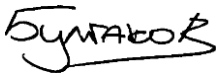
На правах рукописи



БУЛГАКОВ НИКИТА АЛЕКСЕЕВИЧ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ СУПЕРСЕМЕЙСТВА «СПИРАЛЬ–2 ПОВОРОТА–СПИРАЛЬ»

1.5.4 — биохимия

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск — 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук

Научные руководители:

Юдкина Анна Владимировна, к.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, старший научный сотрудник

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии

Официальные оппоненты:

Смирнов Иван Витальевич, д.х.н., член-корреспондент РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, заведующий лабораторией химии протеолитических ферментов

Моор Нина Александровна, д.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории биоорганической химии ферментов

Крумкачева Олеся Анатольевна, д.ф.-м.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории ЭПР спектроскопии

Защита состоится «27» ноября 2026 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «22» октября 2026 г.
Учёный секретарь диссертационного совета,
к.х.н.



Пестряков П.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Из всех видов повреждений, которые образуются в ДНК под действием эндогенных и экзогенных факторов, самые частые — окислительные: они возникают при атаке ДНК активными формами кислорода. Среди окисленных пуринов наиболее распространён 8-оксогуанин (8-oxoG): в *син*-конформации он образует хугстиновскую пару с аденином, что после раунда репликации приводит к трансверсии G//C→T//A — одной из основных причин возникновения рака (колоректальный рак, рак двенадцатиперстной кишки) у человека (сигнатуры SBS18 и SBS36). Пиримидины реагируют с активными формами кислорода реже, но образуют собственный набор повреждений — тимингликоль, 5-гидроксиурацил, дигидроурацил и другие, — которые приводят к мисматчам и апурин-апиримидиновым (АП-) сайтам. Первый этап эксцизионной репарации таких повреждений выполняют ферменты ДНК-гликозилазы. У бактерий окисленные пурины удаляет формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза (Fpg), окисленные пиримидины — эндонуклеаза VIII (Nei); оба фермента принадлежат одному структурному суперсемейству «спираль–2 поворота–спираль» (H2tH), гомологичны по последовательности и используют один и тот же каталитический механизм, но специфичны к разным повреждениям. Сведений об этих ферментах накоплено много: решено более сотни структур, охарактеризован каталитический аппарат, измерены константы отдельных стадий реакции. Тем не менее физико-химические основы субстратной специфичности до сих пор приходится восстанавливать по косвенным данным. Об ионизации каталитической диады Pro1–Glu2 известно только из расчётов. Вклад петли, координирующей повреждённое основание, не измерен для разных субстратов, а структурный механизм толерантности Nei к основанию напротив повреждения не показан вовсе. Практический интерес к этим вопросам не сводится к фундаментальному: нокауты по *fpg* или *nei* у *E. coli* хуже растут в присутствии антибиотиков, блокирующих синтез белка или клеточной стенки, поэтому ингибиторы бактериальных ДНК-гликозилаз рассматриваются как путь к преодолению антибиотикорезистентности.

Цель и задачи. Цель настоящей работы заключалась в детальном изучении механизмов узнавания и удаления окислительных повреждений из ДНК формамидопиримидин-ДНК-гликозилазой (Fpg) и эндонуклеазой VIII (Nei) — репрезентативными ферментами двух главных групп суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль», сходными по структуре, но имеющими разную субстратную специфичность. Были поставлены следующие задачи:

1. Оценить электростатический потенциал активного центра Fpg *Escherichia coli* дикого типа и каталитически неактивного мутантного варианта Fpg E2Q с помощью конъюгированной к двуцепочечному олигонуклеотиду нитроксильной спин-метки с использованием методов спектроскопии

непрерывного ЭПР и модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM).

2. Определить функциональную роль тетрапептидной петли 219–222 Fpg *Lactococcus lactis* в узнавании окислительного повреждения ферментом дикого типа и его мутантными вариантами с рандомизированными заменами аминокислотных остатков петли.
3. Установить пространственную структуру ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК и определить ключевые структурные особенности, отвечающие за способность Nei удалять повреждённые основания напротив всех канонических оснований.

Научная новизна работы. Разработан новый методический подход к экспериментальной оценке электростатического потенциала в активном центре ДНК-гликозилазы, связанной с ДНК-субстратом, основанный на нитроксильной спин-метке и методах непрерывного ЭПР и ESEEM. Впервые экспериментально зарегистрировано смещение pK_a спин-метки в активном центре инактивирующего мутанта E2Q Fpg *E. coli* относительно фермента дикого типа, отражающее изменение электростатики каталитической диады аминокислотных остатков Pro1–Glu2.

Получена и охарактеризована библиотека мутантных вариантов Fpg *L. lactis* с рандомизированными заменами в тетрапептидной петле 219–222 и установлен специфический вклад петли в узнавание 8-оксогуанина.

Впервые получены кристаллические структуры ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК, содержащей C, G или T напротив повреждения. Установлено, что пиримидиновые основания напротив повреждения переходят в *син*-конформацию относительно *N*-гликозидной связи, тогда как пуриновые основания сохраняют *анти*-конформацию и образуют водородную связь с остатком Gln69 интеркалирующей петли 69–71. Количественно охарактеризован стерический вклад в дискриминацию комплементарного основания ферментом Nei *E. coli* через серию ДНК-субстратов с модифицированными по C5-положению пиримидинами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Ферменты суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль» вовлечены в распознавание и удаление самого распространённого класса повреждений ДНК — окислительных. Понимание молекулярных механизмов узнавания открывает два практических приложения. Со стороны белковой инженерии результаты работы полезны для создания ферментов с заданной субстратной специфичностью: показано, что специфичность к 8-oxoG задаётся коротким и слабо консервативным участком, перестройка которого не разрушает ни укладку белка, ни его сродство к ДНК. Со стороны здравоохранения — для разработки ингибиторов бактериальных ДНК-гликозилаз, снижающих устойчивость патогенных микроорганизмов к антибиотикам. Отдельный результат методического характера — способ измерять электростатику

активного центра фермента непосредственно в комплексе с ДНК-субстратом; он применим к любому белку, для которого удаётся собрать лиганд со спин-меткой вблизи интересующего центра.

Методология и методы исследования. Мутантные варианты ферментов получали сайт-направленным мутагенезом; рекомбинантные белки нарабатывали в клетках *E. coli* и выделяли ионообменной хроматографией. Гомогенность препаратов контролировали электрофорезом в ПААГ, целостность укладки ферментов — высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуориметрией. Каталитические параметры измеряли на радиоактивно- и флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных дуплексах в условиях стационарной кинетики и кинетики одного оборота. Сродство к ДНК определяли методом задержки в геле и микромасштабным термофорезом. Электростатику активного центра исследовали методами непрерывного ЭПР и модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (ESEEM) с использованием pH-чувствительной нитроксильной спин-метки, конъюгированной с ДНК-лигандом. Кристаллические структуры ковалентных конъюгатов фермент–ДНК определяли методом макромолекулярной рентгеновской дифракции. Применяли также молекулярно-динамическое моделирование, биоинформатический анализ последовательностей и структур и комплементационный тест на мутаторном штамме *E. coli* CC104 *fpg mutY*.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана методика регистрации электростатического потенциала в активном центре ДНК-гликозилаз в комплексе с ДНК-субстратом, основанная на ковалентной конъюгации нитроксильной спин-метки с субстратом и регистрации сдвига pK_a спин-метки методами непрерывного ЭПР и ESEEM (модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха).
2. Инактивирующая замена остатка Glu2 на Gln в белке Fpg приводит к проявлению буферной ёмкости активного центра в диапазоне pH 7,00–7,37 и смещению pK_a спин-метки в основную сторону на 0,5 ± 0,1, что отражает изменение электростатического потенциала активного центра и свидетельствует об участии остатка Glu2 в переносе протона в ходе реакции.
3. Тетрапептидная петля в С-концевом домене белка Fpg, несмотря на свою невысокую консервативность, вносит ключевой вклад в узнавание окисленных пуринов: рандомизация её аминокислотного состава приводит к резкому падению эффективности удаления 8-оксогуанина при сохранении общей структуры белка, сродства к ДНК и активности по отношению к альтернативным субстратам (АП-сайт, 5-гидроксиурацил).
4. Способность Nei *E. coli* узнавать все канонические основания напротив повреждения обусловлена тем, что белок образует неспецифичную водородную связь с атомом N3 пуриновых оснований и разворачивает

пиримидиновые основания вокруг *N*-гликозидной связи, исключая возможность специфичных контактов.

