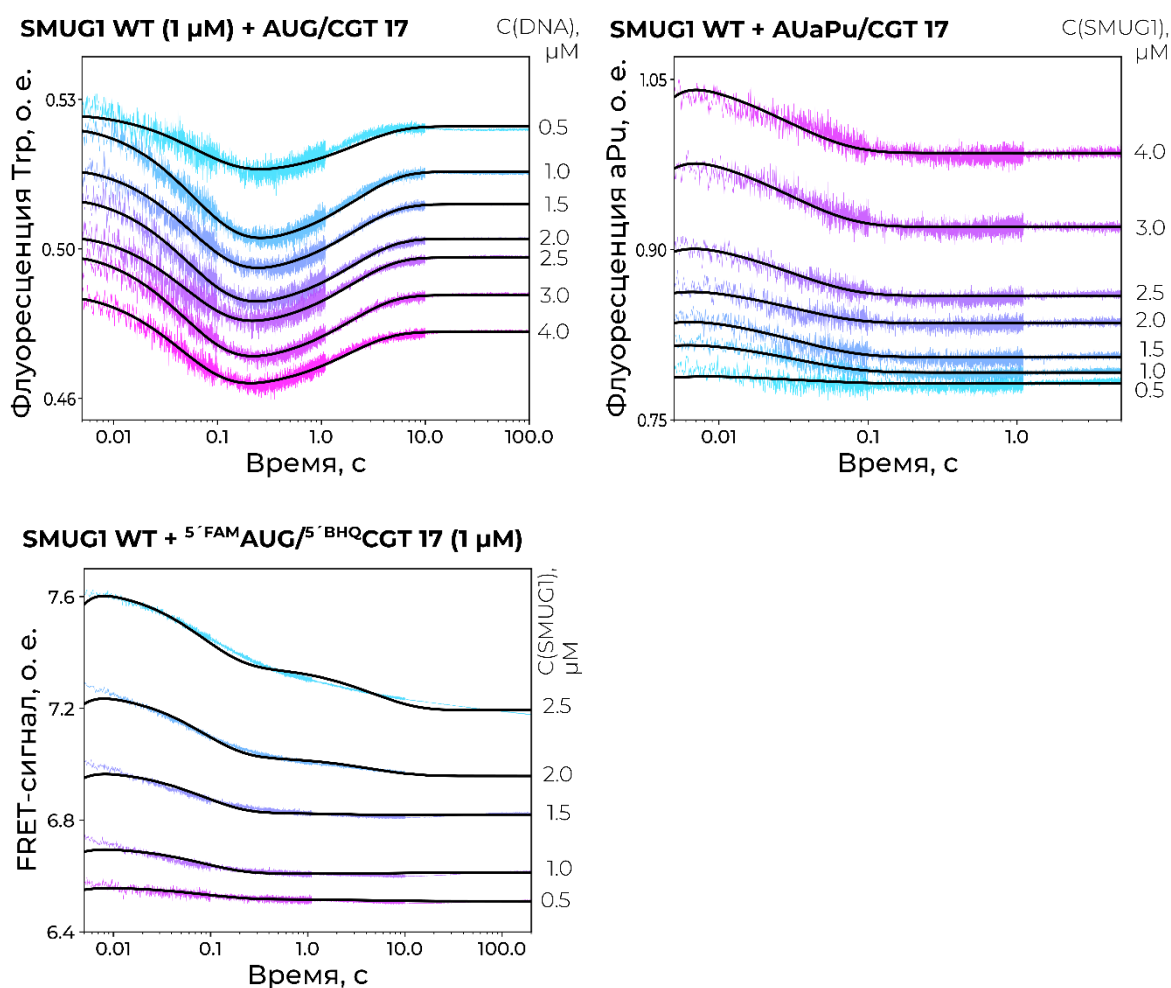


Рисунок 10. Концентрационные серии процесса взаимодействия SMUG1 с ДНК-субстратом. Верхняя левая панель: изменение флуоресценции остатков Trp, правая верхняя: изменение флуоресценции остатков aPu, нижняя: изменение FRET-сигнала.

