

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

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

**Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
чл.-корр. РАН, д.х.н. Кузнецов Н. А.**

Новосибирск – 2026

Оглавление

| | |
|---|----|
| Введение..... | 4 |
| Список сокращений..... | 8 |
| 1. Рациональный дизайн ферментов с изменёнными свойствами (Обзор литературы)..... | 9 |
| 1.1. Экспериментальные методы создания ферментов с новыми свойствами | 9 |
| 1.2. Теоретические методы предсказания новых свойств ферментов | 11 |
| 1.2.1. Предсказание структуры | 12 |
| 1.2.2. Применение квантовой теории в моделировании..... | 13 |
| 1.2.3. Направленная эволюция с применением компьютерных методов..... | 13 |
| 1.3. Метод молекулярной динамики (МД)..... | 14 |
| 1.3.1. Теоретические основы метода МД..... | 15 |
| 1.3.2. Процесс МД-моделирования..... | 17 |
| 1.3.3. Направленная молекулярная динамика..... | 21 |
| 1.3.4. Методы направленной МД..... | 23 |
| 1.4. Ферменты эксцизионной репарации оснований ДНК как перспективные объекты для направленного дизайна | 25 |
| 1.4.1. Эукариотические ДНК-гликозилазы | 28 |
| 1.4.2. Апуриновые/апиримидиновые эндонуклеазы..... | 29 |
| 1.4.3. ДНК-полимеразы..... | 29 |
| 1.4.4. ДНК-лигазы | 30 |
| 1.4.5. Кофакторные белки..... | 30 |
| 1.4.6. Эксцизионная репарация оснований и заболевания..... | 31 |
| 1.5. Инженерия ферментов репарации..... | 32 |
| 1.6. Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза человека (APE1)..... | 39 |
| 1.6.1. 3'-5'-экзонуклеазная активность | 41 |
| 1.6.2. 3'-диэстеразная активность | 42 |
| 1.6.3. Инцизионная репарация нуклеотидов (ИРН)..... | 42 |
| 1.6.4. Рибонуклеазная активность | 43 |
| 1.6.5. Взаимодействие APE1 с другими ферментами..... | 44 |
| 1.7. Структурные особенности APE1..... | 46 |
| 1.7.1. Активный центр APE1 | 48 |
| 1.7.2. Аминокислотные остатки, определяющие специфичность APE1 | 51 |
| 1.8. APE1-подобные эндонуклеазы | 54 |
| 2. Материалы и методы..... | 57 |
| 2.1. Моделирование методом молекулярной динамики | 57 |

| | |
|---|-----|
| 2.2. Буферные растворы..... | 59 |
| 2.3. Синтез и очистка олигодезоксирибонуклеотидов | 59 |
| 2.4. Мутагенез гена zAPE1 | 60 |
| 2.5. Выделение и очистка ферментов..... | 61 |
| 2.6. Анализ активности ферментов zAPE1 в стационарных условиях..... | 62 |
| 2.7. Флуоресцентные кинетические измерения методом «остановленного потока» | 62 |
| 2.8. Математическая обработка кинетических кривых | 63 |
| 2.9. Анализ межмолекулярных взаимодействий с использованием микротермофореза | 64 |
| 3. Результаты и их обсуждение..... | 65 |
| 3.1. Сравнительный анализ APE1-подобных АП-эндонуклеаз | 65 |
| 3.2. Моделирование комплексов АП-эндонуклеаз с ДНК..... | 66 |
| 3.2.1. Анализ моделей комплексов APE1 человека с ДНК | 66 |
| 3.2.2. Сравнительный анализ моделей комплексов ДНК с гомологичными ферментами APE1 | 71 |
| 3.2.3. Моделирование траекторий выворачивания нуклеотидов в активный центр zAPE1..... | 77 |
| 3.3. АП-эндонуклеазная активность ферментов zAPE1 дикого типа и мутантных форм | 93 |
| 3.3.1. Выбор заменяемых аминокислотных остатков..... | 93 |
| 3.3.2. Сравнительный анализ АП-эндонуклеазной активности методом регистрации продукта в ПААГ | 94 |
| 3.3.3. Сравнительный анализ АП-эндонуклеазной активности методом остановленного потока | 96 |
| 3.3.4. Определение величин констант связывания методом микротермофореза..... | 99 |
| 3.3.5. Определение величин констант АП-эндонуклеазной реакции методом остановленного потока для мутантных форм zAPE1 | 100 |
| 3.4. ИРН-активность ферментов zAPE1 дикого типа и мутантных форм..... | 103 |
| 3.4.1. Сравнительный анализ ИРН-активности методом ПААГ-электрофореза..... | 103 |
| 3.4.2. Конформационные изменения ИРН-субстратов при взаимодействии с ферментами zAPE1..... | 107 |
| Заключение..... | 114 |
| Выводы | 118 |
| Список литературы..... | 119 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Повреждение ДНК – это неизбежный процесс, постоянно идущий внутри живых клеток. Различные экзогенные и эндогенные факторы вызывают множество повреждений, включая окисление, алкилирование, дезаминирование, апуринизацию и другие мутагенные изменения оснований ДНК, которые угрожают целостности генетической информации. Установлено, что ежедневно в одной клетке возникает около 10 тысяч окислительных повреждений [1]. Поэтому для предотвращения мутагенного и цитотоксического эффекта образующихся в ДНК модификаций необходимо как можно скорее удалять повреждения из генома, для чего в ходе эволюции сформировались сразу несколько защитных репарационных систем: эксцизионная репарация оснований (ЭРО), эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН), репарация некомплементарных пар и рекомбинационная репарация ДНК [2,3].

За репарацию большей части модифицированных необъёмных азотистых оснований и апуриновых/апиримидиновых (АП) сайтов в ДНК отвечает ЭРО [4]. В этом пути одну из ключевых ролей играют АП-эндонуклеазы, что делает их одними из важнейших репарационных ферментов и привлекательной мишенью для общей регуляции эффективности процесса ЭРО. 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 (АП-эндонуклеазная активность) [5]. Известно также, что эти ферменты, наиболее изученными из которых до недавнего времени оставались бактериальная АП-эндонуклеаза Nfo и апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 человека (APE1), могут гидролизовать фосфодиэфирные связи не только нуклеотидов, потерявших основание, но и ряда нуклеотидов с модифицированными азотистыми основаниями, включая 2'-дезокси-5,6-дигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина (α A), 1,N6-этенoadенозин (ϵ A) и 2'-дезоксисуридин (dU). Ферментативная активность АП-эндонуклеаз в отношении нуклеотидов, несущих повреждённые азотистые основания, была названа инцизионной репарацией нуклеотидов (ИРН-активность) [6]. Кроме того, АП-эндонуклеазы обладают 3'-5'-эксзонуклеазной и эндорибонуклеазной активностями, расщепляя нуклеиновые кислоты без модифицированных оснований [5].

Несмотря на то, что АП-эндонуклеазы и их широкая субстратная специфичность вызывают большой интерес у исследователей структур биополимеров, до сих пор без ответа остаются вопросы о механизмах узнавания конкретных нуклеотидов с модифицированными азотистыми основаниями, которые выступают в качестве субстратов этого класса ферментов. На данный момент не известно, на каком этапе происходит отбор

«неподходящих» повреждений, на чём основан механизм субстратной специфичности АП-эндонуклеаз при осуществлении ИРН-активности и какие аминокислотные остатки ответственны за специфичность. Гипотезы разнятся от тех, в которых отводится главная роль моменту начала выворачивания нуклеотида, до тех, в которых, на примере АРЕ1, утверждается, что ферменты узнают нуклеотиды во время и даже после выворачивания [7–9]. Ответы на озвученные вопросы помогут не только установить молекулярные основы узнавания повреждений одним из ключевых ферментов процесса эксцизионной репарации оснований ДНК, но и дадут возможность лучше понять общие принципы узнавания специфических сайтов ДНК-процессирующими ферментами.

Однако, исследование данных вопросов осложняется невозможностью получить стандартными методами кристаллографии комплексы АП-эндонуклеазы с повреждённой ДНК при использовании ИРН-субстратов. В работах [9,10] показано, что при попытках кристаллизации АРЕ1 в комплексе с ДНК, содержащей DNU и α A, кристаллизуется только комплекс с продуктом, несмотря на отсутствие ионов магния, необходимых для осуществления активности фермента. В подобных случаях могут быть использованы методы компьютерного моделирования, в частности метод молекулярной динамики (МД). Метод МД позволяет получить модели биополимеров и их комплексов, а также моделировать сложные конформационные превращения, например, выворачивание нуклеотида в активный центр. Этот метод успел зарекомендовать себя как отличный инструмент в задачах по изучению механизмов работы ферментов, определению причин субстратной специфичности и предсказанию модификаций, которые могут её изменить [11]. При этом для экспериментального анализа конформационных превращений и подтверждения заключений, сделанных на основании моделирования, могут быть использованы методы флуоресцентной регистрации конформационных превращений в составе фермент-субстратного комплекса в процессе образования каталитически компетентного состояния.

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.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- 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 *Danio rerio*, *Xenopus laevis* и

Drosophila melanogaster с ДНК-субстратами, содержащими повреждённые нуклеотиды: 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофуран (F-сайт), 2'-дезоксидигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина (α A), 1,N6-этенoadенозин (ϵ A) и 2'-дезоксидигидроуридин (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 *Danio 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'-дезоксидигидроуридин (DHU), альфа-аномер аденозина (α A), 1,N6-этенoadенозин (ϵ A) и 2'-дезоксидигидроуридин (dU).

Научная новизна работы и практическая значимость работы

В представленной работе впервые было проведено детальное компьютерное моделирование комплексов АП-эндонуклеаз zAPE1 из *Danio rerio*, хAPE1 из *Xenopus laevis* и Rrp1 из *Drosophila melanogaster*, подобных hAPE1 человека, с ДНК-субстратами, содержащими различные типы повреждений. Показано, что все исследованные APE1-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 изучавшихся аминокислотных остатков, принимающих участие в процессе узнавания повреждённых азотистых оснований и определяющих специфичность фермента по отношению к различным повреждениям. На основе анализа данных молекулярного 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 или при непосредственном его участии. Автор принимал активное участие в анализе полученных результатов и написании статей.

Публикации и апробации работы

По материалам работы опубликовано 4 научных статьи, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Результаты, изложенные в диссертации, были представлены на конференциях: 13-ой международной мультikonференции «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии» – BGRS/SB-2022 (Новосибирск, 2022), всероссийской конференции «От микробиологии к генетическим технологиям» (Новосибирск, 2023).

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 141 странице, содержит 56 рисунков, 2 схемы и 15 таблиц. Библиография включает 250 литературных источников.