Личный вклад соискателя. Автором лично и в полном объёме проводились следующие работы: сайт-направленный мутагенез для получения мутантного варианта Fpg *E. coli* E2Q, наработка и выделение всех белков *E. coli*, все биохимические эксперименты (за исключением кинетики фермента Nei), участие в обработке данных ЭПР, подготовка ковалентных конъюгатов Nei с ДНК и их кристаллизация с последующим установлением их кристаллических структур, анализом и депонированием в базу данных Protein Data Bank.

Отдельные эксперименты и расчёты выполнены соавторами: получение и анализ спектров непрерывного ЭПР и ESEEM — к.ф.-м.н. С.С. Овчеренко (НИОХ СО РАН); синтез нитроксильных спин-меток — к.х.н. И.А. Кирилюк (НИОХ СО РАН); синтез олигонуклеотидов для ЭПР-экспериментов — к.х.н. Т.Д. Жарков (ИХБФМ СО РАН); молекулярно-динамическое моделирование комплексов Fpg *E. coli* со спин-мечеными лигандами — к.х.н. А.В. Шернюков (НИОХ СО РАН), молекулярно-динамическое моделирование мутантных вариантов Fpg *L. lactis* — к.ф.-м.н. В.М. Голышев и к.ф.-м.н. А.А. Ломзов (ИХБФМ СО РАН); выделение мутантных вариантов Fpg *L. lactis* — К.А. Макашева и к.б.н. А.В. Юдкина (ИХБФМ СО РАН); комплементационный тест — М.М. Аманова (ИХБФМ СО РАН); сбор дифракционных данных на станции BL02U17 (SSRF) — И.А. Капранов и д.ф.-м.н. В. И. Борщевский (МФТИ); кинетика Nei — к.х.н. А.В. Ендуткин (ИХБФМ СО РАН).**Степень достоверности и апробация результатов.** По материалам диссертации опубликована 3 научных статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 146 страницах, содержит 48 рисунков и 21 таблицу. Библиография включает 277 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа построена на трёх независимых подходах к вопросам узнавания и катализа — что именно в ферментах суперсемейства H2tH определяет выбор субстрата и как формируется каталитически компетентное состояние фермента. Электростатику активного центра Fpg *E. coli* измеряли ЭПР-спектроскопией pH-чувствительной спин-метки, встроенной в ДНК-лиганд. Вклад петли, координирующей повреждённое основание, оценивали на библиотеке вариантов Fpg *L. lactis* со случайными заменами в этой петле, сопоставляя кинетику на четырёх типах субстратов с конформационной динамикой петли. Механизм узнавания основания напротив повреждения устанавливали по серии

кристаллических структур ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК, проверяя структурный вывод биохимически.

1. Электростатический потенциал в активном центре Fpg E. coli

Катализ у ДНК-гликозилаз суперсемейства H2tH основан на участии N-концевого дипептида Pro1–Glu2: α-аминогруппа Pro1 атакует C1′ повреждённого нуклеотида, а Glu2 переносит протон на O4′ дезоксирибозы и стабилизирует переходное состояние. Расчёты pK_a обоих остатков предсказывают их взаимную активацию в предкаталитическом состоянии, но экспериментально ионизация диады в комплексе фермент–ДНК не измерялась. Прямые методы здесь работают плохо: ЯМР требует изотопно-меченного белка, а расчёты по Пуассону–Больцману опираются на статическую структуру. Альтернатива — pH-чувствительные нитроксильные спин-метки, у которых ионизуемая группа имеет pK_a в физиологическом диапазоне, а протонирование радикального центра видно в спектре ЭПР как сдвиг константы сверхтонкого взаимодействия A_N. К ферментам, работающим с нуклеиновыми кислотами, такие метки до настоящей работы не применяли. В связи с чем, в рамках текущей работы метку на основе 4-пирролидино-2,5-дигидроимидазол-1-оксила (pK_a 7,0–7,5) встроили в ДНК-лиганд. Суть эксперимента заключалась в сравнении электростатического потенциала активного центра фермента дикого типа с каталитически неактивным мутантом E2Q.

Лигандом служил дцДНК-дуплекс с брешью длиной один или два нуклеотида, таким образом имитируя продукт β/δ-элиминирования, прочно связываемый ферментом. Метку присоединяли через гексаметиленовый аминолинкер к 5′- или 3′-концу олигонуклеотида, фланкирующего брешь (Рисунок 1А, Б, показано только для конъюгированной метки к 3′-концу олигонуклеотида). Собранные конструкции связывались с EcoFpg с близким сродством: константы диссоциации, измеренные микромасштабным термофорезом, составили 2,3–3,7 мкМ, причём однонуклеотидная брешь давала несколько более прочный комплекс. Наибольшую долю дуплексной формы (около 86% при pH 7,5) по данным непрерывного ЭПР имели дуплексы gap1-NO• и gap2-NO• — их и использовали в дальнейших экспериментах.

Доступность растворителя измеряли методом ESEEM, чувствительным к концентрации дейтерированных молекул в радиусе около 5 Å от радикального центра. У свободных лигандов фактор доступности составлял ~0,80, то есть метка практически полностью экспонирована в раствор. В комплексах с EcoFpg — и с диким типом, и с E2Q — он падал до 0,41–0,52, не зависел ни от длины бреши, ни от варианта фермента. Метка, следовательно, располагается на границе раздела белок–ДНК и изолирована от растворителя.

Где именно метка находится относительно диады, показало молекулярно-динамическое моделирование. Она содержит стереогенный центр и амидную связь с заторможенным вращением, поэтому траектории

рассчитывали для всех четырёх её конфигураций, а для наиболее выгодной R-*trans* набрана траектория длительностью 1,6 мкс. Во всех расчётах метка занимала примерно одно и то же положение и следовала за движением белка как целое — подвижность линкера в комплексе сильно ограничена (Рисунок 1B). Расстояние от радикального центра до атома азота α-аминогруппы Pro1 составило 8,9 ± 0,5 Å, до атомов кислорода карбоксильной группы Glu2 — 14,0 ± 0,7 Å. Рассчитанная для того же ансамбля доступность растворителя (0,56) совпала с измеренной в ESEEM (0,52 ± 0,06). Такое расположение — вблизи активного центра и требуется от репортёра: метка регистрирует потенциал, создаваемый ионизуемыми остатками, но в каталитическом цикле не участвует.

