

На правах рукописи

ПОПОВ АЛЕКСАНДР ВИКТОРОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СУБСТРАТНОЙ
СПЕЦИФИЧНОСТИ 8-ОКСОГУАНИН-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ
БАКТЕРИЙ И ЧЕЛОВЕКА**

03.01.04 — биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск — 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Научные руководители:

Жарков Дмитрий Олегович, д. б. н., доцент

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Воробьёв Юрий Николаевич, д. ф.-м. н., с. н. с.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Беликов Сергей Иванович, д. б. н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, зав. лабораторией

Иванисенко Владимир Александрович, к. б. н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, в. н. с.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Защита состоится «27» октября 2017 г. в 10⁰⁰

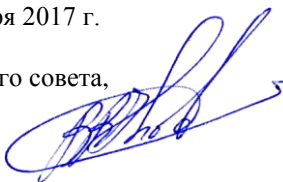
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » сентября 2017 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Молекула ДНК, основной носитель наследственной информации, может повреждаться под действием различных агентов физической и химической природы. Накопление в большом количестве мутаций, вызванных этими повреждениями, приводит к старению, канцерогенезу и многим патологическим процессам. Один из наиболее распространённых типов повреждений ДНК — окисление, которое происходит при действии на макромолекулу активных форм кислорода. Они могут образоваться как под действием внешних агентов, например, ионизирующей радиации, так и в процессе нормального метаболизма и иммунного ответа аэробных организмов. Для исправления повреждённой структуры ДНК в клетках существует система репарации, один из главных путей которой — эксцизионная репарация оснований. На ранних её этапах участвуют ферменты двух классов: ДНК-*N*-гликозилазы (далее упоминаемые как ДНК-гликозилазы), узнающие повреждения в ДНК и выщепляющие повреждённые основания, и АП-эндонуклеазы, расщепляющие ДНК по вновь образованному апурин/апиримидиновому (АП) сайту. Каталитический механизм некоторых ДНК-гликозилаз может включать в себя АП-лиазную стадию, также приводящую к разрыву цепи по механизму β -элиминирования.

Гликозилазы репарации окислительных повреждений ДНК присутствуют как в прокариотических, так и в эукариотических организмах. Обычно каждая из них специфична к достаточно широкому кругу окисленных пуринов или пиримидинов. В то же время эти ферменты могут быть высокоспецифичны к основанию, находящемуся напротив повреждённого, что является залогом эффективного предотвращения точковых мутаций; однако природа такой специфичности для многих гликозилаз пока не ясна.

Существующие в настоящий момент физические и химические методы исследования не позволяют в полной мере оценить вклад тех или иных структурных факторов в субстратную специфичность ферментов и в их каталитический механизм. Возросший в последнее время интерес к расчётным методам на фоне роста вычислительных возможностей компьютеров способствует активному привлечению этого инструмента к задачам энзимологии. Методы молекулярной динамики позволяют изучать не только статичные структуры белков, но и, в рамках определённого рода приближений, происходящие в них процессы. Поэтому детальное исследование каталитической активности и субстратной специфичности ДНК-гликозилаз на атомном уровне представляется современной и актуальной задачей.

Несмотря на то, что методы компьютерного моделирования развиваются уже не один десяток лет, имеющиеся программные средства по-прежнему далеки от совершенства. Многие инструменты не являются дружественными ни в отношении пользователя, ни в отношении современных аппаратных средств. На момент начала работы предпринимались лишь

немногочисленные попытки создать программы анализа молекулярно-динамических траекторий, эффективные и удобные для широкого круга исследователей, не являющихся экспертами в области компьютерного моделирования. Поэтому разработка специализированных программных средств для нужд компьютерного моделирования — ещё одна актуальная задача, имеющая важнейшую практическую значимость.

Цель настоящей работы заключалась в выявлении структурных факторов активности и субстратной специфичности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз бактерий и человека методом компьютерного моделирования и сопоставлении полученных данных с биохимическими показателями. В ходе исследования необходимо было решить ряд **задач**.

1. Разработать графический пользовательский интерфейс к программному пакету BISON/BioPASED для формирования заданий для молекулярного моделирования и автоматизированной первичной верификации моделей; разработать программу с графическим пользовательским интерфейсом для анализа протяжённых молекулярно-динамических траекторий на принципах эргономичности, расширяемости, эффективной визуализации результатов и с низкими системными требованиями; протестировать разработанное программное обеспечение на примере бактериальной формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы (Frg).

2. Изучить поведение каталитически значимых аминокислотных остатков в активном центре бактериальной ДНК-гликозилазы Frg для получения репрезентативных моделей фермента; на основе полученных моделей исследовать факторы специфичности фермента к основанию напротив повреждённого.

3. Исследовать структурные основы снижения активности мутантных форм 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (OGG1) человека в отношении субстратов, содержащих 8-оксогуанин (8-охоGua) или АП-сайт; сопоставить полученные структурные данные с результатами кинетических экспериментов; исследовать факторы специфичности фермента к основанию напротив повреждённого.

Научная новизна работы. В рамках работы разработаны новые программные средства для подготовки, первичной верификации и анализа результатов моделирования методом молекулярной динамики. Впервые исследовано поведение каталитически важных аминокислот в активном центре фермента Frg в зависимости от состояния их ионизации. Получены новые данные о структурных основах субстратной специфичности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз. Впервые показано влияние некоторых аминокислотных замен (C253I, C253L, Q315W) в активном центре OGG1 на активность фермента в отношении различных субстратов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные динамические данные о структурных детерминантах активности и субстратной специфичности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз некоторых

бактерий и человека позволяют углубить знания о различных стадиях ферментативного катализа, осуществляемого исследуемыми белками, для последующего использования их в таких практических областях, как рациональный дизайн ферментов и трансляционная медицина. Разработанные программные средства имеют большое прикладное значение и активно применяются в различных молекулярно-динамических исследованиях, в том числе вне темы настоящей работы.

Методология и методы исследования. В работе широко применялись компьютерные методы исследования биополимеров (метод молекулярной динамики), были разработаны собственные вспомогательные алгоритмы и программы. Для экспериментальной проверки результатов расчётов применялись классические методы ферментативной кинетики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработаны и протестированы новые программные средства: графический пользовательский интерфейс GUI-BioPASED к программному пакету BISON/BioPASED и программа анализа молекулярно-динамических траекторий MDTRA.

2. Каталитическая пара Pro1–Glu2 в белке Fpg при нейтральных значениях pH может существовать в виде смеси разных ионов, из которых структурно наиболее оптимальна форма с протонированными аминокислотными группами Pro1 и карбоксильной группой Glu2, а для протекания реакции требуется депротонирование только Pro1. Специфичность Fpg к основанию напротив повреждённого во многом определяется взаимодействиями вне активного центра. Молекулы воды, связанные в комплексе Fpg–ДНК, могут играть важную роль в конформационной динамике и катализе.