Список сокращений

- АП-сайт – апурин/апиримидиновый сайт
АЦ – активный центр
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТТ – дитиотреитол
ИРН – инцизионная репарация нуклеотидов
КМ/ММ – квантовая механика/молекулярная механика
МД – молекулярная динамика
МСТ – микроскопический термофорез
ПААГ – полиакриламидный гель
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СКО – среднеквадратичное отклонение
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
ЭРО – эксцизионная репарация оснований
 α A – альфа-аденозин
 α T – альфа-тимидин
 ϵ A – 1,N ϵ -этенoadенозин
APE1 – AP-эндонуклеаза 1
BHQ1 – black hole quencher 1
dRp – дезоксирибозофосфат
dU – 2'-дезоксиуридин
DHU – 5,6-дигидро-2'-дезоксиуридин
F-сайт – 2-гидроксиметил-3-гидрокси-тетрагидрофуран
FAM – 6-карбоксифлуоресцеин
FRET – резонансный перенос энергии при флуоресценции
MPG – метилпуриновая гликозилаза
PARP1 - поли(АДФ-рибоза)полимераза 1
PCNA - ядерный антиген пролиферирующих клеток
PDB ID – идентификационный номер в банке данных кристаллических структур
Pol β – ДНК-полимераза β
TDG – тимин-ДНК-гликозилаза
UDG – урацил-ДНК-гликозилаза
XRCC1 – X-ray repair cross-complementing protein 1

1. Рациональный дизайн ферментов с изменёнными свойствами (Обзор литературы)

Ферментативный катализ – основополагающий механизм в процессах метаболизма всех живых организмов. Ферменты регулируют скорость большинства химических реакций, происходящих в живых клетках. Эволюция, длившаяся несколько миллиардов лет, привела к появлению ферментов, способных катализировать химические превращения, слишком медленные для наблюдения в обычных условиях. Наиболее эффективные ферменты могут катализировать реакции со скоростью, ограниченной только скоростью диффузии. Ферменты часто зависят от наличия кофакторов или коферментов, а также от условий среды (рН, температура, растворитель), хотя обычно активны в широких границах условий.

Благодаря своим уникальным свойствам, ферменты являются прекрасным инструментом в деятельности не только живых клеток, но и людей. Однако, лишь немногие ферменты от природы наделены такими чертами, которые без изменений подходят для применения в различных областях человеческой деятельности, включая медицину, промышленность и др. Поэтому за последнее время набрали популярность методы белковой инженерии, позволяющие получить ферменты с новыми, более полезными свойствами для выполнения широкого набора задач [12].

Направленная эволюция и рациональный дизайн являются самыми распространёнными подходами к созданию ферментов с новыми свойствами. С помощью направленной эволюции создают довольно обширные библиотеки мутантных форм ферментов путём внедрения случайных мутаций в гены целевых белков. Полученные мутантные варианты далее подвергаются отбору по интересующему свойству [13]. Рациональный дизайн в свою очередь опирается на анализ структур ферментов, на основе которого предлагаются неслучайные изменения в последовательности белка, призванные улучшить интересующие свойства, например, стабильность, активность, растворимость и т.д. [14]. С наступлением эры высокопроизводительных вычислений методы рационального дизайна начали всё больше полагаться на компьютерный анализ белковых структур. На данный момент компьютерный белковый дизайн достиг возможности предсказывать не только небольшие улучшения ферментов, но и существенные модификации, ведущие к появлению новых функций [15,16].

1.1. Экспериментальные методы создания ферментов с новыми свойствами

Получение ферментов с новыми свойствами фактически подразумевает в том числе и отбор по этим свойствам. В «докомпьютерную эпоху», когда не было возможности сразу

предсказать, какие именно модификации нужны белкам для получения желаемых свойств, пытались подчеркнуть вдохновение из наработок природы. В природе многообразие вариантов, из которых отбираются наиболее полезные, формируется за счёт мутаций в генах соответствующих белков. Поэтому у исследователей возникло желание использовать такой же подход, но намного более ускоренный. В итоге был выработан метод направленной эволюции.

Направленная эволюция, оставшаяся до сих пор довольно распространённым подходом в белковой инженерии, является мощным методом, основанным на поочерёдном использовании мутагенеза и отбора [12]. Данный подход успешно применяется для улучшения термостабильности [17], устойчивости к органическим растворителям [18], усиления белок-белковых взаимодействий [19], изменения субстратной специфичности [20] и др. При направленной эволюции ген белка подвергается мутагенезу для получения библиотеки мутантных форм, которая затем проверяется на наличие вариантов с улучшенными определёнными свойствами. После одного раунда отбора изменения могут быть недостаточны, поэтому раундов обычно много.

Способы построения библиотек включают высокоошибочную ПЦР, сайт-направленный мутагенез и создание комбинаций различных вариантов частей гена [21]. Ключевыми особенностями случайного мутагенеза являются необязательность наличия структурных данных, а также возможность обнаружения полезных замен в областях белка, далёких от тех, что выполняют интересующую функцию.

Ещё одним направлением данного подхода является мутагенез, направленный на определённую часть гена. Этот вариант требует наличия информации о структуре белка, но позволяет быстрее получить мутантные формы, содержащие множественные замены в определённых структурных элементах белка. Как правило, этот вариант метода применяется в случаях, когда нужно настолько изменить определённое место в белке, чтобы либо улучшить ферментативную активность на порядки, либо получить совершенно иную функцию, что, например, удалось группе учёных, получившей β -лактамазную активность у DD-транспептидазы [22,23].

Далее главной задачей становится установление отдельных вариантов, которые обладают улучшенным целевым свойством, среди всего набора полученных мутантных форм. Некоторые методики, основанные на отборе, такие как мРНК-дисплей и флуоресцентно-активированная сортировка капель, имеют высокую пропускную способность [22]. Другие, в которых измеряются концентрации субстрата или продукта, более гибкие, но и более ограничены по скорости получения результата [22].

1.2. Теоретические методы предсказания новых свойств ферментов

Рациональный дизайн ферментов является методом, требующим наличия информации о последовательности и структуре фермента. Эта информация используется для внесения определённых, неслучайных замен, для которых предсказывается влияние именно на интересующие свойства фермента. Этот метод убирает необходимость просмотра больших библиотек мутантов, как в случае направленной эволюции. В подходе, основанном на исследовании последовательностей, обычно пытаются сравнивать последовательности гомологичных белков для определения остатков, возможно влияющих на активность фермента. Когда доступна трёхмерная структура интересующего фермента или его гомолога, появляется возможность установления прямого взаимоотношения структура-функция для остатков активного центра. При наличии такой визуализации можно сразу предложить некоторые модификации, затрагивающие исследуемую функцию фермента. Существует много способов изменить активность фермента в ту или иную сторону. Одним примером является замена остатков с большими боковыми цепями на остатки с малыми боковыми цепями для увеличения объёма активного центра, что в некоторой степени может расширить субстратную специфичность. Созданы разные компьютерные программы, такие как LAMA, PROF_SIM и COMPASS, для сравнения гомологичных последовательностей и соответствующих структур и построения мутационных карт для целевого белка [16].

Рациональный дизайн является не только способом изменения уже существующих ферментов, но и способом создания новых. Это стало возможным благодаря развитию статистических методов, находящих структурно-функциональные взаимоотношения. Но этот метод требует хорошего понимания каталитического механизма, который желают видеть у создаваемого фермента, и знания всех промежуточных состояний реакции. Идеализированный активный центр создаётся размещением функциональных групп белка так, чтобы получить наименьший энергетический барьер при переходе между состояниями реакции [24].

По прошествии нескольких волн развития биокаталитических технологий, благодаря усовершенствованию и появлению новых методов секвенирования, структурной и молекулярной биологии, а также биоинформатики, выработалась устойчивая схема биоинженерного цикла, включающая этапы дизайна, создания, проверки и выводов [16]. В белковой инженерии этот цикл довольно полезен как при изменении существующих ферментов, так и при разработке новых. Этапы дизайна и выводов имеют в своей основе мощные компьютерные методы, включающие молекулярный докинг, молекулярную

динамику, высокоточные квантовомеханические вычисления, машинное обучение, а также, что немаловажно, продвинутое визуализирующие и анализирующие программы, такие как UCSF Chimera, PyMol и др. [25].

1.2.1. Предсказание пространственной структуры

В белковой инженерии одним из залогов успеха является наличие точной пространственной структуры белка, из которой можно извлечь важные механистические подробности. Классические методы структурной биологии, такие как методы кристаллографии и ЯМР, получили большое развитие за последние несколько десятков лет, но накопление реальных трёхмерных структур намного медленнее, чем появление данных о новых последовательностях нуклеиновых кислот и белков. Для удовлетворения спроса на структурную информацию были созданы методы предсказания структур, которые делятся на две большие группы: методы, основанные на гомологии, и методы предсказания с «нуля» [16]. Кроме того, стало более широко применяться и машинное обучение для получения неочевидной информации, которая может быть заложена в последовательности [26].

Любой фермент имеет свой субстрат, для которого он и катализирует какую-либо реакцию. Основанный на известных теориях фермент-субстратных взаимодействий, метод молекулярного докинга нацелен на предсказание наилучшего способа связывания лиганда с белком с учётом ограниченной гибкости активного центра и самого лиганда [27]. Для докинга крайне важно, чтобы структуры, подаваемые на вход, были точными и реалистичными для получения соответственно реалистичных результатов.

Кроме того, все жизненные процессы, в том числе и ферментативный катализ, происходят во времени, то есть динамичны. Поэтому для исчерпывающего понимания механизмов работы ферментов редко бывает достаточно изучения единственного «кадра», которым и является статичная структура фермента или его комплекса с лигандом, полученная методом рентгеноструктурного анализа или докинга. Метод молекулярной динамики (МД) позволяет увидеть поведение биомолекул во времени, получить так называемые конформационные ансамбли [11]. Более того, развитие МД-моделирования достигло возможности симуляции поведения больших и сложных систем на временах, которые соответствуют временам течения процессов в реальности. Кроме того, именно метод МД позволяет моделировать с большой точностью и некоторые сложные процессы, включающие в себя не только конформационные изменения отдельных биополимеров, но и динамику межмолекулярных взаимодействий, подразумевающих масштабные изменения

в системе, например, перемещение лиганда по мембранному каналу [28] или выворачивание нуклеотидов из ДНК в активный центр [29].

1.2.2. Применение квантовой теории в МД-моделировании

Методы квантовой химии и компьютерные расчёты на основе этой теории давно применяются в работах по точному описанию каталитических состояний фермент-субстратных комплексов [30] и межмолекулярных взаимодействий прочих систем с малым количеством атомов [31]. Но до сих пор квантовые расчёты в чистом виде не могут быть применены для моделирования динамики каких-либо систем из-за высокой ресурсоёмкости. Поэтому, чтобы одновременно увеличить точность молекулярно-динамических расчётов и не потерять сильно в скорости вычислений, был разработан метод, объединяющий молекулярную механику (ММ), на которой основывается классическая МД, и квантовую механику (КМ), и позволяющий применять этот комбинированный КМ/ММ подход для одной системы [32].