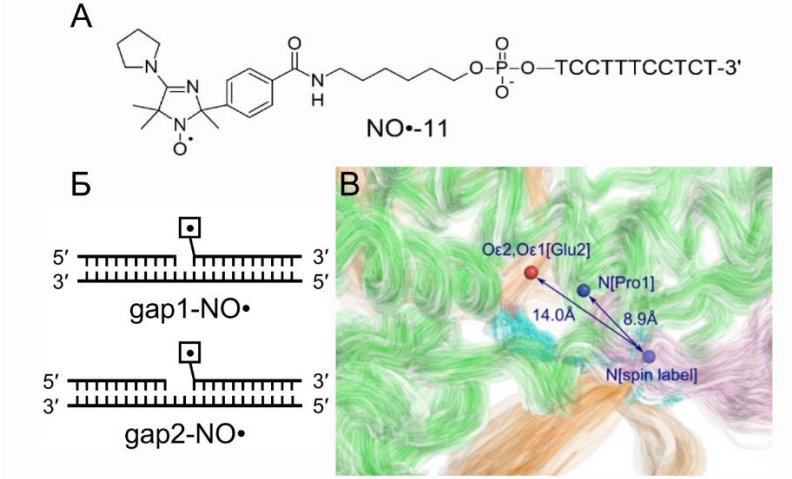


Рисунок 1. А — Структура нитроксильной спин-метки, конъюгированной к олигонуклеотиду. **Б** — Схематичное изображение спин-меченых дцДНК-дуплексов; положение нитроксильной спин-метки обозначено квадратом с точкой. **В** — МД-ансамбль комплекса EcoFpg–gap1-NO• в конфигурации метки R-*trans* (наложение 500 снимков последних 50 нс траектории длительностью 1,6 мкс): белок окрашен зелёным, петля связывания повреждённого нуклеотида — розовым, ДНК — оранжевым, спин-метка — голубым; указаны средние расстояния от радикального центра до N[Pro1] и Oε1,Oε2[Glu2].

Спектры непрерывного ЭПР X-диапазона регистрировали для всех четырёх комбинаций «вариант фермента × лиганд» в диапазоне pH 6,60–8,14. Границы диапазона заданы pK_a самой метки в составе свободного дуплекса (7,7–7,8), расчётными оценками pK_a остатков Pro1 (5–7,5) и Glu2 (5,5–7,5) и пределами устойчивости фермента. Расстояние между крайними компонентами спектра прямо отражает Z-компоненту тензора сверхтонкого взаимодействия A_{Nzz}, чувствительную к состоянию ионизации метки. Для трёх комплексов из

четырёх вся pH-зависимость описывалась единственной pK_a: 6,80 ± 0,03 для EcoFpg WT–gap1-NO•, 7,20 ± 0,06 для EcoFpg WT–gap2-NO• и 7,23 ± 0,06 для EcoFpg E2Q–gap2-NO•. Совпадение двух последних значений означает, что при двунуклеотидной бреши метка слишком удалена от дипептида, чтобы регистрировать вклад его ионизации.

Иначе ведёт себя комплекс EcoFpg-E2Q–gap1-NO• (Рисунок 2). Ниже pH 7,00 его точки ложатся на кривую фермента дикого типа; в интервале pH 7,00–7,37 появляется отчётливый перегиб (Рисунок 2, красная стрелка указывает на перегиб); выше метка выходит на ту же кривую, что и оба gap2-комплекса. Одной pK_a эти данные не описываются — аппроксимация требует двух, что отвечает буферной ёмкости вблизи pH 7,2, как это было описано для гидратированных поверхностей с ионизуемыми группами рядом с радикальным центром. Весь полученный набор значений выстраивается в градиент: свободный дуплекс — 7,7–7,8; связывание фермента при двунуклеотидной бреши снижает pK_a на ~0,5 единицы (вклад ДНК-связывающего канала в целом); сокращение бреши на один нуклеотид добавляет ещё ~0,4 (вклад остатков активного центра); замена Glu2 на изоморфный по объёму, но электронейтральный Gln убирает примерно ту же добавку.

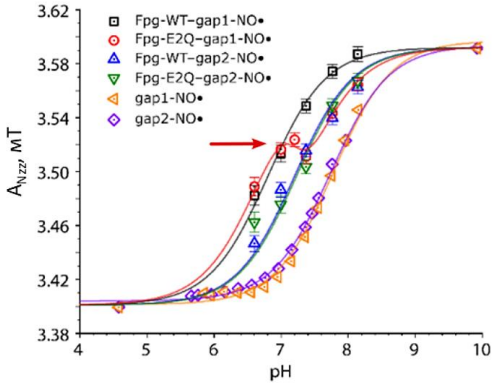


Рисунок 2. Значения A_{Nzz}, рассчитанные из расстояния между низкополевым и высокополевым компонентами спектров непрерывного ЭПР X-диапазона, в зависимости от pH: комплексы EcoFpg WT–gap1-NO• (чёрные квадраты), EcoFpg E2Q–gap1-NO• (красные кружки), EcoFpg WT–gap2-NO• (синие треугольники), EcoFpg E2Q–gap2-NO• (зелёные перевёрнутые треугольники) и свободные дуплексы gap1-NO• (оранжевые треугольники) и gap2-NO• (фиолетовые ромбы). Стрелкой отмечен перегиб на кривой EcoFpg E2Q–gap1-NO• при pH 7,2. Сплошные линии — аппроксимация уравнением Хендерсона–Хассельбаха.

Сдвиг pK_a спин-метки складывается из полярностного и электростатического вкладов. При сравнении WT и E2Q в одинаковых комплексах первым в первом приближении можно пренебречь: замена COO^- на

$CONH_2$ почти изоморфна по объёму и, по рентгеновским данным, не перестраивает активный центр. Тогда наблюдаемый сдвиг 0,5 ± 0,1 единицы отвечает изменению локального поверхностного потенциала на $\psi \approx -30 \pm 6$ мВ. Это верхняя оценка: остаточный полярностный вклад, связанный с заменой ориентированного диполя карбоксилата на диполь амидной группы, в такой схеме от электростатического не отделяется.

Отнести буферное плечо именно к ионизации остатка Pro1 позволяет отсутствие рядом других титруемых групп. Гистидина в активном центре EcoFpg нет вовсе; четыре цистеина связаны в тетраэдрическую координацию иона Zn^{2+} цинкового пальца и имеют резко сниженные pK_a; поверхностные остатки Lys и Arg ДНК-связывающего канала к замене E2Q нечувствительны и при сравнении одинаковых комплексов разностного сигнала не дают. Замены каталитического остатка Glu2 (E2Q, E2K, E2G) описаны как соматические мутации в опухолях и как редкие герминальные варианты для всех трёх человеческих гомологов EcoFpg — NEIL1, NEIL2 и NEIL3, причём E2Q встречается чаще остальных. Прямых экспериментальных свидетельств того, как именно работает эта замена, до сих пор не было. Судя по полученным данным, она перераспределяет ионизационное состояние каталитической пары и инактивирует фермент по крайней мере отчасти через утрату активации N-концевого пролина, а не только через утраты Glu2 для переноса протона.

Ограничение метода очевидно: он требует лиганда, который фермент связывает прочно и в известной геометрии. Для ферментов суперсемейства H2tH такой лиганд — брешь-содержащий дуплекс — уже описан, поэтому ту же схему (метка в бреши, ESEEM-контроль доступности, МД-локализация) можно применить к EcoNei и человеческим NEIL1–NEIL3 без изменений.

2. Роль тетрапептидной петли 219–222 Fpg Lactococcus lactis в узнавании окислительного повреждения

Сайт связывания повреждённого основания у ферментов суперсемейства H2tH образован преимущественно гибкой петлёй, которая в большинстве комплексов фермент–ДНК остаётся неупорядоченной или упорядочена лишь частично. Прямого контакта Fpg с атомом O8 8-oxoG — тем самым, который отличает повреждение от гуанина, — структуры не показывают. Зато три структуры показывают другое: тетрапептидная петля координирует экзоциклический кислород повреждённого основания амидными группами пептидного остова. В комплексе LlaFpg с ДНК, содержащей нерасщепляемый карбоциклический аналог 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидина (FapyG), петля ^{219}IRTY^{222} удерживает атом O6 повреждения (PDB ID 1XC8, Рисунок 4A); каталитически инактивированный мутант BstFpg E2Q тем же способом связывает либо O6 8-oxoG, либо O4 5,6-дигидроурацила (ohU). К этому добавляется более раннее наблюдение: EcoFpg утрачивает способность к удалению 8-oxoG при полной делеции петли, что почти не влияет на активность

по отношению к FapyG, 4,6-диамино-5-формамидопиримидину (FapyA), спироиминодигидантоину и гуанидиногидантоину. В узнавание разных субстратов петля, следовательно, вовлечена по-разному. Объектом исследования выбран LlaFpg: разрешение его структуры в комплексе с FapyG (1,95 Å) выше, чем у структуры BstFpg с 8-oxoG (2,34 Å), что существенно при моделировании и анализе замен в саму петлю.