Кинетика конформационных изменений в ДНК, зарегистрированная при наблюдении за флуоресценцией 2-аминопутрина и сигналом FRET-пары в субстратах AUaPU/CGT 17 и 5'-FAM AUG/5'-BHQ CGT 17, соответственно (рис. 10), аналогична кинетике взаимодействия SMUG1 с аналогом продукта. Такая согласованность конформационных изменений свидетельствует о том, что процесс гидролиза N-гликозидной связи не требует серьезного изменения геометрии субстрата. Кинетические схемы для субстратов AUaPU/CGT 17 и 5'-FAM AUG/5'-BHQ CGT 17 идентичны соответствующим схемам взаимодействия SMUG1 с аналогами продукта (схемы 7Б и В).

Сравнение констант скорости, полученных для ДНК- дуплексов, содержащих урацил или F-сайт (таблицы 3 и 4), показало, что образование начального фермент-субстратного комплекса происходит с аналогичной константой скорости k_1 . Напротив, константа ассоциации k_1/k_{-1} немного выше для урацилсодержащих ДНК-дуплексов, что указывает на более тесное связывание со специфическим субстратом. Следовательно, эти данные свидетельствуют о том, что первоначальное связывание ДНК происходит более эффективно в случае дуплекса ДНК, содержащего урацил.

Таблица 4. Значения рассчитанных параметров стадий взаимодействия SMUG1 с субстратом.

Константа	Trp	aPu	FRET
$k_1, \text{с}^{-1} \cdot \text{М}^{-1} \times 10^{-6}$	115 ± 20	130 ± 60	140 ± 20
$k_{-1}, \text{с}^{-1}$	760 ± 90	240 ± 30	410 ± 20
$k_2, \text{с}^{-1}$	30 ± 8	15 ± 8	3.6 ± 0.8
$k_{-2}, \text{с}^{-1}$	11.5 ± 0.8	25 ± 6	9.7 ± 0.2
$k_3, \text{с}^{-1}$	1.7 ± 0.2		0.6 ± 0.1
$k_{-3}, \text{с}^{-1}$			0.11 ± 0.02

Общий механизм удаления повреждения можно описать, объединив данные о взаимодействии фермента с субстратом и продуктом, полученные с помощью наблюдения за разными флуорофорами во время реакции и при исследовании активности фермента методом разделения реакционной смеси электрофорезом в ПААГ. Суммарный механизм (рис. 11) можно описать как двухстадийное связывание фермента с ДНК (первичное неспецифическое связывание и изгибание ДНК и заполнение полости), катализ и диссоциацию фермента с продуктом реакции.



Рисунок 11. Общий механизм процесса удаления повреждения SMUG1.

Влияние аминокислотных остатков F98, H239 и R243 на каталитическую активность SMUG1

Чтобы изучить влияние консервативных остатков в активном центре фермента на каталитическую активность, были проведены сравнительные исследования зависимости расщепления субстрата от времени. Кинетика накопления продукта исследовалась методом разделения реакционной смеси электрофорезом в ПААГ (рис. 12). Наблюдаемые константы скорости оценивались в соответствии с экспоненциальным уравнением 1.

$$[P] = A(1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

Замены F98W и H239A приводят к практически полной потере активности фермента. В то же время, замена R243A, наоборот, несколько увеличивает скорость реакции. Ранее было показано, что для фермента дикого типа лимитирующей стадией выступает диссоциация с продуктом [15]. Так как замена R243A уменьшает количество водородных связей с ДНК,

энергия диссоциации комплекса SMUG1 – ДНК ниже, чем для дикого типа, что ускоряет диссоциацию фермента с ДНК и увеличивает скорость одного оборота.