При использовании комбинированного КМ/ММ подхода система делится на две части: основную, внутри которой проходит химическая реакция или другой важный процесс, и второстепенную, окружающую основную. При моделировании основной части применяются квантово-механические расчёты, которые учитывают дополнительные степени свободы, такие как электроны и ядра атомов, что позволяет моделировать процессы, невозможные при моделировании методом молекулярной механики – разрыв и образование ковалентных связей. Второстепенную часть системы моделируют более грубым методом молекулярной механики с упрощённым представлением молекул – в ММ ковалентные связи неразрывны.

Несмотря на то, что значимость данных, получаемых такими методами, как ядерный магнитный резонанс (ЯМР), кристаллография и другие спектроскопические методы, очень высока и даёт большой вклад в понимание устройства ферментов, не всегда удаётся детализировать каталитический механизм с помощью данных методов. В то же время, КМ/ММ подход выделяется возможностью количественно описывать химические структуры и энергетические изменения при реакциях в них. Кроме того, моделирование с применением квантово-механических расчётов даёт возможность представить энергию реакции в виде суммы индивидуальных составляющих.

1.2.3. Направленная эволюция с применением компьютерных методов

Компьютерные методы в применении к направленной эволюции помогают в первую очередь снизить количество исследуемых вариантов изменённых ферментов. Эту

помощь можно разделить на два вида [16]: 1) поиск наиболее подходящих для мутагенеза областей последовательности и тем самым уменьшение количества исследуемых последовательностей и 2) компьютерный дизайн комбинаторных вариантов для увеличения эффективности итерационного процесса эволюции.

Кроме того, информация об эффективности тех или иных замен, вводимых в последовательности, далее может быть подвергнута исследованию с применением машинного обучения, что ещё сильнее может углубить познание структурно-функциональных взаимосвязей [35]. Важно отметить, что разработчики новых компьютерных методик не только показывают их применимость, но и подробно объясняют, как их могут применять и те, кто не знаком глубоко с компьютерными методами, что сильно ускоряет процесс белковой инженерии.

1.3. Метод молекулярной динамики

Молекулярно-динамическое моделирование – это мощный вычислительный метод наблюдения атомных взаимодействий в белок-белковых и белок-лигандных системах. Преимуществом МД моделирования является то, что в получаемых файлах траекторий записаны все события, происходящие в системе за определённое время. Набор кадров траектории позволяет исследователям наблюдать движение во времени каждой молекулы или её части на атомном уровне. МД удобно применять перед проведением экспериментальных биохимических работ, так как она может дать заранее ценную информацию об исследуемых объектах и экономит реальные ресурсы. Таким образом сочетание метода молекулярной динамики с экспериментальными подходами стало очень распространённой стратегией изучения структуры биополимеров.

Теоретические основы классической молекулярной динамики включают известные результаты аналитической механики. В простейшем варианте метода МД атомы не имеют внутренней структуры, а их движение описывается в основном законами Ньютона. Молекулы представлены в виде набора гармонических осцилляторов, описываемых законом Гука. Для описания взаимодействий не связанных ковалентно атомов используют потенциалы Кулона и Леннарда-Джонса [36]. Уравнения движения системы решают численно. Для них обычно используется невысокий порядок интегрирования, так как точное вычисление потенциала Леннарда-Джонса приводит к экспоненциальному росту возмущений и неустойчивости системы [37].

Применение метода МД в научных исследованиях начинается с 1957 года. Альдер и Вэйррайт применили МД моделирование для изучения простых газов [38]. Двадцать лет спустя МД моделирование было впервые использовано в исследовании белка [39]. В 80-ых

годах прошлого века начали активно развиваться программы, позволяющие проводить вычисления с разнородными системами, содержащими не только отдельно белки, ДНК или РНК, а их комплексы друг с другом и с иными лигандами. Благодаря этому появились новые возможности предсказания взаимодействий между молекулами.

Далее на протяжении примерно 30 лет методы получения реальных структур биополимеров и вычислительные методы развивались примерно с одинаковыми темпами, хорошо дополняя друг друга. Но некоторое время назад случился резкий рост количества полученных реальных структур благодаря развитию метода криоэлектронной микроскопии, а также прорывам в кристаллизации мембранных белков [40]. Тем не менее спрос на вычислительные методы и в первую очередь на МД остаётся высоким, ведь именно МД позволяет предсказывать поведение молекул во времени, что зачастую оказывается полезнее статичных кристаллических структур.

Разработчики вычислительного ПО тоже пытаются не отставать, внедряя самые последние достижения техники в свои программы. Кроме того, появление суперкомпьютеров сильно расширило возможности метода. В данный момент особую важность имеют компьютерные кластеры с большим количеством графических процессоров, которые справляются с расчётами лучше, чем центральные процессоры [41]. С другой стороны, развитие графических процессоров в сочетании с продвинутым ПО привели к тому, что сегодня серьёзное МД моделирование можно проводить на отдельных компьютерах, не отличающихся по мощности от домашних. Поэтому количественное увеличение вычислительных мощностей, выражающееся в увеличении числа людей и лабораторий, использующих МД в своей работе, также внесло вклад в развитие методов структурной биологии и достижение высоких результатов в этой области.

Таким образом, МД моделирование приобретает всё большую и большую значимость в науках о жизни. Подробный анализ результатов вычислений помогает пролить свет на понимание структур и механизмов взаимодействий биомолекул.

1.3.1. Теоретические основы метода МД

Основной идеей МД моделирования является использование законов движения Ньютона для вычисления сил, действующих на каждый атом в системе, что позволяет предсказывать изменение положения каждого атома во времени. Тем самым исследователь может наблюдать положение и движение атомов в различных временных точках траектории.

В основе классической МД лежит принцип силовых полей – наборов уравнений вместе со значениями их параметров. С помощью этих уравнений описывают

взаимодействия внутри молекул и между ними. Для описания нековалентных взаимодействий используют простые парные функции атомных координат. Причём под атомными координатами подразумевают координаты ядер, что возможно благодаря приближению Борна-Оппенгеймера [42]. Как уже было сказано, уравнения гармонических осцилляторов используют для описания связей между атомами. В данном случае решается задача не только для непосредственных связей между атомами (задача двух тел), но и для углов между связями (задачи трёх и четырёх тел). Самым простым силовым полям присуща аддитивность, то есть независимость длин связей от углов между ними, а также постоянство частичных зарядов атомов. Для более точного описания состояний структур используют силовые поля с зависимостями более высоких порядков.

Самыми широко распространёнными программами для выполнения МД расчётов являются AMBER [43] и GROMACS [44]. Большинство современных программ моделирования поддерживают несколько силовых полей. Все эти программы выполняют схожие вычисления, но различаются в эффективности работы на разных компьютерных системах и в поддерживаемых дополнительных особенностях (например, улучшенные методы выборки, схемы управления величинами температуры и давления, поддержка грубых вычислений).

Одной из самых ранних расчётных программ была AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement, управляемое создание модели с оптимизацией энергии). На момент начала разработки AMBER (1978 год) существовали только специализированные на определённых классах молекул программы [45], поэтому авторы AMBER, Пол Вайнер и Питер Коллмэн, поставили своей целью создать универсальную программу, способную вычислять энергию совершенно различных по химической природе систем и вместе с этим визуализировать результаты. Первый выпуск состоялся в 1981 году. С тех пор в программу было добавлено много новых возможностей, включая новые алгоритмы построения топологии систем, подпрограмму минимизации энергии, вычисления на видеокартах и другие. На данный момент Amber является относительно громоздким и не совсем удобным, но универсальным и производительным пакетом программ для расчётов, оставаясь популярным и широко используемым.

История GROMACS (GRONingen MACHine for Chemical Simulations) началась в 1991 году [46], когда группа учёных факультета биофизической химии Университета Гронингена решила создать вычислительную МД программу с упором на распараллеливание вычислений для их ускорения. Изначально вычисления проводились только на центральных процессорах, но с момента технического развития видеокарт все новые технические и программные возможности стали быстро вводиться в GROMACS,

делая расчёты всё более и более быстрыми. Кроме того, GROMACS всегда был свободно распространяемым ПО, поэтому эта программа закономерно стала одной из самых популярных, и остаётся такой до сих пор.

AMBER и GROMACS тесно связаны с идущими вместе с ними известными универсальными силовыми полями – Amber [47] и GROMOS [48] соответственно. Семейство силовых полей Amber выгодно отличается от остальных в том числе благодаря точно рассчитанным частичным зарядам атомов, вычисленных методом ограниченного электростатического потенциала (Restrained ElectroStatic Potential, RESP) [49]. Его улучшенная версия A99SB-disp очень хорошо моделирует поведение неструктурированных белков [50].

Помимо Amber и GROMOS известным силовым полем является CHARMM [51]. Оно было одним из первых полей, параметризованных для важнейших биомолекул - нуклеиновых кислот и белков. Позже были созданы обобщённые силовые поля Amber [52] и CHARMM [53], с помощью которых можно моделировать поведение малых молекул и их комплексов практически любой химической природы.

Стоит отметить, что на данный момент ещё не существует идеального силового поля, позволяющего описывать одинаково точно все белки. Каждое силовое поле имеет свои плюсы и минусы, поэтому для каждой моделируемой системы стоит подбирать своё поле. Например, семейство силовых полей CHARMM относительно хорошо подходит для лигандов с атомами галогенов [53].

Продолжением развития и расширением стандартных силовых полей являются реакционные силовые поля, позволяющие моделировать образование и разрыв ковалентных связей. Например, в силовом поле ReaxFF [54] это реализовано за счёт использования величины кратности связи.

1.3.2. Процесс МД-моделирования

Перед запуском собственно МД моделирования фактически обязательным является процесс минимизации энергии исходной структуры. Исходная структура, полученная каким бы то ни было способом, с большой вероятностью содержит в себе напряжённые участки с перекрыванием ван-дер-ваальсовых радиусов атомов и экстремальными значениями параметров (длин связей, углов между связями и т.д.). В начале МД моделирования всем атомам приписываются случайные значения скоростей и ускорений. В сочетании с напряжением в структуре они могут ещё сильнее увеличить отклонение от равновесия и вызвать нестабильность структуры, приводящую к её разрушению. Бороться с этим помогают методы поиска локального минимума [42]. Поиск минимума энергии

системы заключается в поиске такого взаимного расположения атомов в пространстве, при котором, согласно используемой вычислительной модели, суммарная сила, действующая на каждый атом, близка к нулю. Таким образом, эта задача сводится к математической задаче поиска минимума функции многих переменных, где функцией является энергия, а переменными – координаты атомов. Среди самых широко распространённых методов поиска локального минимума можно выделить, например, метод градиентного спуска, подходящий для малых или жёстких систем, метод сопряжённых градиентов, используемый в больших системах и более эффективно выбирающий направление поиска минимума. Существуют и методы более высокого порядка, такие как метод Ньютона, оперирующий не только величиной энергии, но и скоростью её изменения [55].