3. Причины снижения активности мутантных форм 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1 человека, содержащих объёмные аминокислотные замены в активном центре C253I, C253L и Q315W, заключаются в искажении структуры самого активного центра из-за его пластичности, а не в изменении конформации ДНК. Ориентация ϵ -аминогруппы Lys249 служит определяющим структурным фактором активности фермента OGG1.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения работы представлены и обсуждены на 8 российских и международных конференциях, в том числе: «BGRS\SB'2010» (Новосибирск, Россия, 2010), «Постгеномные технологии — медицине» (Новосибирск, Россия, 2012), «Nucleic Acid — Protein Interactions for Life Sciences» (Новосибирск, Россия, 2013); на международных конференциях «Albany 2013: Conversation 18» (Albany, США, 2013), «FEBS 2013» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), «Albany 2015: Conversation 19» (Albany, США, 2015), материалы которых индексируются в Web of Science и Scopus. Разработанное программное обеспечение MDTRA применяется независимыми исследователями из Центра биотехнологии и геномики растений (Мадрид, Испания) и Института микробиологии АН Чешской республики (Прага,

Чехия); с использованием MDTRA ими опубликовано 4 работы в зарубежных рецензируемых журналах. Кроме того, MDTRA активно применяется сотрудниками ИХБФМ СО РАН.

По материалам диссертации опубликовано 4 научные статьи, из них 1 в российском и 3 в международных рецензируемых журналах. Все журналы индексируются в международных базах Web of Science и Scopus.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 145 страницах, содержит 36 рисунков и 7 таблиц. Библиография включает 187 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе предложены новые программные средства для улучшения существующих методов компьютерного анализа структуры и динамики биополимеров и их комплексов: графический веб-интерфейс GUI-BioPASED к программе BioPASED и программа анализа траекторий молекулярной динамики (МД) и построения графиков — MDTRA. На их основе проведено моделирование методом МД некоторых 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз бактерий и человека, а полученные расчётные данные подвергнуты экспериментальной проверке биохимическими методами.

1. Разработка программных средств

1.1 Графический веб-интерфейс программы моделирования GUI-BioPASED. Пакет BISON/BioPASED предназначен для моделирования трехмерных структур белков и нуклеиновых кислот методом МД в рамках классических молекулярно-механических подходов. В его основе лежит программа BioPASED, выполняющая задачи по восстановлению, оптимизации энергии и интегрированию траекторий. Работа с программными пакетами, реализующими метод МД, достаточно сложна, и BioPASED — не исключение. Разработанная веб-программа GUI-BioPASED позволяет сформировать задание для BioPASED в виде одного исполняемого файла, экспортировать этот файл на компьютер пользователя, обеспечить его исполнение и, таким образом, частично автоматизировать часть работы, традиционно порождающую ошибки. Создан дружественный интерфейс, который осуществляет проверку исходных данных, сообщает об ошибках и дает подсказки по возможным способам их решения.

Основные модули программы: 1) модуль создания управляющих файлов; 2) модуль проверки PDB-файлов; 3) модуль администрирования. Программа, подробное справочное руководство и пример составления типичного задания на русском и английском языках свободно доступны для работы на сервере ИХБФМ СО РАН (<http://biopased.niboch.nsc.ru>). GUI-BioPASED использовалась в работе для формирования управляющих файлов и для

проверки PDB-файлов моделей на совместимость с программой моделирования BioPASED.

1.2. Программа анализа молекулярно-динамических траекторий MDTRA. Анализ молекулярно-динамических траекторий большого размера вручную представляет собой сложную задачу. Одним из недостатков многих из имеющихся решений является отсутствие логической организации обработки данных в виде проектного файла, что исключает возможность быстро вернуться к ранее посчитанным данным в интерактивном режиме. Некоторые из существующих решений требуют написания специальных подпрограмм на встроенном языке с большим количеством команд при отсутствии графического интерфейса, что усложняет процесс анализа и, как любая программа, требует отладки исходных текстов заданий. Существуют также определённые ограничения по аппаратным требованиям (например, количеству оперативной памяти) и скорости работы.

Разработанная программа MDTRA (Molecular Dynamics Trajectory Reader and Analyzer; рис. 1), часть пакета BISON, способна работать с PDB-траекториями, включая специальные, создаваемые программой BioPASED. Дизайн MDTRA основан на следующих принципах: 1) эргономичный и расширяемый графический интерфейс, не требующий в большинстве случаев написания подпрограмм, хотя и поддерживающий их; 2) быстрое

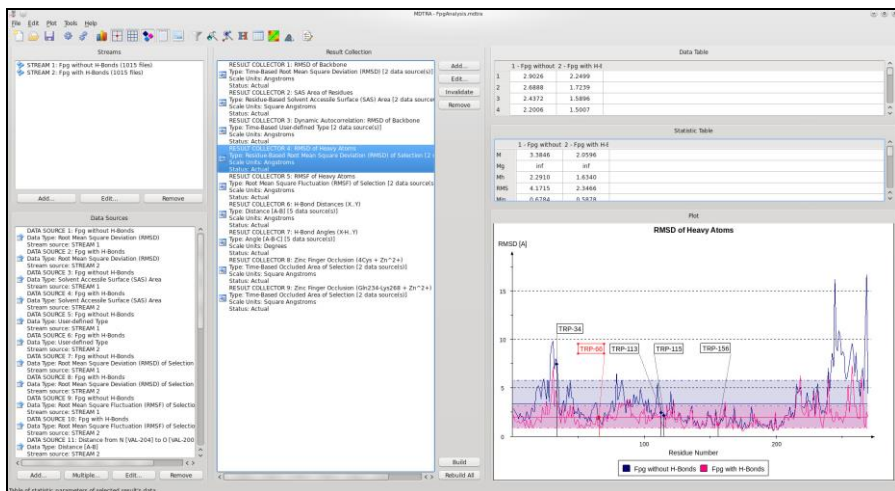


Рис. 1. Общий вид интерфейса программы MDTRA.

представление данные в графическом виде, пригодном не только для анализа, но и для публикации; 3) низкие требования к количеству оперативной памяти и интенсивное использование современных аппаратных возможностей.

В качестве источников данных MDTRA выступают такие параметры, как среднее квадратичное отклонение (RMSD), расстояния и углы между атомами,

торсионные углы, площадь поверхности биополимера, доступная растворителю, площадь поверхности, заслонённой другим фрагментом, и многие другие, включая пользовательские типы данных. Обработанные источники представляют собой наборы чисел с плавающей точкой, которые можно объединить в результаты. Результаты могут представлять данные как в виде функции от времени, так и от номера остатка. Производится также статистический анализ.

MDTRA не загружает предварительно все файлы траектории в оперативную память, т.к. их количество может быть очень велико, достигая 10^6 и занимая десятки и сотни гигабайт. Обработка траекторий осуществляется последовательно по одному файлу в один проход, что особенно эффективно при наличии быстрых дисковых накопителей (SSD). В расчётах активно используются многопоточность и SIMD-оптимизация, что позволяет добиться высокой производительности (рис. 2, А). Реализован массивно-параллельный вариант алгоритма Шрейка-Рапли для расчёта площади поверхности, доступной растворителю, с использованием графических процессоров (GPGPU). Это может приводить к 14-кратному ускорению расчётов по сравнению с однопоточной версией (рис. 2, Б).