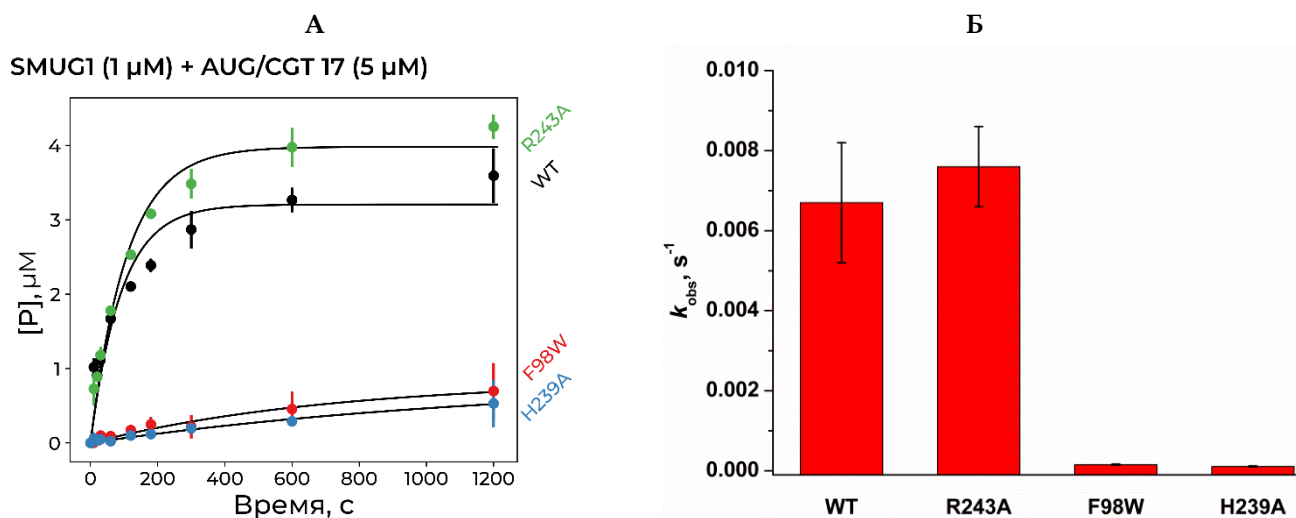


Рисунок 12. Кривые накопления продукта реакции (А) и относительная активность (Б) SMUG1 дикого типа и мутантных форм F98W, H239A и R243A в процессе взаимодействия с модельным ДНК-дуплексом AUG/CGT 17. $[SMUG1] = 1.0 \times 10^{-6} M$, $[AUG/CGT 17] = 5.0 \times 10^{-6} M$.

Модели структур комплексов SMUG1 дикого типа и мутантных форм F98W, H239A, R243A

В процессе работы были построены модели комплексов SMUG1 WT, F98W, H239A и R243A и 17-звенным ДНК-дуплексом, содержащим урацил. Показано, что замена Phe98 на остаток Trp приводит к нарушению стэкинг-взаимодействия с основанием, тем самым блокируя образование каталитически компетентной конформации активного центра (рис. 13Б). Этот факт позволяет объяснить уменьшение активности мутантной формы SMUG1 F98W по сравнению с ферментом дикого типа.