В действительности каждая молекула находится в окружении многих других молекул, как себе подобных, так и растворителей. То есть система, если даже и замкнута, всё равно содержит очень большое количество атомов, что увеличивает трудоёмкость моделирования. Поэтому в первых работах моделирование проводилось для молекул в вакууме [42]. Такой подход, конечно же, имел низкую реалистичность результатов. Для решения проблемы в МД моделирование были внедрены периодические граничные условия [56]. В таком случае представляется, что исследуемая структура находится в некоторой ячейке – малой части большой системы. Самым наглядным примером является кубическая ячейка. Во время моделирования атомы могут передвигаться из одной ячейки в другую. Но так как все ячейки одинаковы, передвижение атомов из одной в другую на самом деле означает выход атома через одну сторону периодической ячейки и его появление с противоположной стороны. Формы ячеек могут быть разными. Кубическая – самая простая, но в случае с шарообразными молекулами в ней будет оставаться большой незанятый объём. Поэтому на практике чаще применяется додекаэдральная ячейка, имеющая меньший объём для той же молекулы, а значит и снижающая количество вычислений.

Периодические граничные условия позволяют использовать модель явного растворителя, не доводя количество атомов в системе до громадных значений. В большинстве моделирований систем с явным растворителем основное внимание уделяется поведению растворённой молекулы, в то время как поведение растворителя вызывает небольшой интерес, так как отдельные молекулы растворителя обычно слабо связаны с основным объектом [42]. Но все молекулы растворителя в целом могут влиять на поведение растворённой молекулы за счёт большого количества случайных столкновений и силы трения при движении.

На данный момент, вычислительные мощности не позволяют моделировать точное физиологическое окружение биомолекул с наличием всех веществ и молекул, имеющихся в живых клетках, поэтому в качестве растворителя почти всегда используется вода с добавлением ионов. Создан целый ряд моделей явной воды, включая самые распространённые TIP3P, SPC/E, SPC-f и другие [42,57,58]. Самая простая из них, двухточечная, включает информацию о размере молекулы, дипольном моменте и распределении зарядов. Трёхточечная модель TIP3P явно описывает все три атома воды. Модели воды с большим количеством точек уже включают более подробную информацию о зарядах каждого атома, позволяющую более точно рассчитывать образующиеся водородные связи.

Все эти модели, кроме SPC-f, допускают применение упрощённых алгоритмов расчёта движения атомов водорода – SHAKE и LINCS [59]. В модели SPC-f молекула воды гибкая, но всё ещё описывается одним зарядом. Тем не менее, эта модель хорошо описывает плотность воды и её диэлектрическую проницаемость [60]. Использование явного растворителя всё ещё трудоёмко с точки зрения вычислений, так как заставляет моделировать количество нековалентных взаимодействий примерно на порядок большее, чем у основной молекулы.

Проблему ресурсоёмкости обчёта явного растворителя решает модель неявного растворителя. Неявный растворитель – это модель, в которой растворитель представлен непрерывной средой со своей константой диэлектрической проницаемости вместо отдельных явных молекул. Этот метод часто используется в моделированиях, где требуется вычислить свободную энергию взаимодействий растворённой молекулы с растворителем, например, при моделировании сворачивания или конформационных переходов в белке, нуклеиновых кислотах, полисахаридах и т.д. Использование неявного растворителя оправдано в жидкостях, где может быть применён потенциал средней силы для приближенного описания усреднённого поведения многих подвижных молекул растворителя. Однако, поверхности и внутренние полости биологических мембран также могут рассматриваться некоторой средой со своими диэлектрическими свойствами [61].

Недостатки модели неявного растворителя очевидны. Во-первых, растворитель перестаёт быть вязким из-за отсутствия столкновений между молекулами растворителя. Во-вторых, исключается из рассмотрения гидрофобный эффект, который наблюдается на границе с растворителем [62]. И, наконец, теряются явные водородные связи и ион-ионные мостики между молекулами растворителя и какими-либо участками исследуемых молекул. В случае, если растворитель – вода, молекулы которой могут образовывать водородные связи с биополимерами, данная модель может принципиально не подходить, если

водородные связи с растворителем играют важную роль в функции биополимера. Последние две проблемы решаются применением гибридного подхода, в котором основную молекулу окружают тонким слоем растворителя. При этом скорость вычислений остаётся почти на том же уровне.

Несмотря на упрощения вычислений движения атомов водорода, всё ещё остаётся проблема большого количества дальних электростатических взаимодействий. Для уменьшения количества связанных с ними вычислений был разработан метод отсечения взаимодействий вне определённого радиуса вокруг атома [42]. В чистом виде он приводил к неустойчивости системы, поэтому был доработан внесением некоторых сглаживающих функций на границе отсекающей сферы. Далее стали использовать более мягкий критерий, по которому взаимодействия вне сферы считались, но не на каждом шаге вычислений. Кроме того стали использовать более эффективное суммирование взаимодействие по Эвальду для расчёта электростатических взаимодействий [63].

В молекулярной динамике используется понятие ансамбля, пришедшее из статистической физики. Ансамбль (также статистический ансамбль) – это совокупность очень большого (в пределе бесконечного) числа одинаковых физических систем многих частиц («копий» данной системы), находящихся в одинаковых макроскопических состояниях. Существует несколько видов ансамблей.

В микроканоническом ансамбле константами системы являются количество частиц (N), объём (V) и энергия (E). Он относится к адиабатическим процессам без обмена теплом. При моделировании в микроканоническом ансамбле МД траектория может быть представлена как процессы обмена потенциальной и кинетической энергий при сохранении общей энергии. Ранние МД моделирования проводили именно с таким ансамблем, однако позже перешли на более реалистичные ансамбли с обменом энергии.

Одним из таких является канонический ансамбль с постоянным количеством частиц (N), объёмом (V) и температурой (T). В NVT -ансамбле происходит обмен энергией с термостатом. На данный момент существует большое количество термостатов, из которых чаще всего применяются термостаты Берендсена [64] и Нозе-Гувера [65]. Термостаты различаются алгоритмами поглощения и выделения энергии на границах ячейки с системой.

В NPT -ансамбле постоянны соответственно количество частиц, давление и температура. Кроме термостата при моделировании в NPT -ансамбле требуется баростат. Такой ансамбль наилучшим образом описывает поведение растворов в открытой пробирке. С другой стороны, он не подойдёт для случая биологических мембран, в которых давление неизотропно.

Кроме того, существуют изобарно-изоэнтальпийный ансамбль (NPH) с постоянным количеством частиц, давлением и энтальпией, а также большой канонический ансамбль (μVT), в котором постоянны химический потенциал системы, объём и температура.

Важным параметром в моделировании является величина шага по времени, с которым интегрируются уравнения. Чтобы быть уверенными в вычислительной стабильности, временной шаг в моделировании должен быть очень коротким. Распространённой величиной такого шага является 1-2 фемтосекунды (10^{-15}), что ограничено методами обчёта движения атомов водорода. Большинство биохимических процессов имеют длительность порядка нано- и микросекунд, что означает наличие очень большого количества вычисляемых шагов в траекториях.

При анализе результатов моделирования исследователь должен иметь в виду, что моделируемые молекулярные системы, как и в жизни, хаотичны, что ведёт к зависимости поведения системы в каждой конкретной траектории от начальных условий (например, от начальных скоростей атомов или от начального положения молекул растворителя) и случайных событий во время неё. Поэтому фактически обязательным является проведение нескольких моделирований одной и той же системы с одинаковыми начальными координатами атомов, но разными начальными случайными параметрами. Кроме того, полезным является и проверка влияния на траекторию различий в самих начальных координатах, а также в других условиях моделируемой среды.

1.3.3. Направленная молекулярная динамика

Несмотря на обилие методов моделирования белок-белковых и лиганд-рецепторных взаимодействий, процессы, происходящие во время связывания молекул друг с другом и во время больших конформационных перестроений внутри одной молекулы, остаются ещё не до конца изученными. Ещё недавно в среде МД моделирования преобладала точка зрения о том, что при моделировании все процессы должны быть обратимыми. Поэтому для наблюдения нужных редких процессов использовали множественные и длительные моделирования, что требовало большого количества вычислительного времени. Кроме того, на больших временах моделирования существенна роль ошибок вычислений, которые могут накапливаться, приводя к нереалистичному результату. Частым случаем является отсутствие каких-либо конформационных переходов сколь угодно долгое время моделирования, хотя в реальности эти переходы происходят, причём довольно быстро.

Позже было показано, что интересующие термодинамические параметры, такие как, например, энергетические барьеры конформационных переходов, могут быть вычислены и

при моделировании необратимых процессов [66]. Благодаря этому широкое применение появилось у направленной молекулярной динамики, при которой не получится вычислить точные значения сродства при связывании или силу ионного взаимодействия, но зато открывается возможность получить качественно новую информацию, относящуюся к нековалентному связыванию [67].

Идея направленной МД появилась в результате распространения экспериментальных подходов, позволяющих прилагать механические силы к отдельным молекулам для изучения свойств связывания и реакции на внешние силы. К таким подходам относятся атомно-силовая спектроскопия [68], оптический пинцет [69], биомембранный силовой зонд [70] и аппарат поверхностной силы [71]. Эти методы вдохновили исследователей применить подобную технику при компьютерном моделировании.

В направленной МД направление внешних сил задаётся исследователем. Это направление может совпадать с направлением движения каких-либо частей молекулы в реальности, например, при выворачивании нуклеотида из ДНК или перемещении лиганда с одного места связывания в другое, а может быть и выбрано, если стоит задача предсказать, возможно ли движение в данном направлении. Так, внешние силы могут быть приложены, например, к лиганду, чтобы облегчить его диссоциацию с рецептором [67]. Анализ взаимодействий лиганда с карманом связывания и запись величин всех дополнительных сил как функций от времени или расстояния даёт важную информацию о структурно-функциональных взаимоотношениях в комплексе, путях связывания и механизмах избирательности ферментов. Направленная МД может быть также применена при исследовании молекулярных механизмов, определяющих свойства пластичности белков, подверженных деформациям в атомно-силовой микроскопии или оптическом пинцете [72–74].

Помимо получения качественной информации биологические и фармацевтические приложения направленной МД позволяют получить также и количественную информацию о связывании в лиганд-рецепторном комплексе. Подробный обзор применения методов МД для исследования ДНК-гликозилаз был ранее проведён в диссертации Попова А.В. [75]. Некоторые способы применения направленной МД и результаты соответствующих работ будут представлены в следующем параграфе.

Существует схожий метод нацеленной МД, в котором внешние силы действуют на все атомы исследуемых молекул, заставляя их совершать переход из некоторого начального состояния в другое, конечное [76]. Прилагаемые силы действуют в направлении, в котором располагается соответствующий атом в целевой структуре.

Нацеленная МД используется для изучения тех же процессов больших конформационных переходов и связывания лигандов. Этот метод применяется в тех случаях, когда о путях конформационных превращений мало что известно или не известно ничего, но при этом имеются начальная и конечная структуры исследуемого комплекса. В таком случае нацеленная МД оказывается более эффективной, чем направленная, в которой приходилось бы перебирать всевозможные направления внешних сил вручную.

В дополнение к направленной МД может использоваться подход, называемый «зонтичная выборка» [77]. Первым этапом является одно либо серия моделирований последовательных процессов по пути конформационного перехода. На этом этапе выясняется первичная, приблизительная траектория перехода и определяются главные энергетические барьеры. Далее из первичной траектории выбирают некоторое количество кадров (чем больше, тем лучше), которые приобретают роль начальных состояний во втором этапе моделирования, где уже используется обычная МД. В итоге получают набор траекторий, в каждой из которых может происходить переход через барьеры. Анализ этих траекторий и подсчёт частоты переходов позволяет извлечь из этих данных информацию о механизме активируемого процесса [78].

1.3.4. Методы направленной МД

В первых работах по направленной МД использовали самые простые дополнительные силы, действующие на различные части систем. Эти силы прилагались к определённым атомам или центрам масс групп атомов и либо притягивали их друг к другу, либо расталкивали [79,80]. Данный подход эффективен до сих пор и был использован в работе по изучению расплетения амилоидных протофибрилл [78].

В данной работе [78] изучался механизм разрушения третичной структуры амилоидных протофибрилл и энергетика этого процесса для белков с разными аминокислотными последовательностями. При моделировании применялась дополнительная сила, действующая на замыкающий слой фибриллы, состоящий из двух бета-тяжей. Сила прилагалась к центру масс слоя вторичной структуры и была направлена в сторону от остальной части фибриллы. Сила имела постоянную величину при заданном расстоянии, но точка, к которой была направлена тяга, двигалась с постоянной скоростью от фибриллы. Величина силы задавалась гармоническим законом, поэтому всю систему можно было представить как фибриллу, край которой тянут с помощью пружины в противоположную сторону.

После полного разрушения фибриллы строили график зависимости прилагаемой силы от расстояния, на которое сдвинулся центр масс слоя фибриллы. Из этого графика

можно было извлечь информацию о моментах приложения наибольшей и наименьшей силы и проследить зависимость от последовательности полипептида. В той же работе, после получения данных графиков применялся метод зонтичной выборки, с помощью которого дополнительно уточняли энергетический профиль процесса.

Простые тянущие или толкающие силы можно применять и при исследовании других явлений, в том числе – выворачивания нуклеотидов из ДНК [80]. Тем не менее позже была разработана другая схема дополнительных сил для изучения именно явления выворачивания из ДНК.

В работе [81] изучали возможность моделирования траектории выворачивания нуклеотидов в активный центр MutS, фермента, распознающего различные неспаренные нуклеотиды, включая пары Г-Т, которые и были основным объектом данного исследования. Кроме того, было известно, что MutS может выворачивать не только нуклеотиды из, собственно, некомплементарных пар, но и соседние нуклеотиды. Поэтому одной из задач было моделирование выворачивания нуклеотида, соседнего с некомплементарной парой. В таком случае путь выворачивания был не совсем ясен, и использование простой дополнительной «тянущей» силы было трудноприменимым. Поэтому авторы использовали дополнительную силу, вращающую нуклеотид вокруг воображаемой оси. Такая ось задавалась двумя атомами фосфора: один фосфор – самого выворачиваемого нуклеотида, второй – соседнего с 3'-стороны. В качестве точки, от которой отталкивался выворачивающийся нуклеотид, использовался центр масс окружающих нуклеотидов, а к самому выворачиваемому нуклеотиду сила прилагалась через центр масс его основания.

Главным плюсом данного подхода можно считать бóльшую универсальность – нет необходимости знать точное конечное положение нуклеотида и точно задавать направление дополнительной силы. Главным же минусом – сниженную эффективность применяемой силы, возникающую из-за того, что атомы, относительно которых происходит выталкивание, не закреплены в пространстве. Они двигаются друг относительно друга, расстояния между ними постоянно меняются. Это ведёт к тому, что применяемая дополнительная сила часто приводит не к вращательному, а к поступательному движению, искажающему траекторию. Поэтому в работе [81] дополнительная сила была величиной в 100 ккал/(моль*рад), что в несколько раз больше, чем обычная, невращательная сила, необходимая для выворачивания нуклеотида. Но в данной работе выворачивание с помощью дополнительной силы было лишь первым этапом моделирования. На втором этапе применялась зонтичная выборка, уточнившая

механизм выворачивания и исправившая некоторые неточности, возникшие на первом этапе.

Для моделирования выворачивания нуклеотидов можно использовать и нацеленную МД. Она применяется в случаях, когда нет даже приблизительных предположений о том, как может вести себя выворачиваемый нуклеотид. Метод нацеленной МД был применён в работе [29], где изучался механизм работы тимин-ДНК-гликозилазы (TDG). В данном случае у исследователей не было достаточной информации для того, чтобы понять, какую именно траекторию выворачивания нуклеотида стоит моделировать. В том числе непонятно было, через какую сторону ДНК нуклеотид может выворачиваться – через малую бороздку или через большую. Имелась только структура комплекса с полностью вывернутым нуклеотидом. Поэтому авторы посчитали самым рациональным вариантом использование нацеленной МД.

В данном случае на каждый из атомов начальной структуры, которая тоже была получена моделированием, действовала сила с небольшой величиной в 1-5 ккал/(моль*Å²) [29]. Причём было промоделировано несколько траекторий с четырьмя схемами действия силы: 1) силы действовали только на ДНК, 2) силы действовали на ДНК и аминокислотные остатки, изначально взаимодействующие с выворачиваемым нуклеотидом, 3) силы действовали на все атомы ДНК и только на C^α белка, 4) силы действовали на все атомы комплекса. Оказалось, что в первых двух случаях нуклеотид в модельных траекториях выворачивается через малую бороздку, а в третьем и четвёртом случаях, когда силы действуют на остатки белка, пусть даже только на C^α, - через большую. Кроме того, в последних двух случаях полученные конечные состояния оказались заметно более близки к структуре в кристалле. На основе этих данных был сделан вывод, что традиционный вариант нацеленной МД, когда силы действуют на все атомы, более предпочтителен, и результаты именно этого моделирования были подвергнуты дальнейшему анализу.

Таким образом, метод направленной молекулярной динамики успел хорошо себя зарекомендовать при изучении работы репарационных ферментов, узнающих различные повреждения ДНК, и поэтому был выбран для этой работы, посвящённой рациональному дизайну АП-эндонуклеазы 1, одного из ферментов пути эксцизионной репарации оснований ДНК.

1.4. Ферменты эксцизионной репарации оснований ДНК как перспективные объекты для направленного дизайна

Экцизионная репарация оснований отвечает за репарацию небольших повреждений оснований ДНК, образующихся, например, под действием активных форм кислорода, ионизирующей радиации и реакционноспособных веществ, включая химиотерапевтические препараты [82]. Путь ЭРО включает в себя несколько последовательных ферментативных реакций с участием ДНК-гликозилаз, апуриновых/апиримидиновых эндонуклеаз, ДНК-полимеразы β и ДНК-лигазы [2]. Этот многостадийный процесс координируется другими ферментами и белковыми факторами ЭРО, что обеспечивает эффективность ДНК-репарации и сохранность генома [83,84].

Изучение пути ЭРО у млекопитающих на организменном уровне затруднено из-за наличия сложной сети взаимодействующих ферментов, перекрытия субстратной специфичности ферментов и летальности мутаций, выключающих некоторые гены, такие как ген тимин-ДНК-гликозилазы и ген АП-эндонуклеазы [85]. Большой вклад в изучение клеточных механизмов ЭРО эукариот был внесён работами, выполненными на дрожжах *S. cerevisiae*, нематоде *C. elegans* и мушке *D. melanogaster* [85,86]. Несмотря на высокую консервативность ферментов-участников ЭРО среди этих организмов, есть несколько заметных отличий между ними.

Первые активные ферменты ЭРО были выделены из *E. coli* и описаны в 1960 году. В течение следующих 20 лет были получены и описаны многие другие ЭРО-белки из *E. coli* [87,88]. Это позволило начать изучение механизмов ЭРО в различных эукариотах, включая культуры клеток млекопитающих. К концу прошлого века процессы ЭРО были уже довольно хорошо описаны для клеток млекопитающих [3,89]. Около 70 различных модифицированных оснований было создано и встроено в олигонуклеотидные субстраты для работ *in vitro*. Более 15 из них, встречающихся в геноме, были подробно описаны количественно различными методами, в том числе с помощью масс-спектрометрического анализа (рисунок 1). Среди модифицированных оснований встречаются окисленные пурины и пиримидины, после процессирования ферментами репарации которых возникают апуриновые/апиримидиновые сайты и как следствие одноцепочечные разрывы ДНК [83].

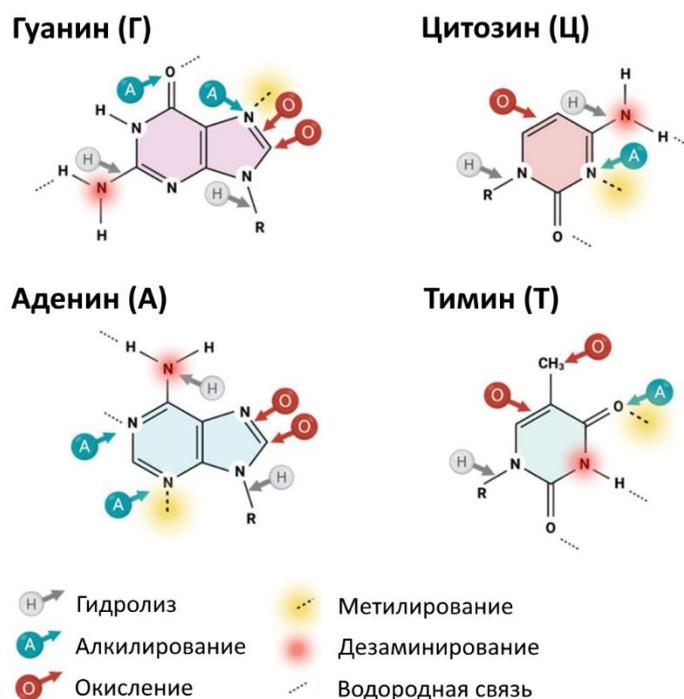


Рисунок 1. Азотистые основания и их положения, подвергающиеся различным модификациям.

Экспрессия белков пути ЭРО усиливается в ответ на повреждение ДНК или во время фазы G1 клеточного цикла как в ядре клетки, так и в митохондриях [90]. Таким образом, главной функцией ЭРО является исправление часто возникающих повреждений оснований нуклеотидов, как правило не нарушающих спиральную структуру ДНК и не затрагивающих целостность сахарофосфатного остова [90].

В целом путь ЭРО состоит из пяти стадий (рисунок 2), начинается с распознавания повреждённых нуклеотидов ДНК-гликозилазами и последующего их удаления, ведущего к образованию АП-сайта [83,91]. В ДНК АП-сайт может находиться в двух разных формах – в виде полуацетала и в виде альдегида с разомкнутым циклом (рисунок 3). Некоторые ДНК-гликозилазы также способны образовать с альдегидной формой основание Шиффа и катализировать расщепление ДНК, содержащей АП-сайт, по механизму β -элиминирования. Однако ключевым ферментом, отвечающим за расщепление ДНК содержащей АП-сайт, является АП-эндонуклеаза, которая катализирует гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АП-сайта, образуя разрыв с 3'-гидроксильным концом с одной стороны и 5'-дезоксирiboфосфатом с другой [92]. На этом этапе начинает работу ДНК-полимераза β , δ или ϵ , которая присоединяет нуклеотид по принципу комплементарности к неповреждённой цепи ДНК.

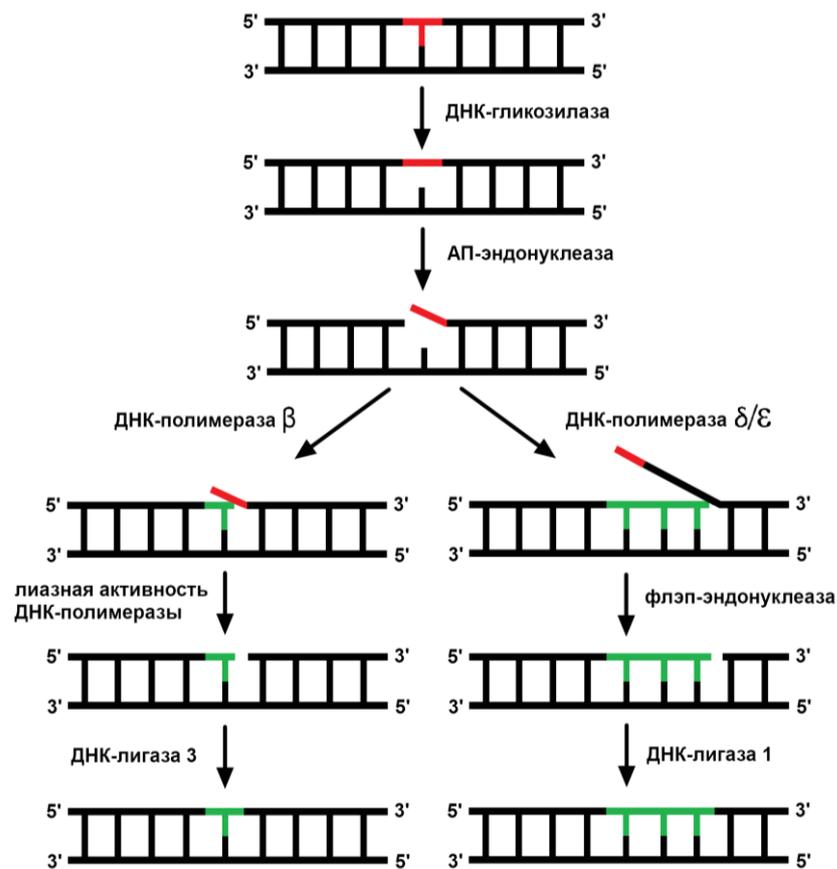


Рисунок 2. Схематическое представление процесса ЭРО. Красным отмечены нуклеотид с повреждённым основанием и АП-сайт, образующийся после действия ДНК-гликозилазы. Зелёным отмечены нуклеотиды, встроенные ДНК-полимеразами.

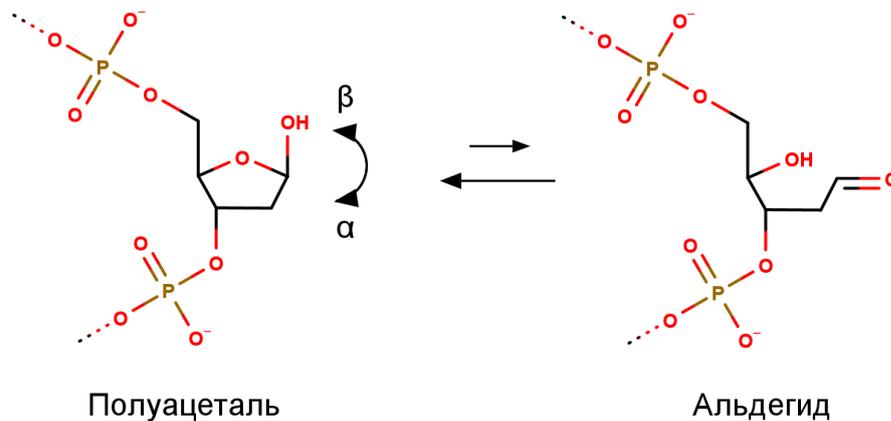


Рисунок 3. Формы АП-сайта, в которых он пребывает в растворе. Полуацетальная форма сильно преобладает над альдегидной: 99% и 1% соответственно [93]. При этом возможен переход полуацетала между α - и β -аномерами.

ДНК-полимераза β ($\text{Pol}\beta$) может вставить только один нуклеотид, одновременно удалив dRp за счёт своей dRp -лиазной активности. Такой путь называется короткозаплаточной ЭРО, и в нём участвует только $\text{Pol}\beta$ [89]. $\text{Pol}\beta$ может встроить первый

нуклеотид и в длиннозаплаточном пути, но последующий синтез с вытеснением цепи продолжают ДНК-полимеразы δ или ϵ , дополнительно присоединяющие 2-11 нуклеотидов после повреждённого [94,95]. В этот путь вовлечены также репликационный фактор C, ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) [96], и флэп-эндонуклеаза 1 (FEN1), отщепляющая вытесненный олигонуклеотид [97]. Образовавшийся после действия ДНК-полимераз одноцепочечный разрыв восстанавливается ДНК-лигазой 1 или 3 (рисунок 2) [83].

1.4.1. Эукариотические ДНК-гликозилазы

ДНК-гликозилазы представляют собой группу высококонсервативных белков репарации, отвечающих за распознавание повреждений оснований ДНК и запуск пути ЭРО. Геномы человека, дрожжей, плодовой мушки и нематоды несут в себе разное количество генов гликозилаз: 11, 5, 6 и 2 соответственно [98–100]; и по всей видимости все они имеют общее происхождение. Некоторые ДНК-гликозилазы высокоспецифичны, в то время как другие имеют широкую и даже перекрывающуюся субстратную специфичность. Кроме того, ДНК-гликозилазы делят на две категории: 1) монофункциональные, катализирующие расщепление *N*-гликозидной связи и формирующие АП-сайт в ДНК и 2) бифункциональные, которые дополнительно к гидролизу *N*-гликозидной связи с повреждённым основанием расщепляют дезоксирибофосфатный остов с помощью своей лиазной активности [101].

Лиазная активность бифункциональных ДНК-гликозилаз протекает по механизму β -элиминирования за счёт присутствия в активном центре фермента активированной аминогруппы в качестве нуклеофила. Эта реакция приводит к образованию одноцепочечного разрыва, содержащего 3'-альдегидную и 5'-фосфатную группу на концах, причём для дальнейшего удаления 3'-альдегидной группы всё равно требуется АП-эндонуклеаза (рисунок 2) [102]. Некоторые бифункциональные гликозилазы способны катализировать разрыв второй фосфодиэфирной связи АП-сайта (β/δ -элиминирование), образуя фосфатные группы с обеих сторон бреши [101]. В таком случае удаление 3'-фосфатной группы катализируется PNKP [102].

В зависимости от белковой структуры все ДНК-гликозилазы подразделяют на четыре суперсемейства: урацил-ДНК-гликозилазы (UDG family), спираль-шпилька-спиральные гликозилазы (HhH family), 3-метил-пуриновые (MPG family) и эндонуклеаза VIII – подобные гликозилазы (Fpg/Nei family) [101].

1.4.2. Апуриновые/апиримидиновые эндонуклеазы

Следующим шагом в пути ЭРО после действия ДНК-гликозилаз является гидролиз АП-сайта АП-эндонуклеазами (рисунок 2). АП-сайт является распространённым геномным повреждением в клетках млекопитающих, которое может образовываться в количестве до 10 тысяч в день на одну клетку [103]. АП-сайты цитотоксичны и канцерогенны, так как ведут к ДНК-белковым сшивкам. Таким образом, для сохранения целостности генома клетки очень важно предотвращать накопление АП-сайтов.

АРЕ1 является основной АП-эндонуклеазой, обеспечивающей удаление АП-сайтов в эукариотических клетках, на неё приходится около 95% ДНК-репарационной активности [104]. АРЕ1 играет важнейшую роль в обеспечении правильного функционирования пути ЭРО и предотвращении образования канцерогенных мутаций [85]. Кроме АП-эндонуклеазной активности АРЕ1 имеет 3'-5'-экзонуклеазную активность, позволяющую ей исправлять неправильно спаренные нуклеотиды на 3'-конце цепи в одноцепочечном разрыве. Помимо АРЕ1 в клетках эукариот обнаружена вторая АП-эндонуклеаза – АРЕ2. Главным отличием этих двух ферментов является различие в эффективности их основных активностей: 3'-5'-экзонуклеазная активность АРЕ1 сильно слабее эндонуклеазной, в то время как у АРЕ2 наоборот более выражена 3'-5'-экзонуклеазная активность [103].

1.4.3. ДНК-полимеразы

После действия АП-эндонуклеазы на место повреждения приходит многофункциональный фермент ДНК-полимераза Pol β (рисунок 2) [95]. Этот фермент имеет две важные каталитические активности: dRp-лиазную, необходимую для удаления 5'-dRp-группы и формирования фосфатной группы на 5'-конце разрыва, и магний-зависимую нуклеотидилтрансферазную, позволяющую присоединить к 3'-концу цепи в месте бреши правильный нуклеотид. Как правило, за счёт своей трансферазной активности Pol β присоединяет единственный нуклеотид, необходимый для заполнения бреши, в процессе короткозаплаточной репарации. В результате заполнения бреши остаётся разрыв, который должен быть лигирован ДНК-лигазой [4].

В другом случае, когда 5'-dRp-группа не может быть удалена Pol β , присоединение нуклеотида осуществляется ДНК-полимеразами δ и ϵ , которые в сопровождении PCNA и репликационного фактора C дополнительно присоединяют от 2 до 11 новых нуклеотидов к 3'-концу цепи путём вытеснения 5'-конца с другой стороны разрыва [97]. Далее в этом пути, названном длиннозаплаточным, флэп-эндонуклеаза 1 удаляет «свисающий» 5'-конец вытесненной цепи, оставляя разрыв для лигирования [4]. Недавно был обнаружен альтернативный вариант длиннозаплаточного пути, при котором сначала геликаза RECQ1

и комплекс белков ERCC1-XPF, PARP1 и RPA удаляют 8 нуклеотидов с 3'-стороны разрыва, после чего уже ДНК-полимераза δ заполняет образовавшуюся брешь [105].

1.4.4. ДНК-лигазы

ДНК-лигазы являются «замыкающим звеном» в процессе ЭРО. Их работа заключается в соединении концов разрыва ДНК за счёт образования фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной и 5'-фосфатной группами (рисунок 2) [106]. Это та же активность, которая применяется в процессе ДНК-репликации при соединении фрагментов Оказаки. Следует отметить, что в короткозаплаточном пути участвует ДНК-лигаза 3, в то время, как при длиннозаплаточной ЭРО работу ведёт ДНК-лигаза 1 [105]. Оба фермента ассоциированы с белком XRCC1 и используют АТФ для активации 5'-фосфата [106].

Установлено, что соединение концов ДНК-лигазой 3 может происходить даже в случае вставки некомплементарного или повреждённого нуклеотида Pol β в ДНК [107]. Но если лигирование катализирует ДНК-лигаза 1, то в таком случае процесс блокируется после образования 5'-аденилированного интермедиата. Подобные 5'-АМФ с модифицированными нуклеотидами высоко токсичны, ведут к ошибкам репликации и разрывам цепей ДНК. Поэтому клетки имеют сразу несколько ферментов, удаляющих 5'-АМФ и восстанавливающих 5'-фосфатную группу в месте разрыва: FEN1 и XRCC1-APTX [107].

1.4.5. Кофакторные белки

В дополнение к описанным выше ферментам, в путь ЭРО также вовлечены белки, не принимающие прямого участия в химических реакциях. Эти молекулы относят к вспомогательным факторам, дающим возможность модулировать процессы ЭРО. Кофакторные белки стабилизируют цепи ДНК во время репарации, хотя точный механизм до сих пор не установлен. Известными вспомогательными факторами эукариот являются PARP1 и XRCC1, которые участвуют в различных клеточных процессах, включая генную регуляцию и транскрипцию, репарацию, передачу сигнала и апоптоз [108]. Они могут изменять активность различных белков репарации, таких как APE1, Pol β , сиртуин 1 и ДНК-лигаза 1, за счёт белок-белковых взаимодействий [109]. Примечательно, что участие этих кофакторов высокоспецифично. Так, например, репарация пиримидиновых повреждений требует наличия XRCC1, но не требует наличия PARP [109].

Кроме того, считается, что при переходе от одной стадии ЭРО к другой ферменты не просто сменяют друг друга на месте повреждения, а именно «передают» ДНК-дуплекс

следующему участнику, из-за чего данный механизм и был назван «передача эстафетной палочки» [110]. Этот механизм возможен за счёт координации участников процесса за счёт специфических белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий, позволяющих регулировать процесс переноса повреждённой ДНК, а также защищающих промежуточные интермедиаты реакции от взаимодействия с другими ферментами.

1.4.6. ЭРО и заболевания

Нарушения в регуляции систем репарации ДНК и в активности самих участников ведут к геномной нестабильности и далее – к различным заболеваниям. Некоторые полиморфизмы генов ферментов ЭРО, а также повреждения вследствие окислительного стресса связаны с развитием многих патологий, включая нейропатогенез (болезни Паркинсона, Хантингтона и Альцгеймера) [111].

Например, недостаточная активность OGG1, NEIL1-3, APE1, APE2, MDB4 и MUTYH ведёт к развитию нейродегенеративных процессов, старению, депрессии, а также к различным видам опухолей, включая кишечные, желудочные, печёночные, почечные, лёгочные и др. [112,113]. У пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается низкий уровень UNG, OGG1, MUTYH, FEN1, PARP1 и XRCC1 при повышенном накоплении 8-оксогуанинов в геноме [114,115].

С другой стороны, в клетках, уже ставших опухолевыми, наблюдается наоборот повышенная экспрессия генов белков репарации, что делает эти клетки устойчивыми к химиотерапии [116]. Например, уровни белка PARP1 повышены при некоторых патофизиологических условиях, таких как онкология и воспаление [117].

APE1 также играет важную роль в предотвращении развития опухолей за счёт регуляции ответа на окислительный стресс и генов, обуславливающих устойчивость к химиотерапии [85]. Например, с мутациями в гене APE1 и некоторых других белков (APE2, Pol β , XRCC1 и PARP1) связано развитие рака молочной железы [112,113]. Ненормальное цитоплазматическое расположение APE1 и её важного партнёра NPM1 связано с развитием и устойчивостью серозного рака яичника [118].

Таким образом, ферменты пути ЭРО выполняют важнейшие функции в клетках и в организме в целом. Метаболические отклонения, связанные с репарационными системами, и ведущие к различным заболеваниям, могут быть вызваны как неправильным уровнем экспрессии соответствующих генов, так и мутациями генов репарационных ферментов. Во втором случае важно понимать структурные особенности данных ферментов и их взаимосвязь с активностью. Ферменты как сами по себе могут выполнять несколько важных функций, так и иметь важные взаимодействия с многочисленными белками-

партнёрами. Любой из этих процессов может быть нарушен мутациями, ведущими к структурным изменениям. Поэтому определение этих изменений, механизмов активности ферментов и, самое главное, их взаимосвязи являются важными задачами при исследовании репарационных ферментов и при разработке подходов и методов лечения, позволяющих побороть вредные для клеток последствия отклонений в путях репарации.

1.5. Инженерия ферментов репарации, узнающих повреждённые основания ДНК

Ферменты, участвующие в ЭРО – ДНК-гликозилазы, АП-эндонуклеазы, ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы – могут быть применены в научных исследованиях и в биотехнологии. Полимеразы и лигазы – наиболее используемые ферменты в молекулярно-биологических методиках и приложениях. Они нужны по своему прямому назначению – для матричного синтеза нуклеиновых кислот и соединения нескольких молекул ДНК в одну цепь соответственно. Однако, следует отметить, что для озвученных задач в биотехнологии в основном используются ферменты, изначально участвующие в клетке в процессах, не связанных с репарацией. Используемые ферменты отличаются лучшей процессивностью [119] (полимеразы Taq, Pfu и др.), особыми температурными оптимумами (например, полимеразы Bst, используемая в ПЦР с постоянной температурой) [119], возможностью работать с необычными субстратами (Pol 5D4, Kod RI и прочие полимеразы, работающие с неприродными нуклеотидами) [119,120] и др.

Гликозилазы и АП-эндонуклеазы в свою очередь специфичны именно для ЭРО. Их способность узнавать малые (отличия по нескольким атомам) повреждения нуклеотидов, гидролизовать *N*-гликозидную связь и/или разрывать цепь ДНК возле повреждения свойственна только этим ферментам [101]. Так как ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы в качестве результата своей деятельности способны генерировать в ДНК АП-сайт и одноцепочечный разрыв в месте повреждения, то в случаях, когда применяются эти ферменты, пользуются именно этими качествами. Например, образование АП-сайта в ДНК ограничивает возможности её использования для ПЦР. Этот факт может быть использован для выявления ДНК с определёнными повреждениями или некомплементарными парами оснований [121,122]. В других случаях нужно разорвать цепь ДНК возле повреждения либо в определённом месте, не содержащем никакой известной рестрикционной последовательности, например, для получения липких концов с уникальной последовательностью [123].

Описанные выше приложения практического использования требуют от ферментов определённой специфичности в отношении субстрата. Специфичность может требоваться как «широкая», так и «узкая». Причём полезно иметь набор ферментов для обоих случаев.

На данный момент известно несколько десятков гликозилаз и АП-эндонуклеаз с различным спектром субстратной специфичности [101,124]. Тем не менее такого набора всё ещё не хватает для покрытия всех случаев повреждений или комбинаций повреждение-комплементарный нуклеотид, с которыми может быть полезно работать.

Поэтому при инженерии ферментов, узнающих повреждения, в первую очередь пытаются изменить их специфичность. Другими важными задачами являются изменение типа активности, например, с монофункциональной до бифункциональной (и наоборот) в случае ДНК-гликозилаз, ускорение работы фермента, увеличение термостабильности или устойчивости к ингибиторам и т.д.

ДНК-гликозилазы – это ферменты, которые в первую очередь опознают повреждённый нуклеотид. Но зачастую, чтобы «понять», что нуклеотид повреждён (например, в случае некомплементарных пар), ферменту нужно «обращать внимание» на противоположный нуклеотид. Поэтому некоторые гликозилазы проявляют специфичность не только к повреждению, а к паре повреждение/нуклеотид в комплементарной цепи. И ту, и другую специфичности можно менять.

Урацил-ДНК-гликозилаза (UDG) – фермент, гидролизующий *N*-гликозидную связь 2'-дезоксинуридина в составе как одноцепочечной, так и двухцепочечной ДНК вне зависимости от противоположного урацилу основания [125]. На основе структурных данных, полученных для UDG человека, было выяснено, что специфичность к урацилу определяют два остатка в урацил-связывающем центре – Asn204 и Tyr147 [126] (рисунок 4). Боковая цепь аспарагина образует сразу две водородные связи с урацилом: с атомами O4 и N3. А ароматическое кольцо тирозина находится параллельно плоскости урацила. Было высказано предположение, что если заменить аспарагин на такой остаток, боковая цепь которого может образовывать водородную связь с аминогруппой цитозина, например, аспарат, то UDG сможет гидролизовать *N*-гликозидную связь 2'-дезоксцитидина [127]. Чтобы получить фермент, активный относительно тимидина, та же группа авторов предложила вторую замену, Tyr147Ala, основанную на предположении о том, что боковая цепь тирозина не даёт выворачиваться пиримидинам, метилированным по атому C5, именно из-за своих [тирозина] размеров и плоской структуры.

Анализ активности рекомбинантных препаратов выявил, что мутантная форма UDG Asn204Asp проявляла активность в отношении 2'-дезоксцитидина, а UDG Tyr147Ala/Ser/Cys могла гидролизовать *N*-гликозидную связь с тиминном. При этом, обе мутантные формы проявляли активность даже на комплементарных парах Ц-Г и Т-А соответственно.

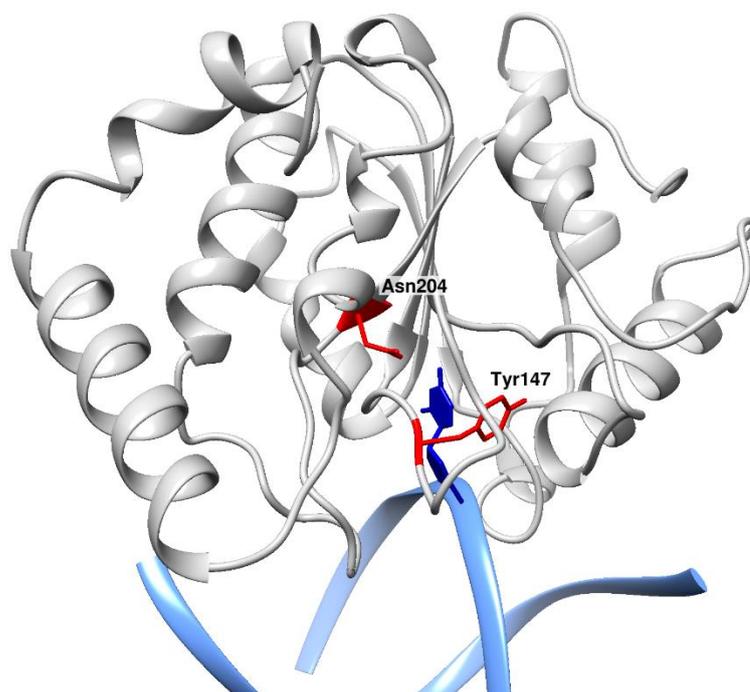


Рисунок 4. Кристаллическая структура комплекса UDG человека с ДНК, содержащей дезоксиуридин (PDB ID 1EMH). Tyr147 и Asn204 – остатки, определяющие специфичность к урацилу (выделен тёмно-синим).