Для ответа на вопрос насколько консервативен тетрапептид отобрали 428 последовательностей Fpg по строгим критериям: N-концевой домен должен опознаваться как специфический хит семейства cd08966 базы данных консервативных доменов NCBI, вблизи C-конца должен присутствовать мотив -CXXCQ- цинкового пальца, и на каждое таксономическое семейство брали не более одной последовательности. Петля длиной четыре остатка нашлась у 345 белков из 428 (81%), однако её длина варьировалась от двух до девяти остатков. Состав оказался консервативен умеренно: во второй позиции (Arg220 у LlaFpg) встречается широкий набор полярных и заряженных остатков, в первой и четвёртой (Ile219 и Tyr222) — преимущественно гидрофобные и ароматические. На фоне действительно консервативных элементов суперсемейства — каталитической диады Pro1–Glu2, мотива «спираль–два поворота–спираль» и цинкового пальца — такая вариабельность структурно важного элемента выглядит неожиданно. Поэтому для анализа вклада петли в катализ и узнавание повреждения вводили в петлю случайные замены а.к.о.

Пять вариантов LlaFpg с рандомизированными последовательностями на месте ^{219}IRTY^{222} — ^{219}EDMM^{222}, ^{219}NPGR^{222}, ^{219}RQHG^{222}, ^{219}RSAD^{222} и ^{219}WPHG^{222} — получили сайт-направленным мутагенезом с последующей экспрессией в *E. coli*, выделили хроматографически до степени чистоты не менее 95%. Два из пяти, NPGR и WPHG, содержат остаток Pro во второй позиции: пептидная связь перед пролином не имеет N–H-донора, то есть одна из четырёх потенциальных водородных связей с O6 повреждения у них заведомо исключена. Гомологическое моделирование на стадии дизайна не выявило стерических конфликтов ни для одного из пяти мутантных варианта фермента. Укладку белка проверяли высокоскоростной дифференциальной сканирующей флуориметрией: кривые денатурации всех вариантов по форме совпадали с кривой фермента дикого типа, а температуры плавления лежали в диапазоне 56,8–59,0 °C против 53,8 °C у WT (Таблица 1). Ни один из мутантов не дестабилизирован — скорее наоборот, и это объяснимо: случайные четыре остатка с большей вероятностью образуют локально более жесткую (хотя и каталитически непродуктивную) укладку, чем функционально подвижная природная петля.

Для проверки каталитической активности мутантных вариантов, в качестве субстрата в первую очередь взяли АП-сайт — повреждение, при расщеплении которого петля не нужна вовсе. Fpg расщепляет АП-сайты по механизму β- и β/δ-элиминирования, которое инициируется атакой α-

аминогруппы остатка Pro1 по C1′ дезоксирибозы, а в структурах с нерасщепляемыми аналогами АП-сайта петля разупорядочена. Активность ферментов на таком субстрате показывает, что стало со стадиями каталитического цикла, в которых петля не участвует. Все варианты расщепляли дуплекс с АП-сайтом напротив цитозина, хотя и медленнее WT. Константа специфичности k_{cat}/K_M у EDMM, NPGR и WPHG составила 0,48–0,66 от WT, у RQHG — 0,07 (падение в основном за счёт k_{cat}), у RSAD — 0,14, причём для последнего насыщения субстратом достичь не удалось и величину оценивали по наклону начального участка. Механизм при этом не изменился: в присутствии $NaBH_4$ все варианты, как и WT, давали медленно мигрирующую полосу ковалентного комплекса фермент–ДНК, то есть остаток Pro1 по-прежнему атакует C1′ с образованием основания Шиффа. Сохранилось и сродство к повреждённой ДНК: константы диссоциации комплексов с дуплексами, содержащими нерасщепляемый аналог АП-сайта тетрагидрофуран (THF) напротив C или A, для всех вариантов лежали в диапазоне 0,4–3,9 нМ (Таблица 1). Это ожидаемо — основная часть контактов в комплексе Fpg–ДНК приходится на фосфодиэфирный остов, и петля в них не участвует.

Специфичность к основанию напротив повреждения на АП-субстратах слабо выражена у самого фермента дикого типа: k_{cat}/K_M на АП//C и АП//A различались в пределах ошибки измерения. У мутантов единой закономерности не обнаружилось — NPGR и WPHG заметно предпочитали C, у RQHG активность падала на обоих субстратах одинаково, а EDMM на АП//A не отличался от WT. Окисленный пиримидин 5-гидроксиурацил (ohU), который Fpg на модельных дуплексах удаляет не хуже 8-oxoG, дал схожую картину: k_{cat}/K_M снижалась в 3,4–4,3 раза у EDMM, NPGR и WPHG и в 7,7 и 17 раз у RSAD и RQHG. Активности на ohU//C и АП//C у шести вариантов менялись согласованно ($r = 0,87$). На субстрате ohU//A, где пара стабилизирована водородными связями и выворачивание повреждённого нуклеотида затруднено, WT был примерно в 2,5 раза менее активен, чем на ohU//C, а мутанты менее активны от 1,6 до 7,1 раза. Иными словами, при удалении ohU замены в петле сказываются на активности значительно слабее, чем следовало бы ожидать, если бы петля определяла узнавание этого субстрата: ohU распознаётся неспецифически, скорее как АП-сайт, чем как повреждённое основание.

В реакциях с ключевым субстратом Fpg — 8-oxoG, картина была иной. При 5 нМ фермента и 50 нМ субстрата WT за 60 мин расщеплял половину дуплекса 8-oxoG//C, тогда как у всех пяти мутантов продукта накапливалось слишком мало, чтобы определить K_M и k_{cat} в стационарных условиях. Каталитическую стадию поэтому характеризовали в условиях кинетики одного оборота: при 2 мкМ фермента и 200 нМ субстрата на молекулу фермента приходится одно событие расщепления. Накопление продукта во времени хорошо описывалось моноэкспоненциальной функцией; наблюдаемая константа скорости первого порядка k_{obs} у WT составила $(1,1 \pm 0,2)\cdot 10^{-2}$ с$^{-1}$, а у

мутантных вариантов — от $4{,}6\cdot10^{-5}$ до $1{,}0\cdot10^{-4}$ $с^{-1}$, то есть на 2–3 порядка меньше (Рисунок 3А, Таблица 1). Все пять величин лежат в пределах одного порядка друг от друга: какая именно случайная последовательность стоит на месте петли, почти не важно. Линейность k_{obs} по концентрации фермента не контролировали, поэтому полученные значения следует рассматривать как нижнюю оценку константы химической стадии; для вывода принципиален масштаб различия с диким типом, который сохраняется при любой такой поправке.

Таблица 1. Свойства мутантных вариантов LlaFpg по тетрапептидной петле 219–222: температура плавления, сродство к ДНК с аналогом АП-сайта и каталитическая эффективность на разных субстратах относительно фермента дикого типа (k_{cat}/K_M в стационарных условиях для АП- и ohU-субстратов; k_{obs} в условиях кинетики одного оборота для 8-oxoG//C).

Вариант	T_m, °C	K_d (THF//C), нМ	АП//C	АП//A	ohU//C	ohU//A	8-oxoG//C
WT	53,8	2,2 ± 0,5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
EDMM	56,8	0,5 ± 0,2	0,49	1,04	0,26	0,28	$5{,}0\times10^{-3}$
NPGR	57,8	3,0 ± 1,1	0,48	0,08	0,29	0,14	$9{,}1\times10^{-3}$
RQHG	59,0	3,3 ± 1,3	0,07	0,08	0,06	0,26	$7{,}1\times10^{-3}$
RSAD	57,1	1,5 ± 0,4	0,14	0,25	0,13	0,26	$4{,}2\times10^{-3}$
WPHG	57,5	0,4 ± 0,2	0,66	0,06	0,23	0,61	$6{,}7\times10^{-3}$

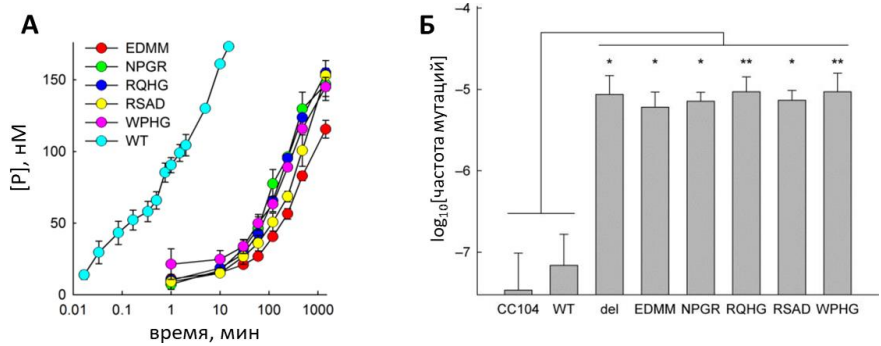


Рисунок 3. А — Накопление продукта во времени в условиях кинетики одного оборота (200 нМ субстрата 8-oxoG//C, 2 мкМ фермента) под действием WT и мутантных вариантов LlaFpg. **Б** — Частота форвард-мутаций к устойчивости к рифампицину в штамме CC104 *fpg mutY*, трансформированном плазмидой, кодирующей WT LlaFpg (WT), неактивный делеционный вариант LlaFpgΔH2TH (del) или один из мутантных вариантов по петле; CC104 — штамм дикого типа, трансформированный плазмидой LlaFpgΔH2TH. Варианты LlaFpg обозначены цветом. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего трёх независимых экспериментов (А) и n = 5 (Б).

Проявляется ли этот эффект в клетке, проверяли комплементационным тестом в штамме *E. coli* CC104 *fpg mutY*, у которого инактивированы две основные системы защиты от мутагенного действия 8-oxoG, в связи с чем он обладает примерно в 100 раз повышенной частотой трансверсий G//C→T//A, регистрируемых по форвардному тесту устойчивости к рифампицину. Плазмида с WT LlaFpg снижала частоту мутаций почти на два порядка — до уровня штамма CC104 с интактными хромосомными копиями *fpg* и *mutY*, то есть полностью комплементировала дефект. Ни один из пяти мутантов по петле значимого снижения не давал, как и делеционный вариант LlaFpgΔH2TH, лишённый ДНК-связывающего мотива и использованный в качестве отрицательного контроля (Рисунок 3Б).

В итоге, полученные мутантные варианты хуже удаляли 8-oxoG, но не АП-сайт или ohU. При анализе доступных структурух LlaFpg в комплексе с ДНК было обнаружено, что сегмент ^{219}IR…ST^{228} принимает две различные конформации: «активную», замкнутую вокруг экзоциклического кислорода повреждённого основания (1XC8), и «неактивную», отведённую от ДНК (1PJJ, комплекс с аналогом АП-сайта); среднеквадратичное отклонение Cα-атомов между ними составляет 4,1 Å (Рисунок 4А).

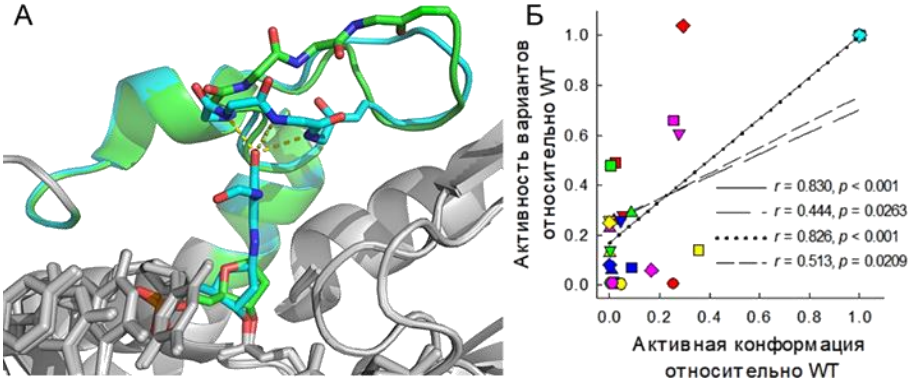


Рисунок 4. А — Две конформации петли, связывающей повреждение, в LlaFpg в комплексе с ДНК, содержащей повреждённое основание (1XC8, голубой), или аналог АП-сайта (1PJJ, зелёный). **Б** — Зависимость относительной активности вариантов LlaFpg от доли молекулярно-динамической траектории, проведённой петлёй в активной конформации: кружки — 8-oxoG//C, треугольники — ohU//C, перевёрнутые треугольники — ohU//A, квадраты — АП//C, ромбы — АП//A; цвета вариантов совпадают с соответствующими вариантами на рисунке 3.

Активная укладка обнаружена также в BstFpg с 8-oxoG- и h_2U-содержащей ДНК и устойчиво сохраняется в молекулярной динамике. Чтобы связать конформацию петли с активностью, рассчитали 66 траекторий: шесть вариантов фермента в 11 комплексах каждый — со всеми субстратами, использованными в кинетических экспериментах, причём повреждённое

основание и остающийся напротив аденин моделировали и в *анти*-, и в *син*-конформации. Для WT в комплексе с 8-oxoG(*син*)//C распределения оказались одновершинными, и петля была значительно ближе к 1XC8 (1,74 ± 0,37 Å), чем к 1PJJ (4,60 ± 0,13 Å). Приняв эту динамику за эталон активного состояния, для каждой траектории вычислялась взвешенную долю кадров, попадающих в «активный» диапазон. Эта доля коррелирует с относительной активностью фермента на соответствующем субстрате: $r = 0{,}830$ при $p < 0{,}001$ (Рисунок 4Б). Корреляция устойчива: анализ чувствительности методом Монте-Карло со случайным прореживанием выборки дал индекс устойчивости 0,63 — более 60 % точек можно удалить, прежде чем значимость исчезнет, — а исключение всех траекторий с 8-oxoG её практически не меняет ($r = 0{,}826$).

У остальных представителей суперсемейства аналога тетрапептидной «крышки» нет: у Nei, NEIL1–NEIL3 и MMH петля, связывающая повреждение, короче или свёрнута совершенно иначе. Узнавание через амиды пептидного остова снимает противоречие между низкой консервативностью петли и её функциональной незаменимостью: боковые радикалы в контакте с повреждением не участвуют, поэтому последовательность может дрейфовать, пока сохраняется геометрия остова. Открытым остаётся другой вопрос — почему мутанты по петле сохраняют способность удалять ohU, а делеционные варианты EcoFpg — FapyG, FapyA, спироиминодигидантоин (Sp) и гуанидиногидантоин (Gh). Вероятное объяснение состоит в том, что все эти повреждения сами по себе дестабилизируют дуплекс, тогда как относительно стабильный 8-oxoG нужно удерживать во внеспиральном положении, и вот для этого петля необходима. С таким объяснением согласуется оценка методом остановленной струи: пиримидиновый субстрат h_2U в комплексе с EcoFpg примерно в 50 раз стабильнее в вывернутом состоянии, чем 8-oxoG.

Полученные результаты позволяют предположить и то, какие была направлена эволюция суперсемейства. Все его представители, кроме Fpg, специфичны к окисленным пиримидинам и основаниям с насыщенным кольцом — структурно разнородной группе повреждений, которые, вероятно, преобладали в бескислородной атмосфере ранней Земли. Гибкость и низкая консервативность петли в этом случае отражают необходимость узнавать широкий набор атипичных оснований, а Fpg выглядит поздним приобретением бактерий, специализированным под одно конкретное повреждение — 8-oxoG, которое стало распространённым лишь после Великого кислородного события. С более практической точки зрения та же эволюционная пластичность петли представляет собой ресурс для перенастройки специфичности H2tH-ферментов на другие повреждённые или синтетические неприродные основания.

3. Узнавание основания напротив повреждения эндонуклеазой VIII E. coli

Помимо специфичности к самому повреждению, ДНК-гликозилазы суперсемейства H2tH обладают предпочтением к основанию напротив него —

свойством, которое задаётся архитектурой триады остатков интеркалирующей петли. У EcoNei это предпочтение выражено слабо: по опубликованным кинетическим данным фермент расщепляет субстраты с любым из четырёх канонических оснований напротив окисленного остатка. Структурный механизм такой толерантности оставался неизвестным, поскольку в Protein Data Bank была лишь одна структура EcoNei в комплексе с ДНК — ковалентный конъюгат с аденином напротив восстановленного АП-сайта (1K3W). Прежде считалось, что с каждым основанием напротив повреждения фермент образует свой набор водородных связей, обеспечивающий сходные каталитические параметры. Проверить это можно было только структурно, получив комплексы с остальными тремя основаниями на той же последовательности дуплекса.

Дуплексы ДНК содержали тимингликоль (Tg) и C, G или T напротив повреждения. EcoNei инкубировали с дцДНК в присутствии $NaBH_4$: фермент удаляет Tg, а возникающее между остатком Pro1 и образующимся дезоксирибитом основание Шиффа восстанавливается до стабильного третичного амина (Рисунок 5Б). Полученные конъюгаты выделяли ионообменной хроматографией и кристаллизовали методом сидячей капли в цитратном буфере с сульфатом аммония. Дифракционные данные собраны на станции BL02U17 Шанхайского источника синхротронного излучения, обработаны в XDS и Aimless; фазовую проблему решали молекулярным замещением на структуру 1K3W, модели достраивали в Coot и уточняли в Refmac5. Все три набора данных дали пространственную группу $P4_322$ с одной молекулой конъюгата в элементарной ячейке. Итоговое разрешение составило 1,75 Å для комплекса с цитозином напротив повреждения (далее Nei-X:C), 1,85 Å для Nei-X:G и 1,80 Å для Nei-X:T при R_{work}/R_{free} 18,7/21,6, 19,4/23,7 и 20,7/23,7 % соответственно; структуры депонированы в Protein Data Bank под идентификаторами 9VRM, 9VR3 и 9VR4 (Рисунок 5).

Белковая часть во всех четырёх комплексах практически одинакова: среднеквадратичное отклонение Cα-атомов от Nei-X:A составляет 0,22–0,25 Å, а междоменные и торсионные углы различаются в пределах ±1° — замена основания напротив повреждения глобальных перестроек не вызывает. Петля 215–222, формирующая часть кармана для повреждённого основания, не разрешена ни в одной из структур, включая новые; то же характерно для всех структур H2tH-ферментов, в которых повреждённое основание уже удалено из ДНК. Сохраняются и основные контакты с ДНК: белок покрывает 703–736 $Å^2$ поверхности повреждённой цепи и 336–406 $Å^2$ комплементарной. Заметно варьирует лишь деформация ДНК — угол скручивания между парами оснований, фланкирующими повреждение, составляет около 39° в Nei-X:C и Nei-X:T, 45° в Nei-X:A и 52° в Nei-X:G.

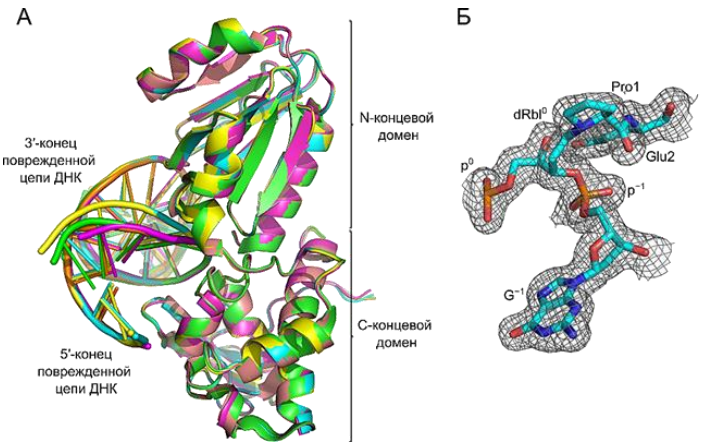


Рисунок 5. А — Наложение структур EcoNei, ковалентно связанного с ДНК, содержащей A (1K3W, зелёный), C (Nei-X:C, голубой), G (Nei-X:G, пурпурный) и T (Nei-X:T, жёлтый) напротив повреждения. **Б** — Сшивка дезоксирибит–Pro1 в комплексе Nei-X:C с экспериментальной электронной плотностью $2F_o - F_c$ на уровне 1σ.

Серия структур позволила разделить внутрибелковые сети водородных связей на две группы. Стабильные сети (остатки Arg7–Asp11–Thr49–Tyr209, Glu5–Tyr169–Ser208–Arg212 и Asn168–Arg171–Ser250) связывают N-концевую каталитическую спираль αA с β-сэндвичем кора, мотивом «спираль–два поворота–спираль» и цинковым пальцем, жёстко фиксируя каталитический остов вокруг повреждённого нуклеотида. Сеть остатков Arg124–Arg151–Asp159, напротив, лабильна: остаток Arg124 междоменного линкера принимает в разных структурах разные конформации, в одних образуя водородные связи с фосфатом ДНК, в других — с Asp159. Ранее пару остатков Arg124–Asp159 рассматривали как ионный «замок», удерживающий закрытую конформацию белка после смыкания доменов на ДНК; новые структуры показывают, что замок этот не жёсткий, а его перестройки компенсируют зависящие от основания напротив повреждения вариации скручивания и изгиба ДНК и могут участвовать в смыкании доменов при связывании субстрата и в их размыкании при высвобождении продукта.

Самое неожиданное обнаружилось при детальном анализе контактов с основанием напротив повреждения. В Nei-X:A атом Nε2 остатка Gln69 образует единственную водородную связь с N3 аденина. Атом N3 не специфичен для аденина, но он изостеричен для N3 гуанина и O2 пиримидинов, — поэтому ожидались аналогичные связи остатка Gln69 с атомами N3[G], O2[C] и O2[T], стабилизирующие любое основание напротив. Ожидание оправдалось только для гуанина: в Nei-X:G возникли две связи, Oε1[Gln69]–N2[G] и Nε2[Gln69]–N3[G], а положение петли и самого основания почти не изменилось по сравнению с Nei-X:A (Рисунок 6Б, Г).

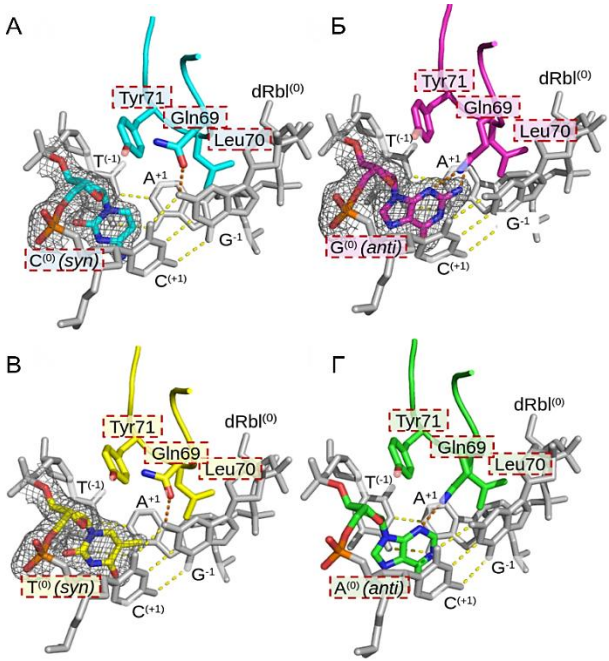


Рисунок 6. Взаимодействие EcoNei с основанием напротив повреждения в структурах: **А** — Nei-X:C, **Б** — Nei-X:G, **В** — Nei-X:T и **Г** — Nei-X:A (1K3W). Пуриновые основания сохраняют *анти*-конформацию и образуют водородную связь с Nε2[Gln69]; пиримидиновые повёрнуты в *син*-конформацию, атом O2 обращён в большую бороздку, контактов с белком нет. Расстояния между донорами и акцепторами водородных связей указаны в Å.

Пиримидины повели себя иначе. И цитозин, и тимин повернулись на 180° вокруг *N*-гликозидной связи в *син*-конформацию, так что атом O2 оказался обращён в большую бороздку и с ферментом не взаимодействует вовсе; у тимина поворот сопровождался дополнительным наклоном основания и сменой конформации сахара на O4′-эндо, тогда как у dC, dG и dA сохранялся C4′-экзо. Освободившийся от контактов с основанием напротив боковой радикал остатка Gln69 выходил из бреши между нуклеотидами A^{+1} и G^{-1} и образовывал связь Oε1[Gln69]–N2[G^{-1}] с экзоциклической аминогруппой соседнего гуанина, а сам G^{-1} слегка, примерно на 15°, разворачивался в освободившееся пространство. Прямых водородных связей между ферментом и атомами Уотсон–Криковской грани C или T в структурах нет: N3 тимина гидратирован отдельной молекулой воды, а N4 цитозина замыкает водный мостик через большую бороздку на N6 аденина A^{+1} (Рисунок 6А, В).

Разрешение 1,75 и 1,80 Å для Nei-X:C и Nei-X:T позволяет установить ориентацию основания однозначно, а анализ кристаллических контактов подтверждает, что ни петля ^{69}QLY^{71}, ни основание напротив повреждения не участвуют во взаимодействиях с симметрично связанными молекулами, а значит наблюдаемая *син*-ориентация не является артефактом упаковки. Одну оговорку всё же следует сделать: все четыре структуры получены на одной и той же последовательности дуплекса, а связь Oε1[Gln69]–N2[G^{-1}] возможна только при гуанине в позиции −1, поэтому общность механизма требует проверки в других нуклеотидных контекстах. Зато из внутриспиральной ориентации ребра C5=C6 пиримидинов следует прямое и проверяемое предсказание: объёмный заместитель при C5 пиримидина напротив повреждения должен стерически мешать размещению этого нуклеотида в спирали и снижать эффективность расщепления.

Проверку этой гипотезы проводили на субстратах, где повреждением служил 5-гидроксиурацил (ohU, в отличие от Tg он не даёт стереоизомеров с разной эффективостью расщепления), а в качестве нуклеотидов напротив использовали тимин, 5-этинилурацил (EtU) или 5-(окта-1,7-диин-1-ил)-урацил (C8-AlkU). Ни EtU, ни C8-AlkU сами не расщепляются ни EcoNei, ни человеческими NEIL1 и NEIL2. За 5 мин реакции на субстратах с EtU и C8-AlkU Nei образовывал примерно в 3 раза меньше продукта, чем с тимином. В стационарных условиях k_{cat} снижалась в 1,7–2,1 раза, а K_M возрастала вдвое для EtU и вчетверо для C8-AlkU, так что константа специфичности падала в 4,1 и 7,2 раза соответственно (Таблица 2).

Таблица 2. Кинетические параметры EcoNei в стационарных условиях для субстратов, содержащих 5-гидроксиурацил напротив различных 5-замещённых пиримидиновых оснований.

Субстрат	K_M, нМ	k_{cat}, мин$^{-1}$	k_{cat}/K_M, нМ$^{-1}$×мин$^{-1}$
ohU//T	4,1 ± 0,6	0,17 ± 0,01	(4,2 ± 0,5)×10^{-2}
ohU//EtU	7,8 ± 0,9	0,087 ± 0,01	(1,1 ± 0,1)×10^{-2}
ohU//C8-AlkU	17 ± 3	0,098 ± 0,01	(5,7 ± 1,2)×10^{-3}

Среднее значение ± стандартная ошибка среднего трёх независимых экспериментов.

Показательно распределение эффекта: K_M растёт заметно сильнее, чем падает k_{cat}, то есть больше всего увеличение радикала при C5 атоме пиримидина влияет на стадию связывания и выворачивания повреждённого нуклеотида, а не на катализ разрыва *N*-гликозидной связи, что и предсказывает стерическая модель. Сохранение части активности говорит о том, что нуклеотид напротив повреждения, по-видимому, обладает некоторой свободой *син*-/*анти*-равновесия в растворе, и природные пиримидины могут распознаваться и в *анти*-конформации; в кристалле же комплементарный пиримидин принимает энергетически наиболее выгодную *син*-конформацию. Поворот пиримидина

напротив повреждения в *син*-конформацию ранее не был описан ни для одной ДНК-гликозилазы. *Син*-конформация гуанина напротив повреждения встречается — в Fpg *B. stearothermophilus* (1L2D), MMH *A. thaliana* (3TWM) и NEIL1 мимивируса (3VK7), — но все эти ферменты несут интеркалирующую триаду Fpg-типа, в которой атомы O6 и N7 *син*-dG изостеричны N3 и O4 *анти*-dC и распознаются одним и тем же остатком аргинина. У человеческого NEIL1 комплементарные основания остаются в *анти*-конформации. EcoNei, таким образом, оказывается первым описанным белком, в кристаллической модели которого внутриспиральные пиримидины обычной B-формы ДНК принимают *син*-конформацию с изоляцией Уотсон–Криковской грани от а.к.о. остатков фермента. Индуцирует ли фермент такую ориентацию активно или лишь допускает её геометрией интеркалирующей петли ^{69}QLY^{71} остается вопросом для молекулярной динамики, мутагенеза Gln69 и структур в других нуклеотидных контекстах; дальнейшие структурные исследования других ДНК-гликозилазных комплексов покажут, используется ли этот механизм шире.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа представляет собой исследование, которое дополняет существующие знания о механизмах работы ферментов Fpg/Nei, формируя целостную картину катализа, и закрывает поставленные вопросы с помощью прямых экспериментальных подходов: ЭПР-спектроскопия спин-метки, конъюгированной с ДНК-лигандом в комплексе с вариантами Fpg, рандомизация функционально важной петли в Fpg и измерение кинетических параметров мутантных вариантов фермента на ДНК-субстратах и рентгеновская кристаллография серии ковалентных конъюгатов фермента Nei с ДНК.

Впервые была разработана pH-чувствительная спин-метка со значением p*K*a близким к физиологическим значениям pH, а также методика конъюгирования метки к ДНК и измерен электростатический потенциал активного центра фермента дикого типа и инактивированного варианта Fpg с помощью такого лиганда. Ионизация каталитической диады Pro1–Glu2 до сих пор оценивалась только методами МД-моделирования. Оказалось, что pH-чувствительная нитроксильная спин-метка, помещённая в брешь ДНК-лиганда, пригодна как репортёр: она располагается в 9 Å от α-аминогруппы остатка Pro1 и регистрирует создаваемый активным центром электростатический потенциал. Инактивирующая замена Glu2 → Gln сдвигает наблюдаемую p*K*a метки на 0,5 ± 0,1 единицы и создаёт буферное плечо при pH 7,00–7,37. Из чего следует, что такая замена меняет ионизационное состояние диады целиком, а не просто убирает акцептор протона. Разработанный экспериментальный подход без принципиальных изменений переносится на другие ферменты суперсемейства H2tH и на белок-нуклеиновые комплексы в целом. Более того, в будущем метод может быть усовершенствован (создание более компактных и структурно

жестких меток, объединение с продвинутыми протоколами ЭПР и ЯМР, а также МД). Углублённое понимание электростатических движущих сил в ферментативном катализе будет способствовать рациональному дизайну ингибиторов, нацеленных на пути репарации ДНК при онкологических заболеваниях, открывая путь к новым терапевтическим стратегиям.

Петля, координирующая повреждённое основание, у Fpg слабо консервативна, хотя её делеция приводит к инактивации фермента на субстрате, содержащем 8-oxoG, но лишь минимально сказывается на активности в отношении FapyG, FapyA, Sp, Gh и АП-сайтов. В рамках текущей работы впервые было показано, что варианты Fpg *L. lactis* со случайными а.к.о. на месте тетрапептида ^{219}IRTY^{222} сохранили укладку глобулы, нано-молярное сродство к ДНК и механизм β/δ-элиминирования, но активность мутантных вариантов упала на 2–3 порядка на субстрате с целевым повреждением 8-oxoG. Другие окислительные повреждения (такие как АП-сайт и 5-гидроксиурацил), мутантные варианты расщепляли с соизмеримой эффективностью, что и дикий тип Fpg. Помимо этого, частота мутаций с мутантными вариантами в комплементационном тесте в штамме *E. coli* CC104 с делецией генов *fpg* и *mutY* не снижали частоту мутаций относительно делеционного штамма. На основании структурных данных можно предположить, что у Fpg несколько конформаций петли способны поддерживать катализ для разных субстратов, однако конформации, выгодные для удаления 8-oxoG, легче нарушаются мутациями в петле. Можно заключить, что узнавание 8-oxoG выглядит как позднее приобретение супер-семейства H2tH, расширяющее способность Nei-подобных ферментов работать с широким набором окисленных пиримидинов. С более практической точки зрения, эволюционную пластичность тетрапептидной петли у ферментов H2tH можно использовать для изменения их субстратной специфичности к другим повреждённым или синтетическим неприродным основаниям, создавая новые инструменты для биоаналитики и молекулярно-биологических методов.

Кристаллизация ковалентных конъюгатов Nei *E. coli* с ДНК, содержащей C, G или T напротив повреждения, позволила получить ответ на вопрос, почему фермент способен удалять окисленные основания из ДНК со схожей активностью с любым основанием напротив, а также была обнаружена уникальная особенность: пурины остаются в *анти*-конформации и удерживаются водородными связями с а.к.о. интеркалирующей триады, в то время как для пиримидинов не было обнаружено предсказанных взаимодействий из-за изменения конформации нуклеозида — пиримидиновые основания поворачиваются вокруг *N*-гликозидной связи в *син*-конформацию, изолируя Уотсон–Криковскую грань от взаимодействий с белком. При увеличении длины заместителя при C5 атоме в пиримидине константа специфичности падает в 4–7 раз, преимущественно за счёт K_M. Для ДНК-

гликозилаз такая особенность взаимодействия с комплементарным основанием напротив повреждения описана впервые.

Таким образом, представленная работа не только формирует целостную картину механизмов катализа ферментов суперсемейства «спираль–2 поворота–спираль», но и выстраивает несколько очевидных продолжений для дальнейшей работы, связанной как с изучением механизмов реакции других ДНК-связывающих белков, так и с применением полученных данных для изменения свойств ферментов для прикладных целей.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика на основе pH-чувствительной спиновой метки 2-(2-((2,5-диоксопирролидинокси)карбонил)фенил)-2,5,5-триметил-4-(пирролидино)-2,5-дигидро-1H-имидазол-1-оксила, позволяющая определять электростатический потенциал внутри активного центра фермента при физиологических значениях pH с помощью импульсного ЭПР. С её использованием показано, что замена остатка Glu2 на Gln в формамидопиримидин-ДНК-гликозилазе (Fpg) *Escherichia coli* смещает значение pK_a метки в основную сторону на 0,5±0,1 по шкале pH и приводит к изменению характера кривых титрования при pH 7,00–7,37, что отражает изменение электростатического потенциала активного центра при инактивирующей замене и подтверждает важность остатка Glu2 как акцептора протона в ходе реакции.

2. Варианты фермента Fpg *Lactococcus lactis* со случайной последовательностью петли 219–222, сохраняя общую стабильность белка, сродство к повреждённой ДНК и каталитический механизм, теряют способность расщеплять субстраты, содержащие 8-оксогуанин, но не альтернативные субстраты (апурин-апиримидиновый сайт или 5-гидроксиурацил), что указывает на ключевой вклад этой петли в узнавание окисленных пуринов в ДНК.

3. В кристаллических структурах ковалентных конъюгатов эндонуклеазы VIII (Nei) *E. coli* с ДНК, пуриновые нуклеотиды напротив повреждения сохраняют *анти*-конформацию и образуют водородную связь между атомом N3 и остатком Gln69 интеркалирующей петли, тогда как пиримидиновые нуклеотиды находятся в *син*-конформации и контактов с белком вообще не образуют. Существование такой структуры в фермент-субстратном комплексе в ходе реакции подтверждается снижением эффективности расщепления ДНК с ростом объёма заместителя при C5 пиримидинового нуклеотида напротив повреждения. Подобный способ адаптировать все канонические нуклеотиды в фермент-субстратном комплексе уникален для Nei и объясняет способность этого фермента узнавать широкий спектр окислительных повреждений напротив их естественных комплементарных партнеров.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В РАБОТАХ

1. Ovcherenko S. S.*, **Bulgakov N. A.***, Litvinov I. A., Shernyukov A. V., Kuznetsov D. A., Endutkin A. V., Zharkov T. D., Kupryushkin M. S., Kirilyuk I. A., Zharkov D. O., Bagryanskaya E. G. Probing electrostatics in a DNA repair enzyme with a pH-sensitive nitroxyl spin label // J. Phys. Chem. B. – 2026. – V. 130. – No. 13. – P. 3603–3616. DOI: 10.1021/acs.jpcb.5c07587

* — равный вклад

2. **Bulgakov N. A.**, Amanova M. M., Endutkin A. V., Makasheva K. A., Coste F., Castaing B., Golyshev V. M., Lomzov A. A., Yudkina A. V., Zharkov D. O. Randomization of the damaged base-capping loop rewires substrate specificity in formamidopyrimidine–DNA glycosylase // Biochemistry. – 2026. – V. 65 – DOI: 10.1021/acs.biochem.6c00579

3. **Bulgakov N. A.**, Endutkin A. V., MacCarthy C., Shevtsov M. B., Kapranov I. A., Yudkina A. V., Borshchevskiy V. I., Zharkov D. O. Unique structural mode for opposite-base tolerance in endonuclease VIII // DNA Repair. – 2026. – V. 167. – No. 103962. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2026.103962