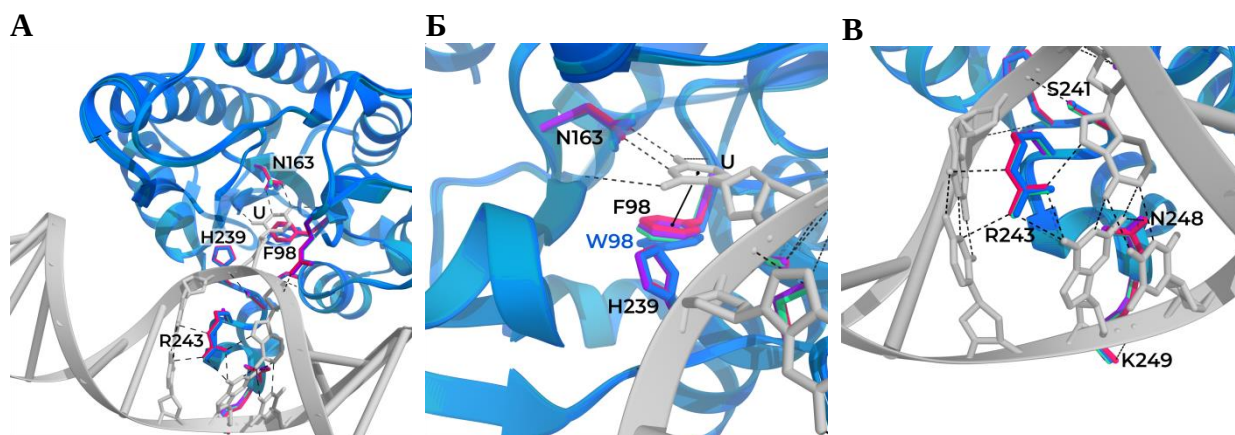


Рисунок 13. Структурное выравнивание SMUG1 WT и мутантных форм. **А.** Наложение структур комплексов SMUG1 WT (розовые остатки), F98W (синие остатки), H239A (голубые остатки) и R243A (фиолетовые остатки) с ДНК. **Б.** Подробный вид кармана активного центра. **В.** Подробный вид встраивающегося в ДНК остатка R243.

Хотя мутация Н239А не приводит к заметным изменениям ДНК-белковых контактов, но при этом фермент становится неактивным из-за отсутствия в активном центре важной имидазольной группы, участвующей в катализе.

Замена Arg243 на аланин также не вносит существенных изменений в геометрию области контакта (рис. 13В) и не влияет на каталитическую активность фермента, по-видимому, из-за того, что это не единственный остаток, стабилизирующий вывернутое состояние ДНК и замена. Тем не менее, Arg243 может играть важную роль на начальных стадиях узнавания повреждения.

Выводы

1. Впервые методом остановленной струи по регистрации флуоресценции остатков Trp в белках, aPu и FRET-пары FAM/BNQ1 в ДНК установлено, что в ходе ферментативных реакций с участием урацил-ДНК-гликозилаз человека MBD4 и SMUG1 происходят множественные конформационные изменения и ферментов и ДНК-субстратов, которые приводят к взаимной адаптации структур взаимодействующих молекул и образованию каталитического фермент-субстратного комплекса.

2. Методами гомологичного моделирования и молекулярной динамики построена модель комплекса SMUG1 человека с ДНК-субстратом, позволяющая определить роль аминокислотных остатков Phe98, His239 и Arg243, входящих в активный центр фермента. Анализ активности мутантных форм F98W, H239A и R243A SMUG1 показал, что замены F98W и H239A нарушают специфические контакты с основанием урацила в кармане активного центра. При этом замена R243A снижает скорость изгибания ДНК и увеличивает скорость оборота фермента, за счет ускорения стадии высвобождения продукта.

3. Впервые с использованием подходов анализа конформационной динамики с последовательным усложнением строения и длины ДНК-субстратов, мутационного анализа и моделирования установлены кинетические схемы взаимодействия ферментов MBD4 и SMUG1 с ДНК-субстратами, определены константы скорости и равновесия для всех стадий, входящих в эти схемы и предложена молекулярная природа конформационных изменений.

Список литературы

1. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. 1993. Vol. 362, № 6422. P. 709–715.
2. Cadet J., Richard Wagner J. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation // *Perspect. Biol*, 2013. Vol. 5, № 2.
3. Lewis C.A. et al. Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history. // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016. Vol. 113, № 29. P. 8194–8199.
4. Rebhandl S. et al. AID/APOBEC deaminases and cancer // *Oncoscience.*, 2015. Vol. 2, № 4. P. 320.
5. Soll J.M., Sobol R.W., Mosammamaparast N. Regulation of DNA Alkylation Damage Repair: Lessons and Therapeutic Opportunities. // *Trends Biochem. Sci.*, 2017. Vol. 42, № 3. P. 206–218.
6. Nakano T. et al. Induction of DNA–protein cross-links by ionizing radiation and their elimination from the genome // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen*. 2015. Vol. 771. P. 45–50.
7. Hoeijmakers J.H.J. DNA Damage, Aging, and Cancer // *N. Engl. J. Med*. 2009. Vol. 361, № 15. P. 1475–1485.
8. Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. // *Environ. Mol. Mutagen.*, 2017. Vol. 58, № 5. P. 235–263.
9. Sambrook J., Russell D.W. (David W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
10. Moréra S. et al. Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyluracil-containing DNA // *Nucleic Acids Res.*, 2012. Vol. 40, № 19. P. 9917–9926.
11. Pettersen E.F. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem*. 2004. Vol. 25, № 13. P. 1605–1612.
12. Shapovalov M.V., Dunbrack R.L. A Smoothed Backbone-Dependent Rotamer Library for Proteins Derived from Adaptive Kernel Density Estimates and Regressions // *Structure*. 2011. Vol. 19, № 6. P. 844–858.
13. Cornell W.D. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules // *J. Am. Chem. Soc.*, 1995. Vol. 117, № 19. P. 5179–5197.
14. Popov A. V, Vorob'ev I.N. [GUI-BioPASED program for molecular dynamics modelling of biopolymers with a graphical user interface]. // *Mol. Biol. (Mosk)*. Vol. 44, № 4. P. 735–742.
15. Kuznetsova A.A. et al. Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1 // *Mol Biosyst*. 2017. Vol. 13, № 12. P. 2638–2649.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Новопашина Дарья Сергеевна danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712

Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)

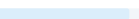
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 1
Начало загрузки: 06.09.2019 05:41:18
Длительность загрузки: 00:00:06
Имя исходного файла:
Aspiransky_Diplom_Iakovlev_DA_2019
Размер текста: 2053 кБ
Символов в тексте: 43964
Слов в тексте: 5552
Число предложений: 372

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 06.09.2019 05:41:24
Длительность проверки: 00:00:13
Комментарии: не указано
Модули поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ 12,37%  ЦИТИРОВАНИЯ 0%  ОРИГИНАЛЬНОСТЬ 87,63% 



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
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.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	6,42%	Молекулярно-кинетические механизмы узнавания и удаления повреждений ДНК в..	http://niboch.nsc.ru	02 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[02]	0,55%	Основы дизайна химерных антигенных рецепторов - PDF	https://docplayer.ru	06 Фев 2019	Модуль поиска Интернет
[03]	0%	Поиск поврежденных участков ДНК метил-ср-связывающим ферментом MBD4	https://cyberleninka.ru	25 Июл 2018	Модуль поиска Интернет
[04]	0,79%	Конформационные превращения фермент-субстратных комплексов в процессах, к..	http://dslib.net	02 Июл 2016	Модуль поиска Интернет
[05]	0,55%	Термодинамика конформационных переходов ар-эндонуклеазы человека APE1 пр...	https://cyberleninka.ru	28 Авг 2018	Модуль поиска Интернет
[06]	0,78%	Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selectiv...	https://doi.org	12 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[07]	0,64%	Molekulare Analyse der Interaktion zwischen <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin und Cl...	https://d-nb.info	15 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[08]	0,61%	Взаимодействие многофункциональных белков человека – Ku-антигена и глицера...	http://niboch.nsc.ru	02 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[09]	0,55%	Конформационные превращения фермент-субстратных комплексов в процессах, к..	http://earthpapers.net	20 Окт 2017	Модуль поиска Интернет
[10]	0,5%	Posters (1/5)	https://doi.org	12 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[11]	0%	DNA base repair – recognition and initiation of catalysis - DOCUMENTS.TIPS	https://documents.tips	17 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[12]	0%	Кинетический механизм действия апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы че...	http://earthpapers.net	05 Ноя 2017	Модуль поиска Интернет
[13]	0,37%	Редактирование эпигенетических модификаций ДНК – тема научной статьи по мед.	https://cyberleninka.ru	20 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[14]	0,23%	CryoEM and mutagenesis reveal that the smallest capsid protein cements and stabilizes...	https://doi.org	24 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[15]	0,18%	[Cancer Metastasis - Biology and Treatment] Genomic Instability and Cancer Metastasis ...	https://doi.org	05 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[16]	0%	Comparison of software for molecular mechanics modeling - Wikipedia	https://en.wikipedia.org	02 Июл 2019	Модуль поиска Интернет
[17]	0,2%	http://amsdottorato.unibo.it/8118/1/Eleonora%20Croco-%2029%C2%B0%20Ciclo-%202...	http://amsdottorato.unibo.it	08 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[18]	0%	Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense	https://ncbi.nlm.nih.gov	15 Мая 2019	Модуль поиска Интернет

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

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Яковлев Данила Алексеевич

«Исследование структурно-кинетических особенностей ферментов
эпигенетической регуляции»

Оригинальность работы составляет ___87.63___ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина