

На правах рукописи

БУЛЫГИН АНАТОЛИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

**АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА СУБСТРАТНОЙ
СПЕЦИФИЧНОСТИ АПУРИНОВОЙ/АПИРИМИДИНОВОЙ
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ И РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН ФЕРМЕНТА С
ИЗМЕНЁННЫМИ СВОЙСТВАМИ**

1.5.4 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Научный руководитель:

Кузнецов Никита Александрович, д.х.н., чл.-корр. РАН,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО
РАН, заведующий лабораторией генетических технологий.

Официальные оппоненты:

Защита состоится « » _____ 20__ г. в ____:____.

На заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, проспект академика Лаврентьева, 8, Новосибирск.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н.

Пестряков П.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Различные экзогенные и эндогенные факторы вызывают множество повреждений ДНК, включая окисление, алкилирование, дезаминирование, апуринизацию и другие. За репарацию большей части необъёмных повреждений азотистых оснований и апуриновых/апиримидиновых (АП) сайтов в ДНК отвечает эксцизионная репарация оснований (ЭРО). В этом пути одну из ключевых ролей играют АП-эндонуклеазы. Их основной биологической функцией считается гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АП-сайта с образованием на 5'-конце 2'-дезоксирибозофосфатной (dRp) группы и 3'-ОН группы. Известно также, что эти ферменты, могут гидролизовать связи не только нуклеотидов, потерявших основание, но и ряд нуклеотидов с модифицированными азотистыми основаниями, включая 2'-деокси-5,6-дигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина (α A), 1,N6-этенаденозин (ϵ A) и 2'-деоксиуридин (dU) (инцизионная репарация оснований, ИРН).

На данный момент остаётся без ответа вопрос о механизмах узнавания конкретных нуклеотидов, выступающих в качестве субстратов, активным центром (АЦ) АП-эндонуклеазы. На данный момент не известно, на каком этапе происходит отсев «неподходящих» повреждений и на чём основан механизм субстратной специфичности данных ферментов. Ответы на озвученные вопросы помогут не только установить молекулярные основы узнавания повреждений АП-эндонуклеазой 1, но и дадут возможность лучше понять общие принципы узнавания специфических сайтов ДНК-процессирующими ферментами.

Целью данной работы было выяснение механизмов выворачивания и распознавания повреждённых нуклеотидов АП-эндонуклеазами, подобными АРЕ1 человека, и создание на основе полученных данных АП-эндонуклеазы с изменённой субстратной специфичностью.

Задачи настоящего исследования состояли в том, чтобы:

- для выявления аминокислотных остатков, взаимодействующих с повреждённым основанием, и определения их роли в механизме субстратной специфичности провести моделирование методом молекулярной динамики (МД) структур комплексов АРЕ1 человека и АРЕ1-подобных АП-эндонуклеаз *D. rerio*, *X. laevis* и *D. melanogaster* с ДНК-субстратами, содержащими повреждённые нуклеотиды: 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофуран (F-сайт), 2'-деокси-5,6-дигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина (α A), 1,N6-этенаденозин (ϵ A) и 2'-деоксиуридин (dU);
- для определения аминокислотных остатков, взаимодействующих с азотистым основанием повреждённого нуклеотида по пути его выворачивания из ДНК-дуплекса в активный центр и потенциально ответственных за субстратную специфичность фермента, исследовать методом МД выворачивание повреждённых нуклеотидов в активный центр АП-

эндонуклеазы zAPE1 из *D. rerio*;

- на основании данных компьютерного моделирования создать ряд мутантных форм фермента zAPE1 с изменённой субстратной специфичностью и проверить экспериментально активность полученных мутантных форм методами стационарной и предстационарной кинетики для определения степени влияния введённых замен на АП-эндонуклеазную и ИРН-активности.

Положения, выносимые на защиту

1) Субстратная специфичность APE1-подобных АП-эндонуклеаз человека, *Danio rerio*, *Xenopus laevis* и *Drosophila melanogaster* определяется положением и составом белковой петли, содержащей аминокислотные остатки с Asn229 по Thr233. Размещение повреждённых оснований в активном центре вызывает стерический конфликт с остатками этой петли, что приводит к её смещению.

2) Процесс выворачивания повреждённого нуклеотида из ДНК-дуплекса в активный центр APE1-подобных АП-эндонуклеаз сопровождается изменением положения петли, содержащей остатки с Val172 по Arg177. Конформационные перестройки данной петли облегчаются заменой Glu236Ala.

3) Мутантные формы zAPE1 из *Danio rerio* Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala имеют одинаковый кинетический механизм взаимодействия с ДНК, содержащей F-сайт, но значительно различаются по кинетике образования фермент-субстратных комплексов и эффективности расщепления ИРН-субстратов, содержащих 2'-дезоксид-5,6-дигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина (α A), 1,N6-этноаденозин (ϵ A) и 2'-дезоксисуридин (dU).

Научная новизна и практическая ценность работы. В представленной работе впервые было проведено детальное компьютерное моделирование комплексов АП-эндонуклеаз zAPE1, xAPE1 и Rrp1, с ДНК-субстратами, содержащими различные типы повреждений. Показано, что все исследованные hAPE1-подобные ферменты претерпевают однотипные конформационные перестройки в процессе размещения в своём активном центре нуклеотидов с повреждёнными основаниями.

Анализ данных моделирования позволил установить ряд ранее не изученных аминокислотных остатков, принимающих участие в процессе узнавания повреждённых азотистых оснований. На основе данных моделирования были созданы мутантные формы АП-эндонуклеазы zAPE1, обладающие изменённой субстратной специфичностью, в том числе повышенной эффективностью гидролитического расщепления ДНК, содержащей повреждённые азотистые основания.

Личный вклад автора. Все представленные в работе объекты исследования и результаты получены самим автором. Автор принимал активное участие в анализе полученных результатов и написании статей.

Публикации и апробация работы. По материалам работы опубликовано 4 научных статьи, 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 литературы. Работа изложена на 141 странице, содержит 56 рисунок, 2 схемы и 15 таблиц. Библиография включает 250 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В процессе ИРН APE1 гидролизует фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от некоторых повреждённых дезоксирибонуклеотидов с образованием на 3'-конце разрыва гидроксильной группы, на 5'-конце – фосфатной (рис. 1). На данный момент не было получено ни одной кристаллической структуры APE1 в комплексе с каким-либо ИРН-субстратом, поэтому попытки понять структурные особенности специфичности APE1 до сих пор заключались в моделировании комплексов с различными ИРН-субстратами в каталитически компетентном состоянии (Kuznetsova et al., 2018). Для углубления понимания процессов, происходящих при взаимодействии AP-эндонуклеаз с ДНК, в настоящей работе был применён метод направленной молекулярной динамики для моделирования траекторий выворачивания повреждённых нуклеотидов, позволяющий определить аминокислотные остатки, важные для более ранних стадий взаимодействия фермента с субстратом.

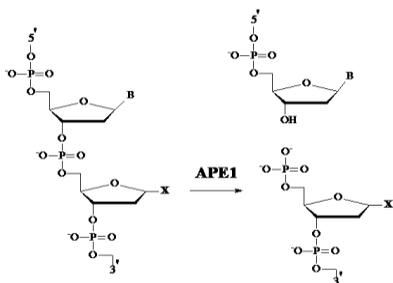


Рис. 1. Схема реакции, катализируемой APE1 в процессах ЭРО (X – OH) или ИРН (X – повреждённое основание).

1. Моделирование комплексов AP-эндонуклеаз с ДНК

На первом этапе работы были получены модели комплексов в каталитически компетентном состоянии четырёх APE1-подобных эндонуклеаз (hAPE1, zAPE1, xAPE1 и Rrp1) с ДНК, содержащими F-сайт в качестве ЭРО-субстрата и DHU, α A и ϵ A в качестве ИРН-субстратов. Полученные модели сравнивали с известными кристаллическими структурами ферментов и моделями их комплексов, полученных ранее (Kuznetsova et al., 2018).

Модели комплексов всех 4 исследованных AP-эндонуклеаз с ДНК, содержащей F-сайт, оказались практически одинаковыми во взаимном расположении F-сайта и аминокислотных остатков АЦ (рис. 2). Во всех случаях сохранились три важные водородные связи остатков АЦ, а именно Tyr171, Asn212 и His309, с фосфатной группой F-сайта, обнаруженные в

кристаллических структурах (здесь и далее приведённые номера аминокислотных остатков соответствуют hAPE1).

Модели комплексов с ДНК, содержащей DHU, также не имели значимых отличий друг от друга (рис. 3). Но при этом были выявлены значительные отклонения в структуре ферментов относительно комплексов с F-сайтом. Из водородных связей между фосфатом повреждённого нуклеотида и остатками АЦ сохранились только две - DHU O1P – Asn212 N^{δ2} и DHU O1P - Tyr171 O^η (рис. 3). Кроме того, сильно изменилось положение некоторых остатков, образующих границу кармана АЦ, а именно остатков с номерами от 229 до 233 (рис. 4): белковая петля, содержащая эти остатки, была «оттеснена» азотистым основанием повреждённого нуклеотида. При этом были разорваны две водородные связи внутри белка, предположительно важные для сохранения нужной вторичной структуры: Thr233 O^{γ1} – Glu236 O^{ε2} и Ala214 N – Gly231 O.

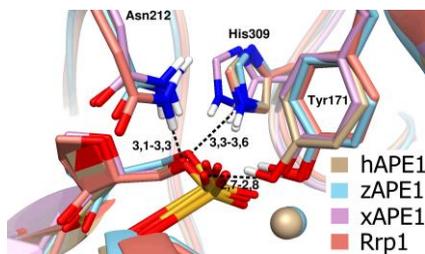


Рис. 2. Сравнение комплексов АП-эндонуклеаз с F-сайт-содержащей ДНК. Пунктирными линиями соединены пары атомов, образующие Н-связи. Рядом с пунктирами указаны числовые промежутки, в которых находятся средние значения расстояний между соответствующими атомами в Å.

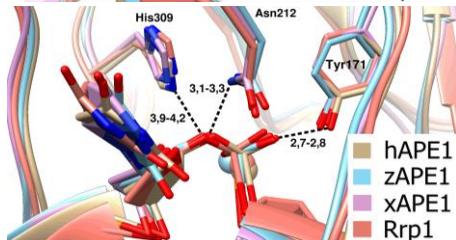


Рис. 3. Модели комплексов АП-эндонуклеаз с ДНК, содержащей DHU. Пара атомов His309 N^{δ2} – DHU O5' во всех комплексах разделена расстоянием больше 3,9 Å, что означает, отсутствие водородной связи между ними.

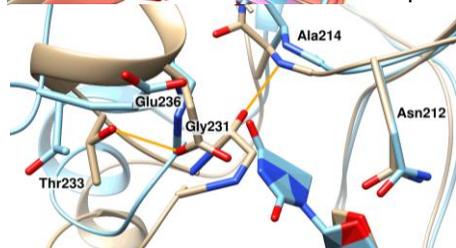


Рис. 4. Сравнение комплексов hAPE1-F-сайт (бежевый цвет) и hAPE1-DHU (голубой цвет) с видом на петлю, включающую остатки Asn229-Thr233. В комплексе с F-сайтом показаны Н-связи Thr233 O^{γ1} – Glu236 O^{ε2} и Ala214 N – Gly231 O, которые отсутствуют в комплексе с DHU.

Следует отметить, что эти связи в комплексе с F-сайтом во всех промоделированных МД-траекториях оставались неразрывными. Было выдвинуто предположение, что разрыв именно этих связей позволяет активному центру подстраиваться под более объёмное повреждение и достигать катали-

тически компетентного состояния. Полученные данные позволяют предположить, что подобные конформационные изменения могут наблюдаться для всех повреждёнными нуклеотидов, выступающих ИРН-субстратами.

Действительно, анализ комплексов ДНК, содержащей α A и ϵ A также выявил потерю водородных связей Thr233 – Glu236 и Ala214 – Gly231. При этом, среди комплексов с α A выделялся комплекс с Rrp1. В случаях с hAPE1, zAPE1 и xAPE1 в полученных моделях отсутствует Н-связь между Asn212 и повреждением, а также отсутствуют обе важные Н-связи в петле Asn229-Thr233 (рис. 5). В то же время в комплексе с Rrp1 отсутствовали сразу две связи между α A и каталитическими остатками: Asn212 N^{δ2} – α A O5' и His309 N^{ε2} – α A O5'. Контакты в петле Asn229-Thr233 наоборот не разрывались. Кроме того, заметно, что в комплексе с Rrp1 α A имеет положение, отличное от α A в остальных комплексах, а именно основание не «развёрнуто» в сторону Asn212, а остаток 2'-дезоксирибозы в меньшей степени погружен в АЦ.

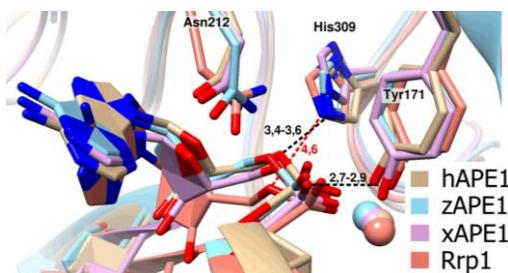


Рис. 5. Сравнение комплексов АП-эндонуклеаз с ДНК, содержащей α A. Во всех комплексах отсутствует связь Asn212 N^{δ2} – α A O5', в комплексе с Rrp1 дополнительно отсутствует связь His309 N^{ε2} – α A O5' (среднее расстояние между соответствующими атомами обозначено красным).

Чтобы понять причины различий в положениях α A в комплексе с Rrp1 и остальными АП-эндонуклеазами, был проведён анализ окружения повреждённого нуклеотида. Установлено, что со стороны белка основные отличия относились к конформации петли Asn222-Lys228. Если в случаях hAPE1, zAPE1 и xAPE1 во время моделирования петля Asn222-Lys228 имела нерегулярные взаимодействия с ДНК за счёт двух остатков аспарагина - Asn222 и Asn226, - то в комплексе с Rrp1 эти остатки не взаимодействовали с ДНК вовсе. При этом взаимодействие с ДНК осуществлял остаток Asn225. Примечательно, что в остальных белках на аналогичных местах находятся остатки с меньшими, чем у аспарагина, боковыми цепями: глицин – у hAPE1 и zAPE1, треонин – у xAPE1. Таким образом, возможно, именно увеличенный размер боковой цепи 225-го остатка не даёт петле Asn222-Lys228 нужным образом подстроиться под ДНК и образовать необходимые контакты с повреждённым нуклеотидом.

Среди комплексов с ДНК, содержащей ϵ A, уже не обнаружилось таких больших различий между структурами, как в случае с комплексами с α A-содержащей ДНК. Повреждённый нуклеотид ϵ A занимал примерно одинаковые положения в АЦ всех четырёх ферментов. При этом внутривеликовские связи Thr233 O¹ – Glu236 O^{ε2} и Ala214 N – Gly231 O разрывались во всех случаях.

Таким образом, на основе сравнения моделей комплексов четырёх APE1-подобных эндонуклеаз можно сделать заключение о том, что принятие каталитически компетентного положения нуклеотидами с повреждёнными основаниями требует разрыва двух внутрибелковых связей, придающих жёсткость вторичной структуры белковой глобулы, а именно происходит потеря контактов Thr233 O^{γ1} – Glu236 O^{ε2} и Ala(Ser)214 N – Gly231 O, стабилизирующих участок Asn229-Glu236, расположенный вблизи АЦ. После разрыва данных связей, петля Asn229-Thr233 способна отодвигаться от основания повреждённого нуклеотида, увеличивая объём кармана АЦ, без чего, по-видимому, повреждённое основание не может быть расположено в АЦ.

2. Моделирование траекторий выворачивания нуклеотидов в активный центр zAPE1

Для моделирования траекторий выворачивания нуклеотидов были выбраны два фермента: фермент дикого типа (ДТ) и zAPE1 Glu236Ala. Перед созданием комплексов с белками, ДНК-дуплексы, содержащие повреждённые нуклеотиды, были промоделированы в свободном состоянии. Затем для обоих белков были построены комплексы с ДНК-дуплексами.

В комплексах обоих ферментов с ДНК, содержащей F-сайт, повреждённый нуклеотид самостоятельно (без приложения дополнительных сил) в течение нескольких наносекунд переходил из внутриспирального положения в конечное состояние, соответствующее каталитическому фермент-субстратному комплексу. Таким образом, траектория выворачивания F-сайта содержит всего два относительно стабильных положения: начальное (внутри спирали ДНК) и конечное, каталитически компетентное (рис. 6).

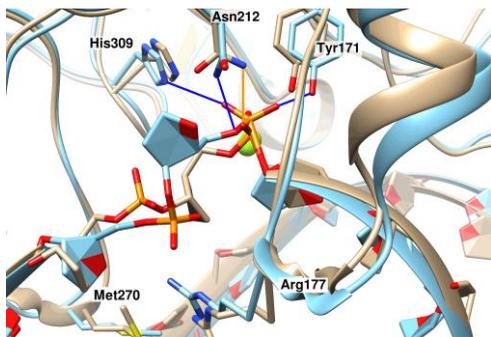


Рис. 6. Начальное (бежевое) и конечное (голубое) положения F-сайта в траектории выворачивания повреждения в активный центр ДТ zAPE1. Цветными линиями показаны образующиеся водородные связи между повреждением и ферментом.

В начальном состоянии фосфатная группа F-сайта имеет только одну водородную связь с ферментом – между O1P и Asn212 N^{δ2}. В конечном состоянии фосфатная группа формирует водородные связи с тремя остатками АЦ, а именно Tyr171, Asn212 и His309.

Следует отметить, что выворачивание из ДНК-дуплекса повреждённых нуклеотидов, содержащих азотистые основания, уже не происходило

самостоятельно, и запуск этого процесса требовал применения дополнительных сил. Выворачивание нуклеотида можно грубо представить как его вращение вокруг оси сахарофосфатного остова. Поэтому атомы N1 пиримидиновых и N9 пуриновых оснований были выбраны в качестве концов «рычагов», на которые и действовали силы. Выбор именно этих атомов позволяет получить «рычаг» наибольшей длины, при котором не происходит влияния на ориентацию азотистого основания при выворачивании. Вторые атомы в парах, к которым прикладывалась сила, выбирались по двум условиям. Во-первых, направление силы должно приблизительно совпадать с направлением, вдоль которого предположительно должно происходить движение нуклеотида. Во-вторых, угол между вектором силы и N-гликозидной связью должен быть как можно ближе к 90° для наибольшей эффективности силы. Так как среди атомов остатков АЦ не нашлось атомов, находящихся под достаточным углом к N-гликозидной связи, в начальном состоянии комплекса в начале моделирования траектории выворачивания прикладывали силу отталкивания между N1 (для DHU и dU) или N9 (для αA и εA) и N-гликозидным атомом азота противоположного азотистого основания. Затем в процессе выворачивания действовала сила притяжения между атомами N1/N9 и атомом C Asn212, который среди атомов АЦ является ближайшим атомом к N-гликозидным атомам азота повреждённого нуклеотида.

При выворачивании DHU в комплексах с обоими белками в начале траектории действовала сила отталкивания атомов противоположных оснований DHU N1 - dG N9, далее действовала сила притяжения между DHU N1 и Asn212 C (табл. 1). Траектория выворачивания DHU содержала помимо начального и конечного положений ещё два квазистабильных промежуточных положения, которые также были одинаковы для обоих ферментов (рис. 7).

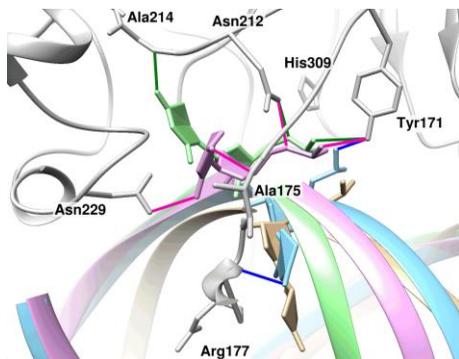


Рис. 7. Репрезентативные структуры, характеризующие процесс выворачивания повреждённого DHU-нуклеотида. Помимо начального и конечного положений, DHU проходит через два квазистабильных промежуточных положения. В этих положениях основание образует специфические контакты с остатками фермента: во втором положении – DHU O4 - Arg177 N (выделена синим), во третьем – DHU O2 - Asn229 Nδ2 и DHU O4 - Ala175 N (выделены розовым).

В начальном положении DHU не имеет водородных связей с ферментом, но при его выворачивании из двойной спирали такие контакты постепенно образуются (рис. 7): во втором положении формируется связь DHU O1P -

Tyr171 Oⁿ, во третьем – дополнительно формируется связь DHU O5' - Asn212 N^{δ2}. Кроме того, временно образовывались и другие, специфичные для промежуточных положений водородные связи: DHU O4 - Arg177 N, DHU O2 - Asn229 N^{δ2} и DHU O4 - Ala175 N (рис. 7).

Кроме постепенного образования связей с ферментом, закономерным образом сокращались и расстояния между атомами повреждённого нуклеотида и остатками АЦ. На графиках динамики расстояний (рис. 8, 9) в том числе представлена динамика расстояний между атомами DHU N1 и Asn212 C. Из графиков видно, что при переходах между положениями происходят довольно резкие скачки средних значений расстояний. При переходе из начального положения во второе (1→2) в первую очередь увеличивается расстояние между атомами DHU N1 и dG N9, между которыми действовала сила отталкивания, но при этом сокращается и расстояние DHU N1 - Asn212 C. При втором переходе большой скачок претерпевало расстояние между DHU N1 и Asn212 C. При переходе в конечное положение дополнительные силы не действовали ни в одном из комплексов (табл. 1), повреждённое основание самостоятельно «доворачивалось» в карман АЦ с одновременным перестроением распознающей петли и разрывом связи Gly231 C - Ala214 N.

Таблица 1. Величины дополнительных сил в комплексах с DHU (кДж/(моль•нм)), требуемые для индуцированного выворачивания нуклеотида

Переход	zAPE1	zAPE1 Glu236Ala	Тип силы
1→2		8	Отталкивание DHU N1 и dG N9
2→3		3	Притяжение DHU N1 и Asn212 C
3→4		0	-

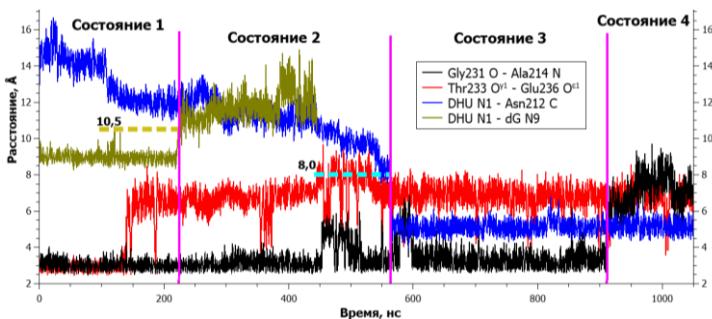


Рис. 8. Динамика расстояний между атомами, участвующими в Н-связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 C - Ala214 N, Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε2}), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (DHU N1 - dG N9, DHU N1 - Asn212 C), при выворачивании DHU в комплексе с ферментом ДТ. Вертикальными линиями (здесь и далее) показаны моменты переходов между квазистабильными положениями. Пунктирными линиями обозначено действие сил: высота соответствует расстоянию, до которого действовала сила, а левая и правая границы задают временной промежуток действия.

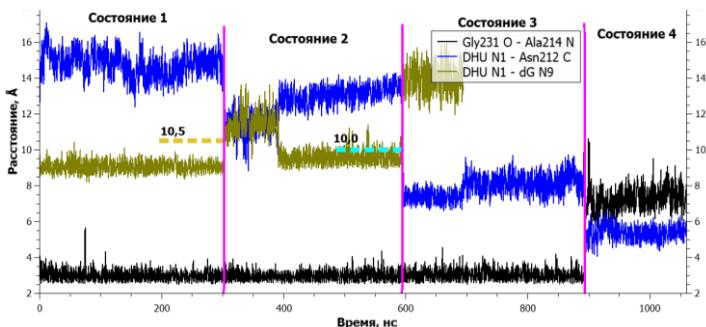


Рис. 9. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в Н-связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 C - Ala214 N, Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε2}), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (DHU N1 - dG N9, DHU N1 - Asn212 C), при выворачивании DHU в комплексе с ферментом Glu236Ala.

При выворачивании повреждённого нуклеотида, содержащего урацил, в АЦ фермента ДТ оказалось, что аналогичных дополнительных сил недостаточно для перехода основания из второго положения (рис. 10, голубая структура) в третье (рис. 10, розовая структура). Препятствием на пути выворачивания урацила выступала белковая петля с остатками Val172-Arg177, которую основание не могло "пройти" ни при какой притягивающей в АЦ силе. Следует отметить, что второе и третье состояния dU при выворачивании похожи на соответствующие состояния DHU. В случае DHU также происходит движение основания мимо петли Val172-Arg177 в районе Ser176. При этом аналогичный переход DHU происходил при действии единственной силы притяжения к Asn212 C.

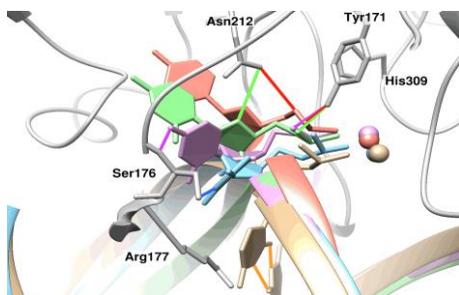


Рис. 10. Репрезентативные структуры, характеризующие процесс выворачивания повреждённого нуклеотида, содержащего dU. Помимо начального (бежевого) и конечного (красного) состояний показаны три квазистабильных промежуточных положения нуклеотида – второе (голубое), третье (розовое) и четвёртое (зелёное).

Сравнение структуры с урацилом во втором положении со структурами всех повреждений в конечных положениях, полученных ранее, выявило, что в модели промежуточного комплекса с урацилом белковые петли Val172-Arg177 и Asn229-Gly231 располагаются намного ближе друг к другу нежели в остальных моделях. Можно предположить, что для дальнейшего выворачивания

вания основания необходимо увеличение расстояния между этими петлями. В связи с этим для начала перехода 2→3 одновременно с притяжением dU N1 и Asn212 С была применена дополнительная сила отталкивания двух белковых петель (рис. 11). Данная сила была приложена к атомам Ala230 C^α и Ser176 N, расположенным в самом центре механического контакта петель. Сила отталкивания действовала до тех пор, пока расстояние между указанными атомами не увеличивалось хотя бы на 1 Å, при этом была подобрана сила минимальной величины, достаточной для отталкивания на такое расстояние.

После раздвигания петель с помощью дополнительной силы величиной 7,5 кДж/(моль•нм) в комплексе с zAPE1 ДТ происходил переход dU в третье положение. В последующих двух переходах до конечного положения применение дополнительных сил отталкивания двух белковых петель и действие притягивающей силы между атомами dU N1 и Asn212 С уже не требовалось.

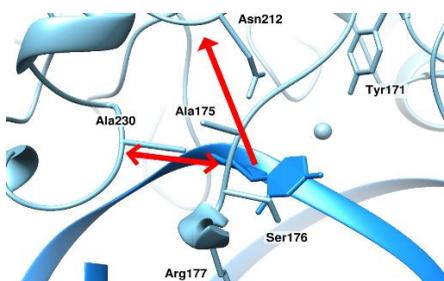


Рис. 11. При выворачивании dU, αA и εA в определённых положениях применялись одновременно две дополнительные силы – сила притяжения основания к активному центру (атомы dU N1 и Asn212 С, вертикальная стрелка) и сила отталкивания двух белковых петель (атомы Ala230 C^α и Ser176 N, горизонтальная двусторонняя стрелка).

Таблица 2. Величины дополнительных сил (кДж/(моль•нм)) в комплексах с dU, требующиеся для индуцированного выворачивания нуклеотида. Силы притяжения в активном центре одинаковы, отличаются только силы отталкивания белковых петель

Переход	zAPE1	zAPE1 Glu236Ala	Тип силы
1→2		14	Отталкивание dU N1 и dG N9
2→3		4	Притяжение dU N1 и Asn212 С
	7,5	5	Отталкивание Ala230 C ^α и Ser176 N
3→4		0	-
4→5		0	-

При моделировании выворачивания dU в комплексе с zAPE1 Glu236Ala выяснилось, что урацил проходит через те же квазистабильные промежуточные состояния, что и в комплексе с ферментом ДТ. То есть траектории выворачивания dU, как и DHU, для двух форм фермента одинаковы. В комплексе с zAPE1 Glu236Ala также требовалось применить вторую дополнительную силу – силу отталкивания петель Val172-Arg177 и Asn229-Gly231. Но величина этой силы оказалась заметно меньше – две белковые петли в мутантной форме Glu236Ala начинали отдаляться друг от друга уже при силе 5 кДж/(моль•нм) в отличие от фермента ДТ, где была

необходима сила минимум 7,5 кДж/(моль•нм) (табл. 2). Примечательно, что в обоих ферментах после перехода в третье состояние, то есть после "перехода" основания через белковую петлю Val172-Arg177, уже не требовалось действие дополнительных сил для дальнейшего выворачивания. Водородная связь Gly231 C - Ala214 N, как и в случае с DHU, разрывается при переходе в конечное положение в обоих ферментах.

Выворачивание αA у обоих ферментов проходило через три промежуточных состояния (рис. 12). Так же, как и в случае с dU, для одного из переходов, а именно для перехода в четвёртое состояние, требовалось применять силу отталкивания белковых петель. Причём оказалось, что величины этих сил равны величинам сил для случая с dU, и для мутантной формы требуется в полтора раза меньшая сила (табл. 3).

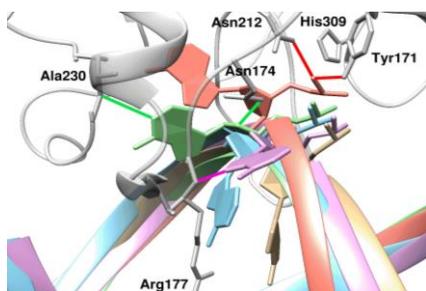


Рис. 12. Репрезентативные структуры, характеризующие процесс выворачивания повреждённого нуклеотида, содержащего αA . Показано три квазистабильных промежуточных положения нуклеотида (голубое, розовое, зелёное).

Таблица 3. Величины дополнительных сил (кДж/(моль•нм)) в комплексах с αA , требовавшихся для переходов нуклеотида из одного положения в следующее при выворачивании

Переход	zAPE1	zAPE1 Glu236Ala	Тип силы
1→2	10		Отталкивание αA N9 и dG N9
2→3	1,5		Притяжение αA N9 и Asn212 C
3→4	5	4	Притяжение αA N9 и Asn212 C
	7,5	5	Отталкивание Ala230 C $^{\alpha}$ и Ser176 N
4→5	6		Притяжение αA N9 и Asn212 C

Следует отметить, что конечное положение основания αA при моделировании полной траектории не совпало с положением основания, полученном при моделировании ранее (рис. 5, 12). В моделях комплексов, описанных в предыдущем разделе, основание аденина было повернуто пятичленным циклом в сторону АЦ. Такое положение задавалось изначально, на основе результатов работы (Kuznetsova et al., 2018). При этом во время моделирования комплексов в каталитически компетентном состоянии основание αA в итоге располагалась под углом около 70-80° к плоскостям оснований, находящихся полностью внутри спирали ДНК. В то же время при моделировании траектории выворачивания в четвёртом положении основание полностью разворачивается

в АЦ своим шестичленным циклом и так держится до конца моделирования. Таким образом, положение повреждённого нуклеотида в моделях структур с α A, полученных ранее, можно понимать как результат незавершённого перестроения повреждения в сторону оптимального положения. Водородная связь Gly231 C - Ala214 N в ферменте ДТ разрывается только после перехода в конечное положение, в то время как в ферменте zAPE1 Glu236Ala она теряет стабильность уже при переходе в четвёртое положение.

Основание ϵ A при выворачивании проходило лишь через два квазистабильных промежуточных состояния в комплексах обоих ферментов. Неожиданно оказалось, что при выворачивании данного нуклеотида в обоих комплексах не требуется применение дополнительной силы, расталкивающей белковые петли на пути основания (табл. 4). Это связано с тем, что ϵ A изначально располагается с нужной стороны от белковой петли Val172-Arg177 и по всей видимости способствует её отдалению от петли Asn229-Gly231. Проанализировав структуру комплекса с ϵ A в начальном положении, стало понятным, что ϵ A имеет настолько объёмное основание, что вынуждает боковую цепь Arg177, находящуюся изначально напротив него, сместиться в 5'-сторону ещё при моделировании комплекса в начальном положении.

Таблица 4. Величины дополнительных сил (кДж/(моль•нм)) в комплексах с ϵ A, требовавшихся для переходов нуклеотида между положениями при выворачивании

Переход	zAPE1	zAPE1 Glu236Ala	Тип силы
0→1		7	Отталкивание ϵ A N9 и dG N9
1→2		4	Притяжение ϵ A N9 и Asn212 C
2→3		5	Притяжение ϵ A N9 и Asn212 C

Таким образом, анализ полученных траекторий выворачивания повреждённых нуклеотидов раскрывает дополнительные особенности молекулярных взаимодействий, лежащих в основе субстратной специфичности APE1-подобных эндонуклеаз. Распознавание нуклеотидов происходит не только за счёт взаимодействия оснований с "распознающей" петлёй Asn229-Thr233, но и за счёт взаимодействия с петлёй Val172-Arg177, располагающейся первой на пути выворачивания нуклеотида. Петля Val172-Arg177 также, как и петля Asn229-Thr233, должна претерпевать конформационные перестройки для того, чтобы мимо неё могло пройти основание. В эти перестройки входит отдаление от петли Asn229-Thr233, которое, судя по моделированию, происходит легче у Glu236Ala, так как в случае мутантной формы отсутствие боковой цепи и соответствующих контактов с окружающими структурами Ala236 повышает гибкость петли Asn229-Thr233, а также повышает доступность гидрофобного пространства между петлями для молекул воды, которые могут способствовать увеличению подвижности данных петель.

После получения результатов моделирования было решено получить три мутантные формы APE1 для экспериментальной проверки их свойств.

Главным принципом выбора аминокислотных остатков для замены было увеличение гибкости и подвижности петли Asn229-Thr233, что в свою очередь должно увеличить эффективность ИРН-активности. Согласно этому принципу были выбраны замены Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala, а ферментом, в который будут вводиться данные замены, была выбрана APE1 из *D. rerio*.

3. Экспериментальная проверка АП-эндонуклеазной и ИРН-активностей zAPE1 и её мутантных форм

Фермент zAPE1 ДТ и его мутантные формы, содержащие замены Asn229Gly, Ala230Gly или Glu236Ala были получены в виде рекомбинантных очищенных белковых препаратов. В качестве субстратов использовали 17-звенные ДНК-дуплексы, содержащие повреждённые нуклеотиды на 6 месте от начала цепи с FAM-меткой. Сравнение эффективности расщепления ДНК, содержащей F-сайт (F-субстрат), проводили в следующих условиях реакции: [E] = 0,04 мкМ, температура реакционной смеси = 26°C, время реакции – от 10 до 600 с. Продукты гидролиза ДНК-субстрата анализировали с помощью разделения методом ПААГ-электрофореза. Кинетические кривые накопления продукта реакции в зависимости от времени аппроксимировали функцией (1).

$$F(t) = A_1(1 - e^{-kt}) + k_{lin}t \quad (1),$$

где A_1 – амплитуда экспоненциального роста (%), k_{lin} – скорость линейного роста (%/с), k – наблюдаемая константа скорости быстрой фазы (с⁻¹).

Полученные данные (рис. 13) свидетельствуют о том, что наибольшей скоростью расщепления F-субстрата обладает zAPE1 Asn229Gly. Значение $k_{набл}$ для zAPE1 Asn229Gly в полтора раза превышало константу скорости у ДТ (0,09 с⁻¹ и 0,06 с⁻¹, соответственно). Мутантные формы zAPE1, содержащие Ala230Gly и Glu236Ala, оказались, наоборот, заметно медленнее, наблюдаемые константы равны 0,04 с⁻¹ и 0,03 с⁻¹, соответственно.

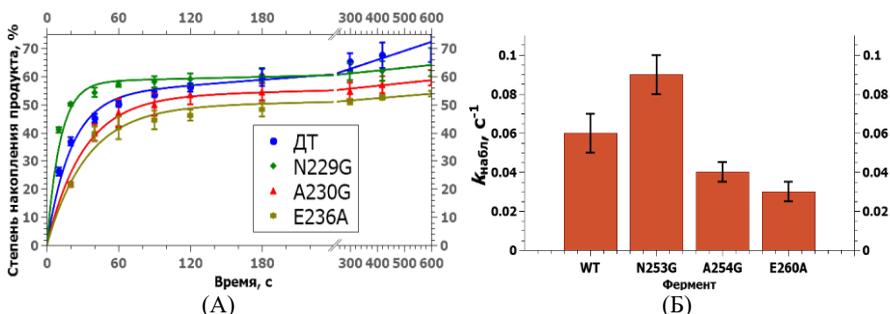


Рис. 13. ПААГ-анализ накопления продуктов гидролиза F-субстрата ферментом zAPE1 ДТ и его мутантными формами. (А) Кривые накопления и (Б) наблюдаемые константы скорости (среднее \pm CO, с⁻¹), рассчитанные при анализе кинетических кривых с помощью ур. (1).

Следует отметить, что фермент ДТ имел максимальную степень расщепления субстрата: за 10 мин ДТ способен расщеплять в среднем до $70 \pm 5\%$ F-субстрата (рис. 13), в то время как Asn229Gly около $65 \pm 3\%$, а средние максимумы долей расщеплённого продукта для Ala230Gly и Glu236Ala составляли $60 \pm 3\%$ и $55 \pm 1\%$, соответственно.

Для более детального изучения кинетики взаимодействия между ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, и ферментами zAPE1 с помощью спектрофотометра остановленного потока регистрировали изменение интенсивности флуоресценции красителя FAM в составе FRET-пары с тушителем флуоресценции BHQ1, расположенными на концах ДНК-субстрата. Увеличение и уменьшение интенсивности флуоресценции FAM во времени свидетельствует о, соответственно, увеличении и уменьшении расстояния между флуорофором FAM и тушителем BHQ1, которое происходит из-за конформационных перестроек ДНК-дуплекса, происходящим при образовании фермент-субстратного комплекса и последующей стадии каталитического гидролиза ДНК.

Полученные флуоресцентные кинетические кривые аппроксимировали экспоненциальной функцией:

$$F(t) = \sum_n A_n e^{-k_n t} \quad (2),$$

где A_n – амплитуды n-ой фазы (отн. ед.), k_n – наблюдаемые константы скорости n-ой фазы (s^{-1}). Для каждой кривой использовали минимальное число (n) экспонент, при котором теоретические кривые не отклонялись от экспериментальных кривых больше, чем на величину шума.

На первом этапе работы была определена относительная активность фермента zAPE1 ДТ и его мутантных форм, содержащих замены Asn229Gly, Ala230Gly или Glu236Ala, в одинаковых экспериментальных условиях ($[E] = 2.0$ мкМ, $[F\text{-субстрат}] = 1.0$ мкМ). Все полученные кривые изменения интенсивности флуоресценции имели близкий вид и включали одну фазу быстрого роста, соответствующую накоплению продукта (рис. 14).

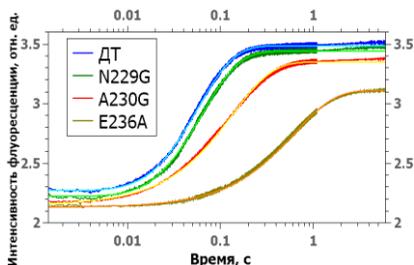


Рис. 14. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции FAM при взаимодействии вариантов zAPE1 ($[E] = 2.0$ мкМ) с F-субстратом ($[S] = 1.0$ мкМ), аппроксимированные ур. (2).

Кривые для ДТ и Asn229Gly были аппроксимированы функциями с двумя экспоненциальными членами, причём одночлены каждой функции, имеющие наибольшие $k_{\text{набл}}$, имели отрицательную амплитуду (табл. 5). Кривые,

соответствующие Ala230Gly и Glu236Ala, могли быть описаны одноэкспоненциальным уравнением с положительной амплитудой. При этом варианты ДТ и Asn229Gly обладали наибольшими и примерно одинаковыми константами скорости (20 с^{-1} и $17,4 \text{ с}^{-1}$, соответственно), соответствующими растущим экспонентам, по сравнению с Ala230Gly и Glu236Ala ($7,5 \text{ с}^{-1}$ и $1,6 \text{ с}^{-1}$, соответственно) (табл. 5).

Таблица 5. Наблюдаемые константы скорости (с^{-1}), характеризующие взаимодействие вариантов zAPE1 с F-субстратом*

	ДТ	Asn229Gly	Ala230Gly	Glu236Ala
k_1	91	85	-	-
A1	-0,42	-0,39	-	-
k_2	20	17,4	7,5	1,6
A2	1,63	1,6	1,2	1

*Ошибка констант скорости не превышала 10% от значения

Можно предположить, что двухфазный вид кинетических кривых в случае фермента ДТ и Asn229Gly, требующий аппроксимации двумя экспоненциальными членами, связан с последовательными процессами образования фермент-субстратного комплекса, сопровождающегося изгибанием ДНК-дуплекса и сближением флуорофора и тушителя, и последующей каталитической реакцией, сопровождающейся диссоциацией комплекса фермент-продукт и существенным ростом сигнала. При этом следует отметить, что изменения FRET-сигнала при формировании фермент-субстратного комплекса имеют небольшую амплитуду. В связи с этим даже незначительное ухудшение эффективности связывания фермента и ДНК в случае мутантных форм Ala230Gly и Glu236Ala не позволило рассчитать параметры этого процесса вследствие «потери» данной фазы на кинетических кривых.

Для определения вклада изменения эффективности связывания с ДНК в изменение эффективности протекания АП-эндонуклеазной реакции в случае мутантных форм относительно ДТ было выполнено определение констант диссоциации фермент-субстратных комплексов методом микроскопического термофореза (МСТ). Константы диссоциации для ДТ, Asn229Gly и Ala230Gly оказались равны в пределах ошибки, их средние значения лежат в промежутке от 0,3 до 0,5 мкМ. Среднее значение K_d Glu236Ala оказалось в 3-4 раза выше значений остальных ферментов (1,4 мкМ, табл. 6). Следует отметить, что полученные константы диссоциации располагались в порядке, обратном порядку наблюдаемых констант скорости k_2 (табл. 5).

Таблица 6. Константы диссоциации фермент-субстратных комплексов, полученные методом МСТ

Фермент	ДТ	N229G	A230G	E236A
K_d , мкМ	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,3$

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что ошибки в вычислении констант диссоциации не позволяют с достаточной точностью определить относительное влияние замен Asn229Gly и Ala230Gly на стадию связывания фермента. Тем не менее, в случае Glu236Ala можно утверждать, что эта замена в значительно ухудшает эффективность образования фермент-субстратного комплекса, влияя на процессы достижения каталитически компетентного состояния.

Для дополнительного определения роли отобранных аминокислотных остатков на отдельных стадиях взаимодействия с повреждением методом остановленного потока зарегистрированы конформационные изменения F-субстрата в процессе взаимодействия с ферментами zAPE1 Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala. Для этого были получены серии кинетических кривых с использованием FRET-пары красителей в составе F-субстрата (рис. 15).

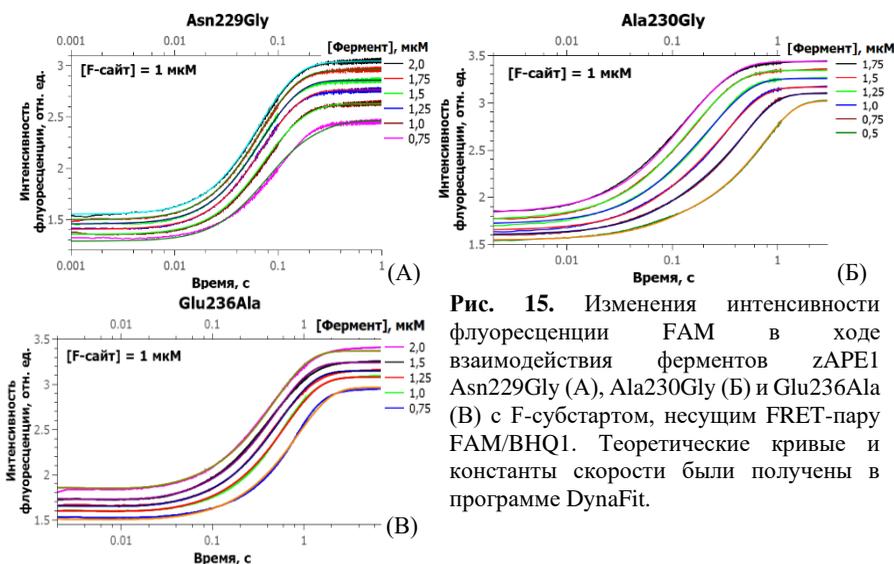


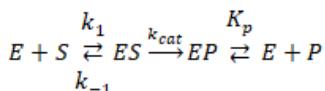
Рис. 15. Изменения интенсивности флуоресценции FAM в ходе взаимодействия ферментов zAPE1 Asn229Gly (A), Ala230Gly (B) и Glu236Ala (B) с F-субстратом, несущим FRET-пару FAM/BHQ1. Теоретические кривые и константы скорости были получены в программе DynaFit.

Схема с минимальным количеством стадий, описывающая кинетические кривые, включала 3 стадии (схема 1): обратимую стадию связывания фермента и субстрата, необратимую каталитическую стадию и обратимую стадию диссоциации комплекса фермент-продукт. Теоретические кривые, полученные в соответствии со схемой 1, были построены в программе DynaFit что позволило рассчитать соответствующие константы скорости (рис. 15, табл. 7).

При построении теоретических кривых величины K_a , соответствующие первой стадии, были заданы на основе результатов МСТ. Помимо K_a значительные отличия наблюдались и для констант двух других стадий.

Каталитические константы k_{cat} расположились в том же порядке, что и наблюдаемые константы скоростей, вычисленные по результатам ПААГ-анализа. Наибольшей k_{cat} обладал вариант zAPE1 Asn229Gly – $13 \pm 2 \text{ с}^{-1}$. У Ala230Gly k_{cat} была в полтора раза ниже – $8 \pm 1 \text{ с}^{-1}$, а у Glu236Ala ещё в два раза ниже – $4,0 \pm 0,5 \text{ с}^{-1}$.

Схема 1. Кинетическая схема взаимодействия исследуемых вариантов zAPE1 с F-субстратом



E – фермент, S – ДНК-субстрат, ES – фермент-субстратный комплекс, EP – комплекс фермента с продуктом, P – продукт реакции

Таблица 7. Вычисленные константы скорости, соответствующие схеме 1

Константа	N229G	A230G	E236A
$k_1, \text{мкМ} \cdot \text{с}^{-1}$	29 ± 2	24 ± 3	11 ± 2
$k_{-1}, \text{с}^{-1}$	12 ± 2	12 ± 2	13 ± 4
$K_a, \text{мкМ}^{-1}$	$2,5 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,2$
$k_{cat}, \text{с}^{-1}$	13 ± 2	8 ± 1	$4,0 \pm 0,5$
$K_p, \text{мкМ}$	4 ± 1	7 ± 1	10 ± 2

Для DHU-субстрата, как и для F-субстрата, было решено провести анализ кинетики накопления продуктов реакции с помощью их разделения методом ПААГ-электрофореза (рис. 16). При отношении концентраций $[E]/[S] = 0,2/1 \text{ мкМ}$ самым эффективным вариантом оказался ДТ ($k_{набл} = 0,015 \text{ с}^{-1}$), в то время как все мутантные формы были в 1,5-2 раза медленнее.

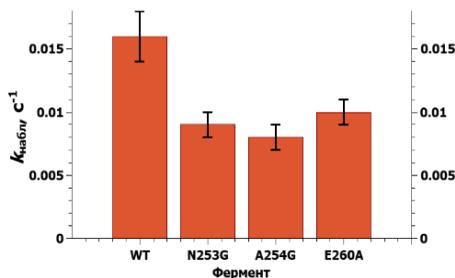


Рис. 16. Наблюдаемые константы скорости (среднее \pm СО, с^{-1}), полученные при ПААГ-анализе накопления продуктов расщепления DHU-субстрата.

Для сравнительного анализа ИРН-активности фермента zAPE1 ДТ и его мутантных форм, содержащие замены Asn229Gly, Ala230Gly или Glu236Ala, со всеми исследуемыми ИРН-субстратами, содержащими DHU, dU, α A или ϵ A в одной временной точке были выбраны условия, представленные в табл. 9.

Таблица 9. Условия реакций для проверки активности мутантных форм zAPE1 методом ПААГ-электрофореза

Повреждение	[E]	Температура	Время реакции, мин
DHU			0,67
dU	2 мкМ	37°C	10
α A			60
ϵ A			30

Показано (рис. 17, 18), что zAPE1 Glu236Ala оказался единственным вариантом, способным эффективно расщеплять ДНК, содержащую ϵ A. Доля расщеплённого субстрата за 30 мин составляла около 64% (рис. 18). ДНК, содержащую α A, в минимально заметных количествах за отведённое время в 60 мин могли расщеплять ферменты ДТ и Asn229Gly (~ 2%), при этом эффективность zAPE1 Glu236Ala была заметно выше и составляла ~ 17%. Кроме того, вариант zAPE1 Glu236Ala также хорошо расщеплял ещё один сложный для ДТ ДНК-субстрат, содержащий dU, с максимальной степенью расщепления ~50% за 10 мин. Следует также отметить, что zAPE1 Ala230Gly не проявлял активности на ИРН-субстратах, содержащих α A и ϵ A, но оказался способным более эффективно расщеплять dU-субстрата по сравнению с ферментом ДТ, тогда как замена Asn229Gly не изменяла способность гидролизовать dU-субстрат.

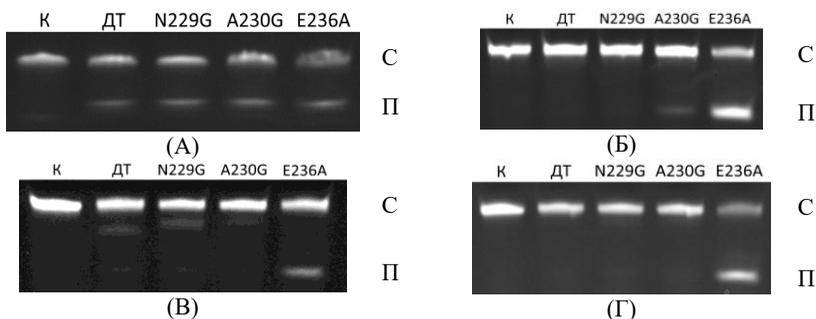


Рис. 17. ПААГ-анализ накопления продукта ферментами zAPE1 для субстратов DNHU (A), dU (Б), α A- (В) и ϵ A (Г). К – контроль (без фермента).

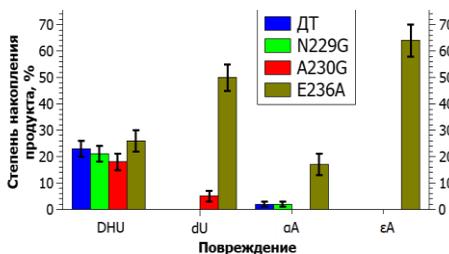


Рис. 18. Эффективность расщепления ИРН-субстратов zAPE1 ДТ и его мутантными формами, содержащими замены Asn229Gly, Ala230Gly или Glu236Ala. [Фермент] = 2,0 мкМ, [ДНК] = 1,0 мкМ.

На следующем этапе работ были проведены исследования конформационных изменений неповреждённой ДНК и ИРН-субстратов в процессе взаимодействия с zAPE1 ДТ и его мутантными формами, содержащими замены Asn229Gly, Ala230Gly или Glu236Ala. Полученные кинетические кривые (рис. 19) свидетельствуют о том, что кинетические механизмы взаимодействия ферментов с данными субстратами значительно различаются и зависят как от природы повреждённого нуклеотида в субстрате, так и от варианта исследуемого фермента. Следует отметить, что детальный анализ кинетических кривых с целью интерпретации зарегистрированных изменений интенсивности флуоресценции и подтверждение молекулярных перестроек в процессе образования каталитического комплекса требует более глубоких исследований.

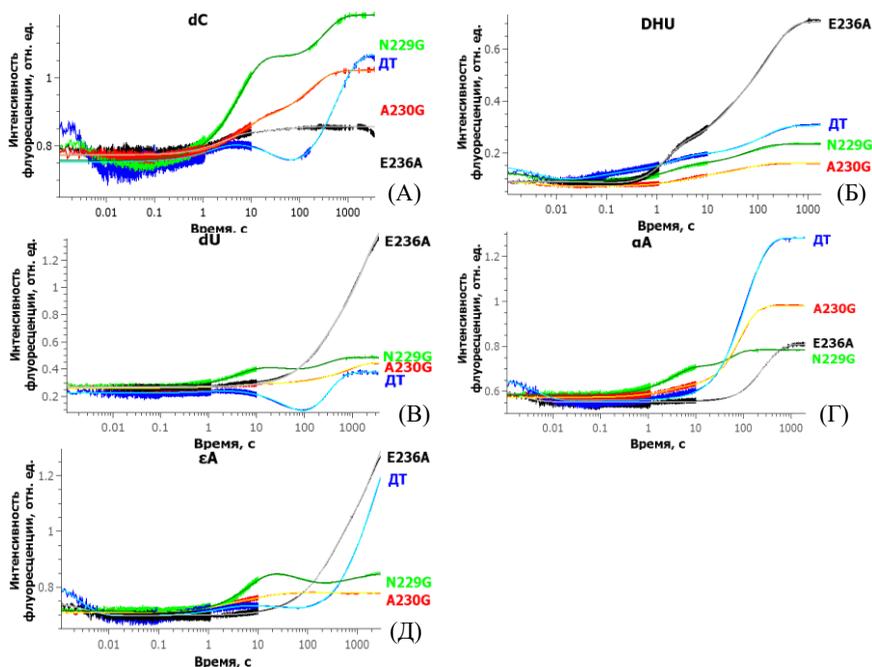


Рис. 19. Изменения интенсивности FRET-сигнала в ходе взаимодействия четырёх ферментов zAPE1 с неповреждённой ДНК (А) и ДНК-субстратами, содержащими DNU (Б), dU (В), αА (Г), εА (Д). [Фермент] = 2,0 мкМ, [ДНК] = 1,0 мкМ.

Тем не менее при сравнении полученных данных (рис. 19) видно, что на большинстве кинетических кривых и, в частности, на всех кривых, характеризующих взаимодействие фермента ДТ и мутантной формы Asn229Gly с ДНК, зарегистрирована относительно чёткая фаза падения или значительного замедления роста интенсивности флуоресценции в области ~ 10-100 с. Можно

предположить, что эта фаза и, соответственно, момент времени, соответствуют перестройке белковых петель Val172-Arg177 и Asn229-Thr233 и их отдалению, что обеспечивает прохождение повреждённого азотистого основания между ними. При этом для мутантных форм Ala230Gly и Glu236Ala не наблюдается соответствующей фазы падения и/или замедления роста интенсивности флуоресценции в силу большей гибкости "распознающих" петель, дестабилизированных введёнными аминокислотными заменами.

В целом, можно заключить, что проведённый анализ конформационных изменений ДНК, содержащих повреждённые азотистые основания, выявил сложные перестройки ДНК при образовании фермент-субстратного комплекса и его трансформации в каталитически активное состояние. По-видимому, отличия конформационных перестроек в ДНК и их эффективность связаны с комплексными поэтапными этапами формирования каталитического комплекса, сопряжёнными с процессом выворачивания повреждённого нуклеотида из ДНК-дуплекса и его перемещения в активный центр фермента.

ВЫВОДЫ

1) Методом молекулярной динамики показано, что размещение повреждённых оснований модельных олигонуклеотидных ДНК-субстратов инцизионной репарации нуклеотидов в активном центре APE1-подобных АП-эндонуклеаз (hAPE1, zAPE1 из *D. rerio*, xAPE1 из *X. laevis* и Rrp1 из *D. melanogaster*) сопровождается стерическим конфликтом основания с остатком Gly231, ведущим к разрыву водородных связей между Gly231 и Ala214 и между Thr233 и Glu236 и смещением «распознающей» белковой петли, содержащей аминокислотные остатки с Asn229 по Thr233.

2) Впервые показано, что выворачивание повреждённых нуклеотидов исследованными APE1-подобными АП-эндонуклеазами сопровождается изменением положения петли Val172-Arg177 и потерей её контактов с петлёй Asn229-Thr233. Установлено, что эти конформационные перестройки облегчаются заменой Glu236Ala, которая приводит к повышению эффективности выворачивания повреждённого нуклеотида в активный центр.

3) Созданы мутантные формы Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala фермента zAPE1 из *D. rerio*, обладающие изменённой субстратной специфичностью по сравнению с ферментом дикого типа. Методом остановленного потока установлено, что данные замены не оказывают влияния на кинетический механизм взаимодействия zAPE1 с ДНК, содержащей F-сайт, при этом замена Ala230Gly приводит к увеличению эффективности расщепления ДНК, содержащей dU, а замена Glu236Ala увеличивает активность фермента на ИРН-субстратах, содержащих dU, αA и εA.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Bulygin A.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The Role of Active-Site Plasticity in Damaged-Nucleotide Recognition by Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease APE1 // *Molecules*. - 2020. - Vol. 25. - № 17. - P. 3940.
2. Bulygin A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Insights into Mechanisms of Damage Recognition and Catalysis by APE1-like Enzymes // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2022. - Vol. 23. - № 8. - P. 4361.
3. Bulygin A.A., Syryamina V.N., Kuznetsova A.A., Novopashina D.S., Dzuba S.A., Kuznetsov N.A. Inner Amino Acid Contacts Are Key Factors of Multistage Structural Rearrangements of DNA and Affect Substrate Specificity of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease APE1 // *IJMS*. - 2023. - Vol. 24. - № 14. - P. 11474.
4. Bulygin A.A., Kuznetsov N.A. The Trajectory of Damaged-Base Eversion into the Active Site of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease APE1 Regulates This Enzyme's Substrate Specificity // *IJMS*. - 2024. - Vol. 25. - № 22. - P. 12287.