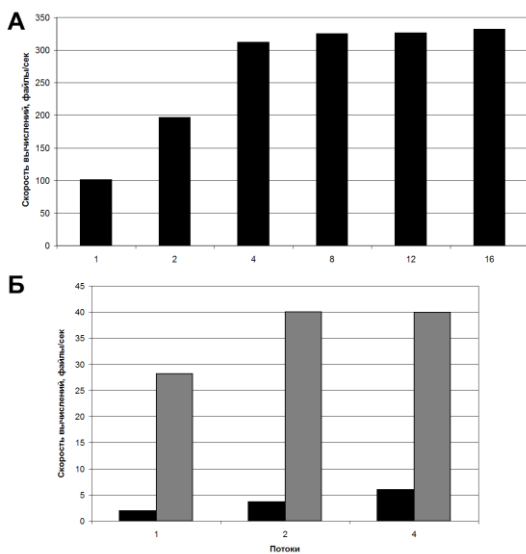


Рис. 2. Многопоточная оптимизация программы MDTRA. (А) Прирост производительности при использовании нескольких потоков CPU. (Б) Прирост производительности при использовании массивно-параллельных вычислений на графическом процессоре. По оси абсцисс отложено число потоков CPU. Чёрным цветом показаны результаты профилирования расчётов без использования GPGPU, серым — с его использованием. Данные получены в системе с CPU Intel Core i5 2,66 ГГц (4 ядра), GPU NVIDIA GeForce GTX275 1,4 ГГц (30 потоковых мультипроцессоров).

Некоторые инструменты MDTRA реализуют возможности, выходящие за рамки описанной архитектуры: поиск значимых различий в дистанциях и торсионных углах, поиск водородных связей, построение гистограмм, расчёт 2D-RMSD и другие. Можно оперировать фрагментом молекулы с помощью встроеного языка выбора с синтаксисом, максимально приближенным к

RasMol. Также реализован механизм расширения функциональности: собственные источники данных, программируемые пользователем; подпрограммы анализа могут быть написаны на языке Lua и сразу же выполнены.

Таким образом, MDTRA — это свободное программное решение с открытым исходным кодом и графическим пользовательским интерфейсом, предназначенное для детального анализа МД траекторий. Документация на английском языке, а также сама программа и её исходный код доступны на веб-сайте (<http://bison.niboch.nsc.ru/mdtra.html>). MDTRA использовалась в работе для анализа траекторий и построения графиков.

2. Исследование структуры и активности Fpg

В работе проведено исследование структуры и динамики ферментов Fpg из двух видов бактерий (*Escherichia coli* и *Lactococcus lactis*): подтверждены данные о мобильности отдельных фрагментов, исследованы состояния ионизации каталитической пары Pro-Glu в активном центре с оценкой их рK_a, получены новые данные о специфичности ферментов к основанию напротив повреждённого, изучен вклад молекул растворителя в формирование и поддержание стабильности фермент-субстратных комплексов

2.1. Значимость водородных связей для поддержания структуры Fpg.

Ранее было показано (*Kuznetsov et al., Biochemistry, 2007*), что отдельные сегменты молекулы Fpg *E. coli* имеют повышенную мобильность. В частности, интерес представляют участки, которые могут давать вклад в изменение флюоресценции во время экспериментов по предстационарной кинетике, например, остатки Trp. Ранее проводилась оценка мобильности сегментов по результатам МД без учёта водородных связей. Для анализа влияния водородных связей на мобильность, а также с целью протестировать разработанное программное обеспечение, сравнивали конформационную динамику Fpg *E. coli* в течение 2 нс в имплицитном растворителе как с учётом, так и без учёта вклада энергии водородных связей.

Анализ RMSD показал, что в целом модели оказались стабильными. Площадь поверхности биополимера, доступной молекулам воды, с высокой степенью коррелирует между обеими моделями. Для того, чтобы выяснить, насколько подвижен тот или иной аминокислотный остаток в моделях, проводили анализ RMSD тяжёлых атомов для каждого остатка (рис. 3, А). Критерием повышенной подвижности было превышение значением RMSD величины среднего значения по всем остаткам плюс одно стандартное отклонение. В целом учёт водородных связей не приводил к равномерному снижению мобильности для всей модели.

Повышенную мобильность Trp34 обнаружили в обеих моделях (рис. 3, Б). Он претерпевает два заметных конформационных перехода (широкие голубая и зелёная полосы на графике) и один кратковременный скачок (узкая красная полоса). Остальные остатки Trp высокую подвижность не

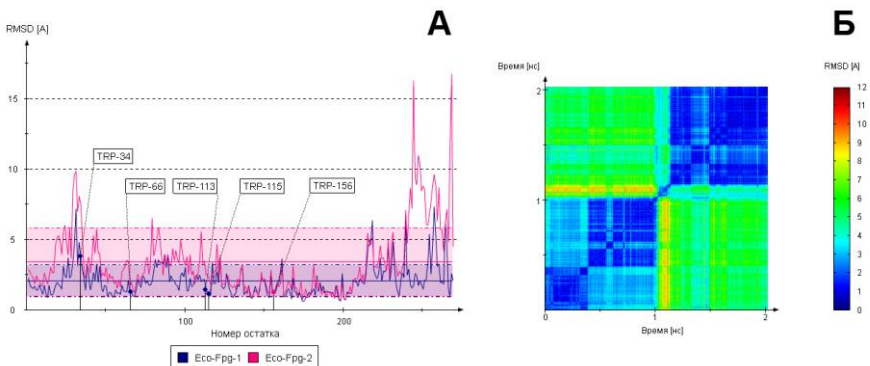


Рис. 3. Анализ конформационной подвижности Fpg *E. coli*. (А) RMSD тяжёлых атомов для каждого аминокислотного остатка. Позиции остатков Трр отмечены маркерами и подписями. Горизонтальные сплошные линии показывают средние значения RMSD по всем остаткам; цветная заливка между ними и штрих-пунктирными линиями показывает диапазон одного стандартного отклонения. (Б) 2D-RMSD тяжёлых атомов Трр34 вдоль траектории, модель с явными водородными связями.

продемонстрировали, т. е. вклад Трр34 в изменение флюоресценции может быть наиболее значимым. Большинство высокоподвижных остатков сосредоточено в двух областях белка — цинковом пальце и петле $\beta 1/\beta 2$ (эта область включает Трр34), которые входят в большую и малую бороздки ДНК, соответственно, когда фермент сканирует ДНК на предмет повреждённых нуклеотидов (*Gilboa et al., J. Biol. Chem., 2002*). Такая подвижность может быть важна для наилучшей адаптации к изменениям геометрии ДНК во время поиска повреждённых остатков и катализа.

2.2. Состояния ионизации каталитически значимых аминокислотных остатков в активном центре Fpg. Состояние ионизации каталитически значимых аминокислотных остатков Pro1 и Glu2 может оказать существенное влияние на применимость результатов МД для объяснения механизма Fpg, однако до сих пор не проводилось попыток оценить pK_a этих групп экспериментально. Поэтому для анализа конформационной динамики активного центра Fpg проводили МД всех четырёх возможных зарядовых состояний. Для этих расчетов использовали структуру Fpg из *L. lactis*, (код 1XC8 в базе данных Protein Data Bank) в которой из всех структур Fpg активный центр меньше всего искажен заменами, введенными для кристаллизации. Кроме того, если 8-охоGua находится в *анти*-конформации (либо в пограничной области «высокой *син*») в большинстве известных моделей, то относительно аденина напротив повреждения таких данных нет. В связи с этим пару 8-охоGua:Ade моделировали в обеих возможных конформациях последнего; всего моделировали 12 комплексов.

Анализ каталитической пары Pro1 и Glu2, а также выбор модели зарядового состояния проводили, исследуя две ключевые дистанции: N(Pro1)–C1'(8-oxodGuo⁰) и Oε2(Glu2)–O4'(8-oxodGuo⁰). Иминогруппа Pro1 и карбоксильная группа боковой цепи Glu2 занимали оптимальное положение относительно своих целей в модели с протонированными Pro1 и Glu2 вне зависимости от основания напротив повреждённого. Угол атаки Pro1 на атом C1' определяет, какая из связей будет разорвана первой: C1'–O4' или C1'–N9. Оба варианта допустимы по механизму S_N2, однако предпочтительной считается атака в направлении C1'–O4'. Анализ углов атаки вдоль траекторий показал (рис. 4), что медиана угла N9–C1'–N(Pro1) находится далеко за пределами идеальной геометрии (60°–90°; данные не приведены); угол O4'–C1'–N(Pro1) демонстрировал значения, приемлемые для катализа, хотя в отдельных моделях они были неоптимальны для перекрывания орбиталей. Угол ориентации иминогруппы C1'–N(Pro1)–Cδ(Pro1) находился в допустимом диапазоне во всех моделях с заряженным Pro и ещё в двух моделях, а в остальных моделях конформация оказывалась неблагоприятной.

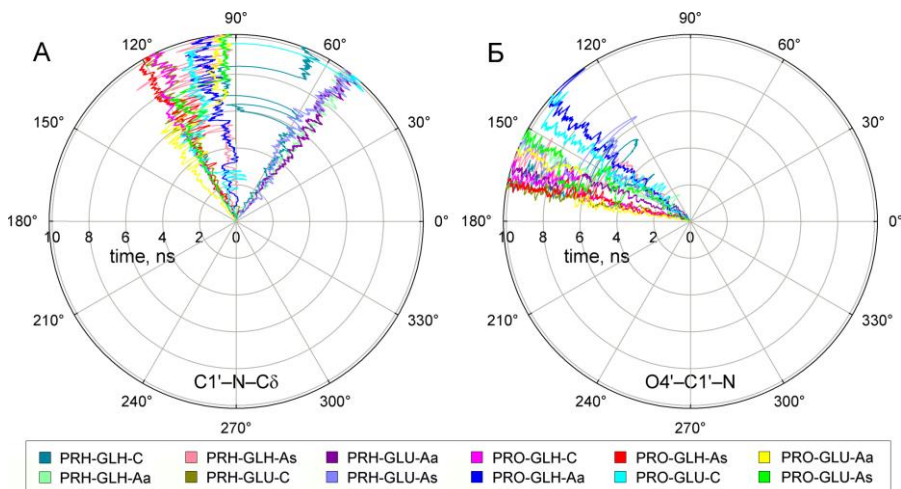


Рис. 4. Популяция ключевых углов, описывающих ориентацию иминогруппы Pro1 относительно разрываемых связей нуклеозида. Значения сглажены методом центрального скользящего среднего ($n = 50$).

Основание напротив повреждённого не оказывало значительного влияния на угол. Сравнение моделей «заряженный Pro1 — Cyt напротив 8-oxoGua» с разным протонированием Glu2 показывает, что в случае нейтрального Glu угол атаки гораздо ближе к идеальному, а угол ориентации иминогруппы Pro лишь чуть хуже. При этом в модели с депротонированным Glu2 к концу моделирования этот угол сдвигался в неприемлемый диапазон.

Алгоритм PROPKA (Søndergaard et al., *J. Chem. Theory Comput.*, 2011) позволил оценить pK_a обеих каталитически важных групп Fpg на основе структур белка из различных видов. Выяснилось, что pK_a Pro1 заметно снижена в сравнении со стандартным значением для N-конца полипептида, а pK_a Glu2 значительно выше в сравнении со стандартным значением для боковой цепи Glu. Для экспериментальной оценки значимости зарядовых состояний каталитической пары проводился анализ рН-профиля активности Fpg.

Наличие двух функционально важных ионизируемых остатков в активном центре, один из которых должен быть протонирован, а другой депротонирован для активности, должно придавать графику колоколообразную форму. Однако Fpg продемонстрировал один переход в диапазоне рН от 4 до 9 (рис. 5) как в условиях одного оборота фермента, так

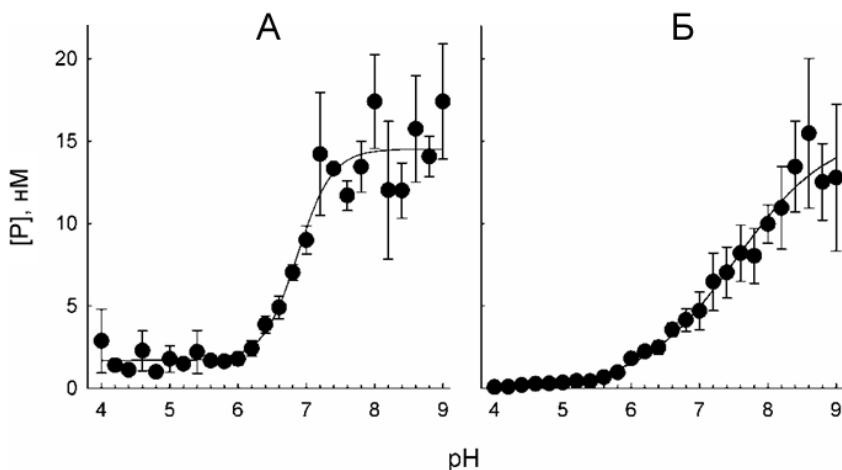


Рис. 5. Графики рН-зависимости активности *Eco*-Fpg (А) в условиях одного оборота фермента; 500 нМ Fpg, 100 нМ субстрат, 0° С; (Б) в стационарных условиях; 2 нМ Fpg, 100 нМ субстрат, 37° С.

и в стационарных условиях. Если принять во внимание абсолютную необходимость депротонирования Pro1 для протекания нуклеофильной реакции, то единственный перегиб графика говорит о том, что переход между зарядовыми состояниями Glu2 не лимитирует скорость реакции. Вероятно, он может осуществляться при помощи молекул воды, попадающих в активный центр (разд. 2.4).

Таким образом, наиболее структурно обоснованным представляется набор моделей с заряженной иминогруппой Pro1 (в дальнейшем активируемой внешним акцептором) и нейтральной боковой карбоксильной группой Glu2, выступающей в роли донора протона. Модели с

депротонированным Pro1 также проводят значительное время в каталитически компетентной конформации.

2.3. Специфичность Frg к основанию напротив повреждённого.

Способность Frg удалять 8-охоGua из пар с Cyt, но не с Ade, крайне важна для предотвращения мутаций, но структурные причины такой специфичности не ясны. Замена Cyt на Ade в моделях не приводила к значительным изменениям энергии связывания и конформационной динамики. Для поиска внутри- и межмолекулярных взаимодействий, важных в узнавании пары охoG:C, анализировали водородные связи, регистрируемые в процессе динамики. Затем проводился поиск связей, которые заметно различались между моделями С, А-*анти* и А-*син*. Наиболее заметно динамика Frg при наличии Cyt или Ade напротив 8-охоGua менялась для кластера в начале С-концевого домена, находящегося за междоменным линкером (остатки Glu134–Phe140; рис. 6). Многие из них участвуют в формировании сети водородных связей, имеющей разную структуру для случаев 8-охоGua:Cyt и 8-охоGua:Ade. Этот участок Frg высококонсервативен, что подчёркивает функциональную важность региона, несмотря на его удалённость от активного центра. Ещё один значимый регион, где формировались различные специфические водородные связи — это β-шпилька цинкового пальца. Этот структурный мотив вовлечён в сканирование большой бороздки и узнавание повреждённого основания.

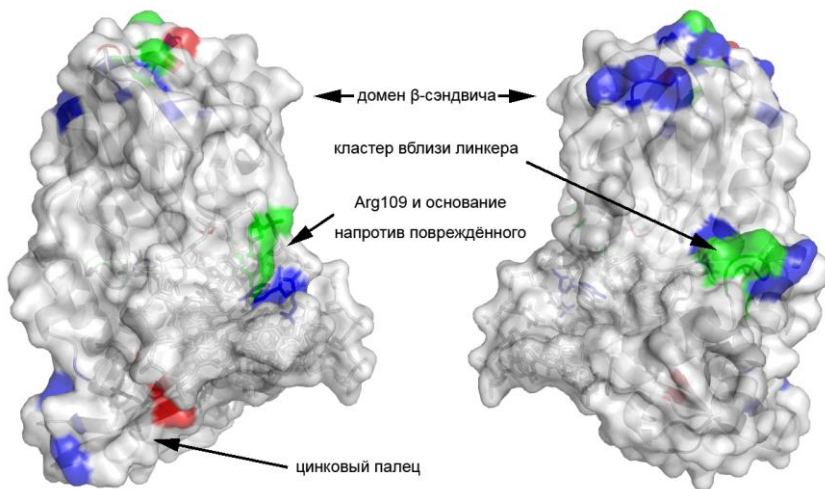


Рис. 6. Поверхность одной из моделей Frg с обозначением участков, где существуют С/А-специфичные водородные связи (две проекции, различающиеся поворотом на 180° вокруг вертикальной оси). Остатки, формирующие только С-специфичные связи, отмечены красным; только А-специфичные связи — синим; остатки, формирующие разные связи в С и А моделях — зелёным.

Несколько C/A-специфичных водородных связей были рассеяны в домене β -сэндвича вокруг C-конца длинной α -цепи αA , которая несёт остатки каталитической пары, однако функциональная значимость этого региона неясна. Что касается разных конформаций Ade, то большинство различий в сети водородных связей обнаруживали между белком и ДНК, а также внутри ДНК, при этом пересечение с C/A-специфическими взаимодействиями практически отсутствовало.

2.4. Роль молекул воды в механизме действия Frg. Из 397 молекул воды в исходной кристаллической структуре Frg только 7 молекул, находящихся внутри ДНК-белкового интерфейса, моделировали явно. Образуемые ими водородные связи анализировали; интерес представляли «водные мостики», когда молекула воды формирует две или больше водородных связей в один момент времени.

Ранжирование мостиков по встречаемости вдоль траектории выявило несколько важных триплетных кластеров. Наиболее часто встречающимся триплетом оказался мостик между боковыми радикалами Glu2 и Glu5 и N²(8-охоGua) (рис. 7, А). Согласованное депротонирование Pro1 и протонирование N3(8-охоGua) через молекулу воды может объяснить одновременную активацию нуклеофила и уходящей группы; кроме того, эта же молекула воды может участвовать в гидролизе основания Шиффа. С другой стороны,

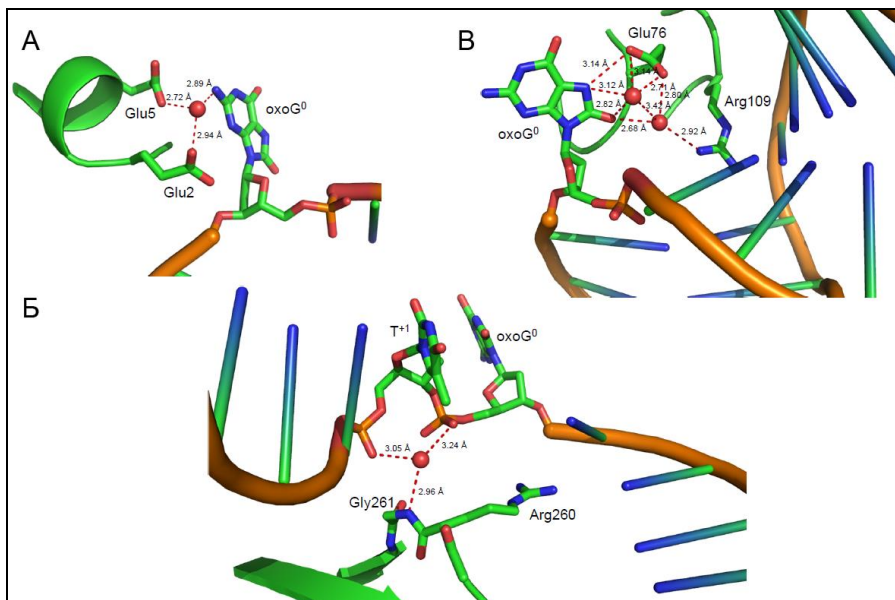


Рис. 7. Основные кластеры формирования водных мостиков. Цвет атомов соответствует химическому элементу (С – зелёный, N – синий, О – красный, Р – оранжевый). Молекулы воды показаны в виде красных сфер. Остальные части комплекса показаны схематично или опущены.

эта молекула воды может участвовать в протонировании Glu2, если исходно карбоксильная группа этого остатка заряжена. Ещё один кластер связывания воды обнаружили вблизи Arg260 и Gly261 белка и фосфатами dTMP⁺¹ и 8-oxoGMP⁰ (рис. 7, Б). Расположенная здесь молекула воды может играть роль в изломе двойной спирали ДНК, важном для выворачивания 8-oxoGua. Наконец, боковая группа Glu76 формировала тройные мостики с Arg109 и O⁸(8-oxoGua) (рис. 7, В). Хотя остаток Glu76 не консервативен, такой мостик может быть одним из нескольких способов узнавания ферментами семейства Fpg повреждённого основания.

3. Исследование структуры и активности OGG1

В работе исследовано снижение активности мутантных форм функционального аналога прокариотического фермента Fpg — 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазы человека, в отношении субстратов, содержащих 8-oxoGua и АП-сайт, в рамках концепции пластичности активного центра, ранее показанной для Fpg. Выявлены детерминанты специфичности к основанию напротив повреждённого, а полученные структурные данные и предсказания нашли экспериментальное подтверждение в кинетических экспериментах.

3.1. Структурные основы снижения активности мутантных форм OGG1 на субстратах, содержащих 8-oxoGua. Имеющиеся структурные данные дают противоречивые ответы на вопрос о механизмах влияния объёмных заместителей в 8-oxoGua-связывающем центре фермента на его активность. Поэтому были сконструированы мутантные формы с заменами Cys253 на Leu либо Ile, а также Gln315 на Trp, с целью проанализировать конформационное пространство, доступное ферменту с вывернутым повреждённым основанием, готовым к удалению. Ожидалось, что стерические затруднения будут препятствовать нахождению 8-oxoGua в кармане. Для более точного соответствия зарядов в активном центре механизму нуклеофильной атаки Lys249 и Asp268 моделировали нейтральными.

Выяснилось, что аминокислотные замены слабо влияют на конформацию 8-oxoGua и ближайших к нему нуклеотидов: мутации не препятствуют нахождению повреждённого основания в активном центре, а искажают сам центр. В частности, нарушалось стекинг-взаимодействие 8-oxoGua с Phe319, формирующим одну из стенок активного центра: в модели C253L перекрытие не превышало 20%, а в модели Q315W — 25%. Менялся и угол наклона кольца Phe относительно 8-oxoGua. Стерические затруднения, возникшие при введении в активный центр остатков Leu и Ile, разрешились разными путями. В модели C253I боковая цепь была свёрнута и оказывалась в целом параллельной плоскости 8-oxoGua, что могло дополнительно ограничивать его подвижность. В модели C253L боковая цепь была вытянута и сдвигала основание вглубь кармана. В модели Q315W основание

сдвигалось из-за некоторого вытягивания вперёд остатка Cys253 по сравнению с моделью дикого типа.

Расстояние $N\zeta(\text{Lys249})\text{--}C1'(\text{8-охоGua})$ было стабильным, однако угол атаки отличался между моделями дикого типа и мутантных форм. Реакции нуклеофильного замещения допускают отклонение угла атаки не более чем $10\text{--}15^\circ$ от оптимального положения. Однако ориентация в направлении $C1'\text{--}O4'$ была близка во всех моделях, что согласуется с идеей о том, что именно N-гликозидная связь разрывается первой. Боковая группа Asp268 в модели дикого типа оставалась вблизи $O4'$ в течение двух третей времени. Однако в моделях C253I и C253L этот остаток в основном контактировал с $O1P$ соседнего Gua.

Для обобщения этих наблюдений необходимо рассмотреть каталитически благоприятную конформацию в активном центре (рис. 8). В случае OGG1 это такая конформация, когда Asp268 находится на расстоянии образования водородной связи с $O4'$ поврежденного нуклеотида, а Lys249

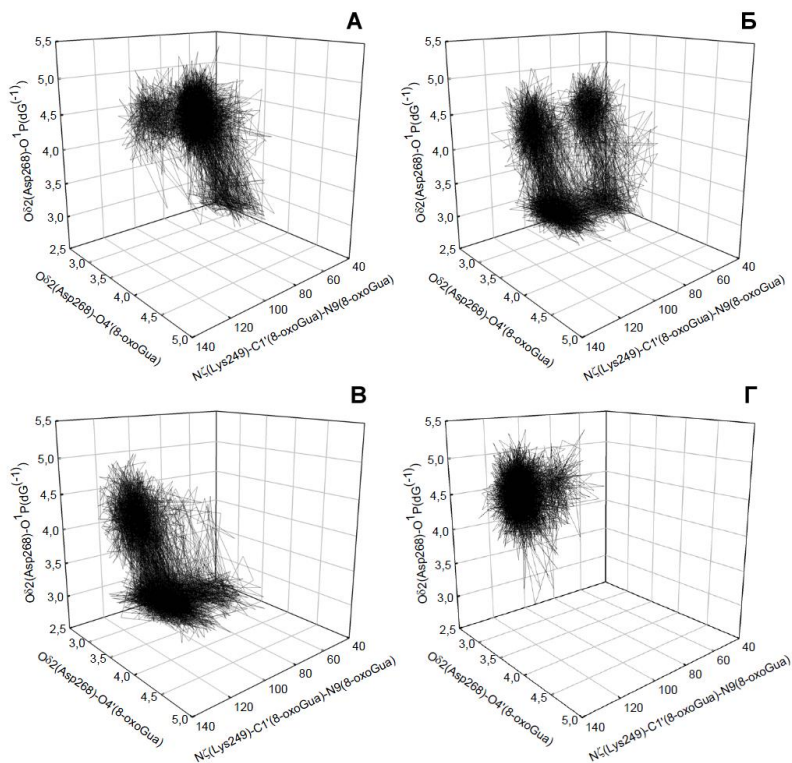


Рис. 8. Популяция каталитически значимых дистанций и углов моделей OGG1 (субстрат 8-охоGua). (А) Модель дикого типа; (Б) модель C253I; (В) модель C253L; (Г) модель Q315W.

приближается к C1' под углом, допускающим нуклеофильную атаку в направлении C1'–N9. Анализ популяции конформаций показывает, что чаще она принимается в модели дикого типа, существенно реже в модели C253I и практически отсутствует в моделях C253L и Q315W. Таким образом, совместное изменение положения Lys и Asp должно приводить к снижению активности мутантов в сравнении с белком дикого типа.

3.2. Структурные основы снижения активности мутантных форм OGG1 на субстратах, содержащих АП-сайт. Замещение 8-охоGua на АП-сайт должно приводить к появлению дополнительного свободного пространства и общей релаксации активного центра, из-за чего активность мутантных форм будет снижаться в меньшей степени. Анализ показал, что многие специфические водородные связи не формируются, равно как и отсутствует какое-либо стекинг-взаимодействие у остатка Phe319, поэтому аминокислотные остатки в активном центре проявляют значительно большую подвижность. Остаток Leu в модели C253L точно так же выдвигается в активный центр, однако, не находя преграды в виде повреждённого основания, не приводит к деформации задней стенки.

Понятие каталитически благоприятной конформации в случае АП-сайта будет иным. Угол атаки Lys249 не имеет значения, т.к. вследствие мутаротации полуацетальный гидроксил при атоме C1' не имеет единой пространственной ориентации. Однако каталитически значимым остаётся расстояние $N\zeta(\text{Lys249})\text{--}C1'(\text{АП-сайт})$, которое из-за повышенной пластичности активного центра сильно менялось в процессе динамики во всех моделях, хотя в моделях с 8-охоGua было стабильным. Таким образом, для анализа выбирали три каталитически значимых расстояния: $N\zeta(\text{Lys249})\text{--}C1'(\text{АП-сайт})$, $O\delta2(\text{Asp268})\text{--}O4'(\text{АП-сайт})$ и $O\delta2(\text{Asp268})\text{--}O1P(dG^{(-1)})$.

График популяции этих расстояний (рис. 9) показал, что благоприятная конформация складывается главным образом в модели дикого типа, где расстояние между атомом C1' АП-сайта и аминок группой Lys лежит в области 3,5 Å. В модели C253I при общем увеличении этой дистанции до 5,5 Å возникла стабильная водородная связь между Asp268 и фосфатной группой $dG^{(-1)}$, поэтому активность этого мутанта в отношении субстратов, содержащих АП-сайт, будет сниженной в наибольшей степени. Популяция конформаций C253L распалась на два выраженных кластера, а в модели Q315W, напротив, была компактной; расстояние $N\zeta(\text{Lys249})\text{--}C1'(\text{АП-сайт})$ в обоих случаях составляло в среднем 4,5 Å. Это позволяет предположить, что в отношении АП-сайтов активность этих мутантов будет несколько выше, чем в отношении 8-охоGua. Большая устойчивость активного центра Q315W, вероятно, говорит и о более высокой активности этой мутантной формы. Все эти предположения впоследствии нашли подтверждение в экспериментах.

3.3. Специфичность OGG1 к основанию напротив повреждённого. OGG1 демонстрирует высокую эффективность удаления 8-охоGua из пары с Cyt, но не Ade. С целью выявления причин специфичности проводили

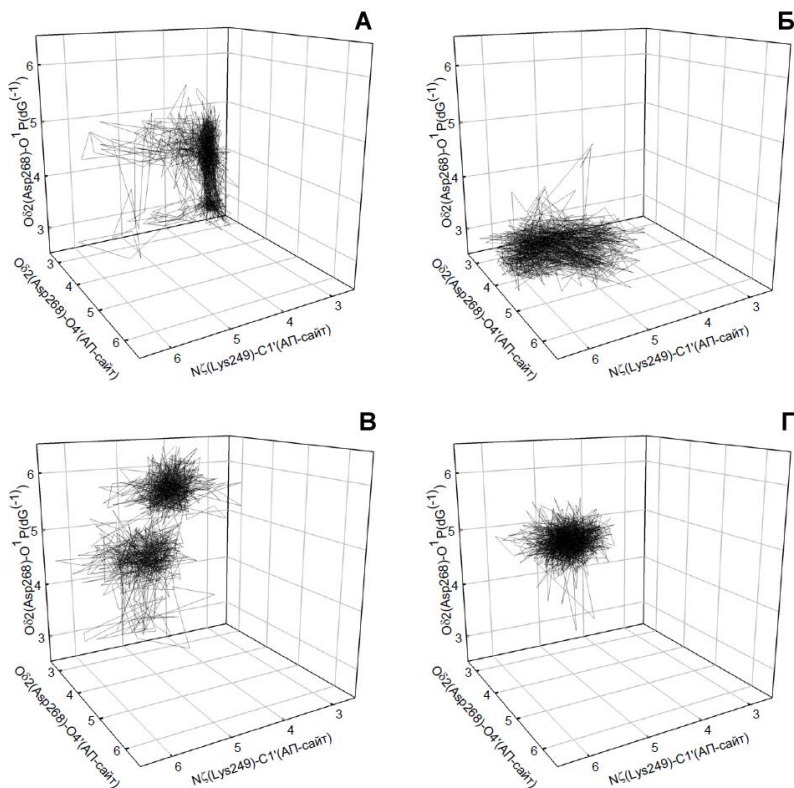


Рис. 9. Популяция каталитически значимых дистанций и углов моделей OGG1 (субстрат АП-сайт). (А) Модель дикого типа; (Б) модель C253I; (В) модель C253L; (Г) модель Q315W.

сравнительное моделирование OGG1 в комплексе с ДНК, содержащей как пару 8-охоGua:Cyt, так и 8-охоGua:Ade. В отличие от моделей Fpg, где остаток аденина моделировался как в *син-*, так и в *анти-*конформации, в данном случае рассматривали только *анти-*Ade вариант. Это связано со стерическими затруднениями поворота Ade в *син-*конформацию из-за жёсткого столкновения с белком.

График популяций конформаций показывает, что модель, 8-охоGua:Ade демонстрирует уход в верхний левый угол (рис. 10, Б), что соответствует неблагоприятной ориентации Lys249 относительно повреждённого основания. Таким образом, ориентация этой аминокислоты представляет собой решающий параметр, влияющий на специфичность OGG1 к основанию напротив повреждённого.

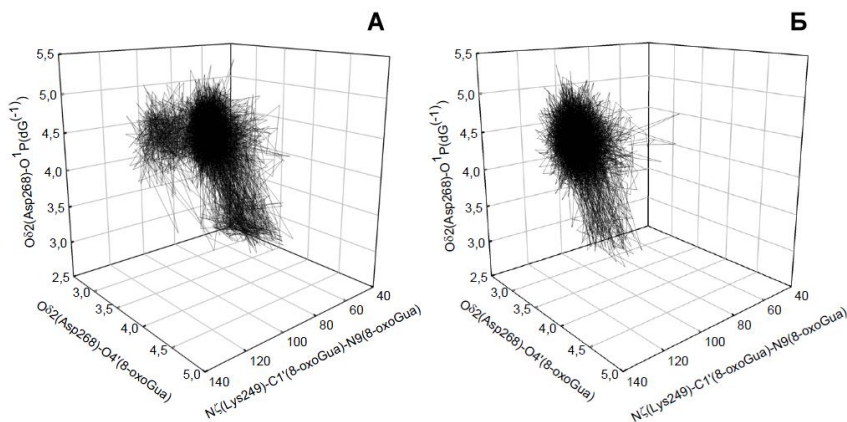


Рис. 10. Популяция каталитически значимых дистанций и углов моделей комплексов OGG1 дикого типа с субстратами, содержащими разные основания напротив 8-охоGua. (А) Модель 8-охоGua:Cyt; (Б) модель 8-охоGua:Ade.

3.4. Кинетические параметры реакции мутантных форм OGG1 с субстратами, содержащими 8-охоGua или АП-сайт. Для оценки влияния на активность OGG1 аминокислотных замен в активном центре были выделены ранее перечисленные мутантные формы белка. Как и ожидалось, они обладали заметно сниженной активностью и в отношении удаления 8-охоGua, и расщепления АП-сайта (рис. 11). При этом относительная активность мутантных форм хорошо согласовывалась со структурными данными, полученными в компьютерных экспериментах.

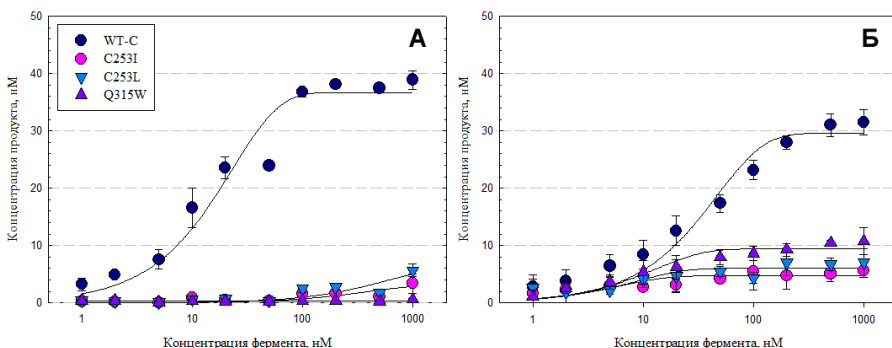


Рис. 11. Зависимость расщепления субстрата от концентрации фермента OGG1. (А) Расщепление субстрата, содержащего 8-охоGua; (Б) расщепление субстрата, содержащего АП-сайт. Легенда для графиков А и Б общая.

Замены Cys на Leu и Ile примерно на порядок снижали значение константы скорости реакции расщепления *N*-гликозидной связи k_{ex} ,

определённой методом кинетики одного оборота, а замена Gln на Trp приводила к полной инактивации фермента (табл. 1). Такие последствия мутации вполне ожидаемы для замен, мешающих связыванию 8-охоGua в активном центре, что не позволяет реагирующей группе Lys249 принять нужную для нуклеофильной атаки ориентацию. Влияние мутаций на константу скорости реакции расщепления цепи ДНК k_{cl} , определённую в условиях кинетики фазы всплеска, было менее выраженным, однако она также снижалась примерно в 5 раз. Очевидно, что искажения, возникающие из-за стерических взаимодействий 8-охоGua с объёмными группами в положении 253, влияют и на эффективность реакции β -элиминирования.

Табл. 1. Значения кажущихся каталитических констант OGG1 для субстрата, содержащего 8-охоGua (k_{ex} , k_{cl}) или АП-сайт (k'_{cl}).

Модель	k_{ex}	отн.	k_{cl}	отн.	k'_{cl}	отн.
		WT		WT		WT
WT	0,097 ± 0,009	1	0,005 ± 0,001	1	0,012 ± 0,001	1
C253I	0,0090 ± 0,0005	0,09 ± 0,01	0,0011 ± 0,0006	0,2 ± 0,1	0,0048 ± 0,0005	0,40 ± 0,05
C253L	0,0130 ± 0,0007	0,13 ± 0,01	0,0011 ± 0,0007	0,2 ± 0,1	0,0055 ± 0,0009	0,46 ± 0,08
Q315W	нет реакции	—	нет реакции	—	0,0071 ± 0,0007	0,59 ± 0,08

В качестве возможного акцептора для уходящего протона при C2' ряд авторов рассматривает само основание 8-охоGua (*Fromme et al., Nat. Struct. Biol., 2003*). Тогда эффективность β -элиминирования может снижаться в том числе из-за снижения сродства 8-охоGua к ферменту после его удаления.

При действии OGG1 и его вариантов на субстраты, содержащие АП-сайт, активность мутантных форм была также сниженной, но более выраженной, чем в случае 8-охоGua. Реакция в этом случае сводится только к процессу β -элиминирования, причем, очевидно, акцептором протона не может выступать удалённое основание. Константа k'_{cl} , определённая методом кинетики одного оборота, в этом случае имеет физический смысл константы скорости реакции β -элиминирования, не осложненной высвобождением продукта. Аминокислотные замены оказывали на неё небольшое влияние, снижая примерно вдвое (табл. 1), что согласуется с отсутствием необходимости связывания основания в активном центре фермента. Константы снижались в ряду Q315W — C253L — C253I, что полностью согласуется со структурными данными о популяции каталитически благоприятных конформаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе предпринята попытка развить методы молекулярной динамики в области упрощения и автоматизации проведения исследования и комплексного анализа полученных результатов. Разработанные программные средства представляют собой законченные продукты, доступные для широкого использования, и уже находят применение в сфере структурной биологии. С привлечением созданных программ проведено исследование молекулярно-динамических аспектов активности и субстратной специфичности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз бактерий и человека. Выявлены структурные детерминанты, позволяющие пролить свет на молекулярные основы узнавания повреждённого основания, а также основания напротив повреждённого, и таким образом на функционирование системы репарации 8-охоGua в целом. Полученные данные компьютерного моделирования также получили в работе экспериментальное подтверждение.

Результаты проведённого исследования не только позволяют углубить фундаментальное понимание механизмов действия ДНК-гликозилаз. Новые структурные данные, а также разработанные программы и алгоритмы могут в дальнейшем лечь в основу методики рационального дизайна ферментов, а именно разработки ДНК-гликозилаз с изменённой субстратной специфичностью для биоаналитических и генноинженерных приложений. Другой важнейший аспект применения знаний о структуре ферментов — это разработка ингибиторов системы эксцизионной репарации оснований для борьбы с онкозаболеваниями. OGG1, как и прочие ферменты репарации, всё чаще рассматриваются как потенциальные терапевтические мишени, подавление которых селективно повышает чувствительность клеток опухоли к цитотоксичному действию химио- и радиотерапии.

Нужно также отметить, что методология, лежащая в основе работы, не ограничивается ДНК-гликозилазами. В частности, разработанный метод поиска сайтов связывания молекул воды, использованный при анализе специфичности Fpg, может быть в дальнейшем обобщён для поиска сильно связанной сольватной оболочки, формирующейся вблизи биополимеров и их комплексов. Такие инструменты востребованы как при анализе интерфейсов взаимодействия биополимеров, так и в рамках разработки высококачественных молекулярно-континуальных моделей растворителя для нужд современной молекулярной динамики.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые программные средства: графический пользовательский интерфейс GUI-BioPASED к пакету BISON/BioPASED, упрощающий формирование заданий для молекулярного моделирования и автоматизирующий первичную верификацию моделей; программа MDTRA с графическим пользовательским интерфейсом, осуществляющая анализ молекулярно-динамических траекторий на принципах эргономичности (проектная организация и конвейер данных), расширяемости (внешнее конфигурирование и пользовательские подпрограммы), эффективной визуализации результатов (немедленный просмотр и экспорт в векторные форматы) и низких системных требований (поддержка многопоточности, GPGPU, оптимизация использования оперативной памяти). В рамках тестирования созданных программ охарактеризован паттерн водородных связей и выявлены районы повышенной конформационной мобильности в молекуле 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы Fpg из *Escherichia coli*.

2. Исследована динамика каталитически важных аминокислотных остатков Pro1 и Glu2 в активном центре 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы Fpg из *Lactococcus lactis* в разных состояниях ионизации. Наиболее оптимальная для катализа пространственная конфигурация реагирующих групп для природного субстрата — пары 8-оксогуанин–цитозин — наблюдалась при нахождении Pro1 в заряженной форме, а Glu2 в нейтральной; после необходимого депротонирования Pro1 допустимы оба состояния ионизации Glu2. Показано, что при связывании ферментом наименее оптимального субстрата — пары 8-оксогуанин–аденин — в наибольшей степени изменяется динамика удалённого от активного центра высококонсервативного кластера в начале С-концевого домена. Установлено, что дезоксиаденозин в парах 8-оксогуанин–аденин в комплексе с Fpg более стабилен в *син*-конформации, чем в *анти*-конформации, характерной для таких пар в свободной ДНК. Обнаружены сайты прочного связывания молекул воды и установлена их потенциальная роль в механизме излома субстратной ДНК, выворачивания повреждённого основания и катализа.

3. Обнаружено, что снижение активности мутантных форм 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1 человека с заменами в активном центре (C253I, C253L, Q315W), в отношении субстратов, содержащих 8-оксогуанин или апуриин-апиримидиновый сайт, происходит за счет деформации активного центра, а не изменений в позиционировании субстратного нуклеотида. Упомянутые мутантные формы белка выделены в рекомбинантном виде, определены стационарные кинетические параметры катализируемых ими реакций; изменение активности мутантных форм соотнесено со степенью отклонения активного центра от каталитически компетентной конформации. Показано, что ориентация аминокислотной группы Lys249 служит определяющим структурным фактором активности фермента OGG1 в отношении исследованных субстратов.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. **Попов А. В.**, Воробьев Ю. Н. Программа GUI-BioPASED для моделирования молекулярной динамики биополимеров с графическим пользовательским интерфейсом // Молекулярная биология — 2010. — Т. 44. — № 4. — С. 648–654.
2. **Popov A. V.**, Vorobjev Yu. N., Zharkov D. O. MDTRA: A molecular dynamics trajectory analyzer with a graphical user interface // J. Comput. Chem. — 2013. — V. 34. — N 4. — P. 319–325.
3. Lukina M. V., **Popov A. V.**, Koval V. V., Vorobjev Yu. N., Fedorova O. S., Zharkov D. O. DNA damage processing by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase mutants with the occluded active site // J. Biol. Chem. — 2013. — V. 288. — N 40. — P. 28936–28947.
4. **Popov A. V.**, Endutkin A. V., Vorobjev Yu. N., Zharkov D. O. Molecular dynamics simulation of the opposite-base preference and interactions in the active site of formamidopyrimidine-DNA glycosylase // BMC Struct. Biol. — 2017. — V. 17. — N 1. — Article No. 5.