Интересно, что полученная таким образом из UDG цитозин-ДНК-гликозилаза Asn204Asp могла «различать» метилированный и неметилированный цитозины по тем же причинам, по которым она распознавала тимин. А комбинация двух замен убирала эту способность [128].

С другой стороны, оказалось возможным сузить специфичность UDG до случаев только некомплементарных пар. В данном случае, нужно осуществить замену остатка Leu281 UDG, боковая цепь которого «помогает» выворачиваться урацилу из ДНК за счёт выталкивания объёмным боковым радикалом Leu281 [129]. Было показано, что замена Leu281Ala приводит к потере способности фермента гидролизовать *N*-гликозидную связь с 2'-дезоксиурацилом в парах У-А, но лишь немного снижает активность на парах У-Г.

Использование UDG в исследованиях несколько осложняется относительно быстрым ингибированием этого фермента продуктом своей реакции. Структурный анализ показал, что урацил в активном центре стабилизируется за счёт взаимодействия с Phe167, образующим одну из границ активного центра [130]. Авторы предположили, что если на место Tyr147, который тоже образует одну из границ активного центра, поставить остаток с большей боковой цепью, то размеры активного центра изменятся таким образом, что урацил будет уже не так хорошо взаимодействовать с Phe167 [130]. Предположение было проверено с помощью компьютерного моделирования и реальными испытаниями

мутантной формы Tyr147Trp. Было показано, что полученный фермент не ингибируется ДНК-субстратом, содержащим 2'-дезоксуурацил даже в концентрациях нескольких миллимолей на литр.

В работе, где исследовалась урацил-ДНК-гликозилаза MUG из *E. coli*, относящаяся к другому подсемейству суперсемейства UDG, был найден другой способ повышения субстратной специфичности [131]. В данном случае исследователи шли от обратного, так как MUG дикого типа не работает на парах У-А. Структурный анализ по гомологии позволил выявить важную аминокислотную замену относительно UDG, которая могла проявлять такое действие на специфичность – Lys68, аналог Asn204. Молекулярное моделирование показало, что боковая цепь Lys68 является уже слишком большой и препятствует выворачиванию 2'-дезоксуурацила в активный центр. Это влияние особенно значимо именно для комплементарной пары. Было показано, что замена Lys68Asn восстанавливает полную активность и в целом ускоряет работу фермента [131].

Кроме того, было показано, что замены, изменяющие специфичность по отношению к повреждению и по отношению к противоположному основанию, могут дополнять друг друга [132]. То есть возможно создание подобных не только урацил-ДНК-гликозилаз, но и тимин- и цитозин-ДНК-гликозилаз.

Та же группа исследователей в последующих работах предложила систему, которая позволяет быстро и специфично удалять определённые пиримидиновые основания в цепи ДНК [132,133]. Специфичность обеспечивалась описанными ранее заменами остатков, а ускорение реакции – вставкой в противоположную цепь не просто некомплементарного основания, а неприродного нуклеотида больших размеров, например, пирена, который выталкивает противоположное основание из ДНК-дуплекса, без действия фермента.

В одной из работ с тимин-ДНК-гликозилазой исследователи также пытались найти способы ускорения работы фермента [134]. С помощью структурного анализа активного центра TDG были выявлены два аминокислотных остатка, потенциально мешающих выворачиванию и расположению тимина в активном центре – Ala145, располагающийся на пути выворачивания основания, и His151, находящийся в глубине активного центра (АЦ). Авторы работы провели моделирование траектории выворачивания нуклеотида в активный центр методом молекулярной динамики для фермента дикого типа и для мутантной формы Ala145Gly. Результаты моделирования подтверждали предположение: фермент с указанной заменой заметно легче выворачивает нуклеотид и лучше удерживает его основание внутри АЦ. Ферменты с заменами His151 не моделировали, но было выдвинуто предположение о том, что боковая цепь гистидина внутри активного центра не только сокращает доступное основанию пространство, но также и электростатически

отталкивает O4 тимина, имеющий частичный отрицательный заряд, образующийся во время реакции.

Экспериментально были проверены TDG с двумя заменами – Ala145Gly и His151Gln. Оба мутантных фермента работали быстрее фермента дикого типа в 6-13 раз. Двойная же замена ускоряла работу в 56 раз. Побочным эффектом являлось появление активности на нормальных T-A парах, что должно приводить к появлению цитотоксического эффекта. Авторы сделали предположение о том, что именно поэтому такие замены эволюционно невыгодны, хотя и улучшают активность.

TDG может распознавать и удалять ряд повреждённых азотистых основания, а именно 5-гидроксиметилурацил, 5-формилцитозин и 5-карбокситозин (5каЦ). Авторы одной из работ попытались сузить специфичность этого фермента [135]. Как и в других случаях, в первую очередь были исследованы структуры комплексов TDG с повреждениями, в том числе с 5каЦ. Анализ показал, что с карбоксильной группировкой специфически взаимодействует остаток Asn157, образуя слабую водородную связь. При этом Asn157 взаимодействует с 5'-фосфатной группой любого повреждённого нуклеотида, включая 5каЦ.

По предположению авторов замена Asn157 должна влиять на активность фермента на любых субстратах. Однако, было показано [135], что замена Asn157Ala ухудшала активность фермента на всех субстратах, кроме 5каЦ. Учитывая приобретённую выраженную обратно пропорциональную зависимость активности от pH, авторы предположили, что Asp157 даёт такой эффект именно из-за своей способности быть протонированным. Другой полезной особенностью оказалась неизменная высокая избирательность мутантного фермента при высоких концентрациях ДНК, содержащей различные повреждения.

Другим интересным ферментом с необычной специфичностью является алкиладенин-ДНК-гликозилаза AAG. Основными субстратами AAG являются 3-метиладенин, 7-метилгуанин, 1,N6-этенoadенин, N2,3-этенoгуанин и гипоксантин [136]. Необычность специфичности заключается в том, что лучшими субстратами для AAG являются гипоксантин и 1,N6-этенoadенин. При этом AAG практически не способна гидролизовать N-гликозидную связь 2'-дезоксигуанозина, хотя способна работать на более громоздких повреждениях типа 7-метилгуанина.

Группа исследователей [137] решила проверить гипотезу о зависимости от соответствия формы основания форме активного центра. На основе структурного анализа комплекса AAG с ДНК-субстратом, содержащим 1,N6-этенoadенин, было установлено, что атом C2 аденина близко расположен к боковой цепи остатка Asn169. Из рассмотрения

модели комплекса ААГ с ДНК, содержащей 2'-дезоксигуанозин становится ясным, что аминогруппа гуанина стерически конфликтует с Asn169. При этом в моделях комплексов с другими аминокислотными остатками, например, с серином, таких проблем не наблюдалось. На следующем этапе был проведен экспериментальный анализ свойств мутантных форм ААГ по Asn169. Полученные данные показали, что замены Asn169Ser и Asn169Ala не только приводят к увеличению в 1,5-3,0 раза активности фермента по отношению к 1,N6-этенoadенину и гипоксантину, но и появлению способности гидролизовать *N*-гликозидную связь с неповреждённым 2'-дезоксигуанозином в некоплементарных парах. Этот результат говорит о том, что специфичность ААГ отчасти действительно обусловлена формой кармана активного центра. Но способность ААГ дикого типа узнавать в качестве субстрата 7-метилгауинин и неспособность Asn169Ser/Ala ААГ работать с комплементарными парами указывает на наличие дополнительных механизмов специфичности, действующих как в начале выворачивания нуклеотида, так и на этапе его подстройки в кармане активного центра.

На примере гликозилазы NEIL1 было показано, что специфичность можно менять и за счёт замен аминокислотных остатков, участвующих в каталитической стадии. NEIL1 обладает достаточно широкой субстратной специфичностью, отщепляя различные окисленные и восстановленные производные как пуриновых, так и пиримидиновых оснований.

В работе [138] установлено, что в клетках могут находиться две формы фермента NEIL1, образованные из разных мРНК, одна из которых содержит в положении 242 остаток лизина, а вторая - остаток аргинина. Было показано, что эта замена Lys242Arg меняет субстратную специфичность фермента, а именно приводит к снижению в 30 раз активности в отношении тимингликоля и повышению активности в 3 раза по отношению к производным пуриновых оснований.

Пользуясь структурными данными и данными моделирования, авторы другой работы показали, что боковая цепь остатка, расположенного в 242-ом положении NEIL1, взаимодействует с повреждёнными основаниями [139]. Причём функция остатка заключается в протонировании основания в процессе каталитической реакции. Оказалось, что от размера повреждения зависит эффективность такого протонирования. Лизин в данном месте способен взаимодействовать с тимингликолем, но не «дотягивается» до нужного положения в случае пуриновых азотистых оснований. В тоже время, наоборот, остаток Arg242, стерически ограничен при взаимодействии с тимингликолем, при этом размер бокового радикала позволяет эффективно протонировать пуриновые нуклеотиды.

Данные результаты могут в будущем быть полезны при создании мутантных форм NEIL1 с изменённой субстратной специфичностью.

Наконец, хорошим примером рационального редизайна является работа по преобразованию UDG из монофункциональной гликозилазы в бифункциональную [140]. Авторы данной работы охарактеризовали урацил-ДНК-гликозилазу из нового на тот момент подсемейства ДНК-гликозилаз. Этот фермент был выделен из организма *Methanococcus jannaschii* и имел отдалённое сходство с эндонуклеазой III и подобными ей ДНК-гликозилазами. При этом *Mj*UDG проявляла монофункциональную активность приводя к формированию АП-сайтов в ДНК, в то время как ДНК-гликозилазы семейства ЭндоIII бифункциональны и после образования АП-сайта создают разрыв в цепи ДНК.

Известно, что бифункциональность ДНК-гликозилазам семейства ЭндоIII придаёт остаток лизина в активном центре. Биоинформатический анализ последовательностей различных ДНК-гликозилаз показал, что у *Mj*UDG в активном центре нет лизина, а на предположительно аналогичном месте находится Glu132. Экспериментальный анализ мутантной формы *Mj*UDG Glu132Lys подтвердил наличие не только гликозилазной, но и появления АП-лиазной активности по механизму β -элиминирования. Таким же образом в другой работе удалось превратить ДНК-гликозилазу MutY в бифункциональную с помощью замены Ser120Lys [141].

Интересным случаем превращения бифункциональной ДНК-гликозилазы в монофункциональную является работа с hOGG1 [142]. Как оказалось, при исследовании остаток Lys249, отвечающий за лиазную реакцию, ответственен и за распознавание повреждённого нуклеотида, из-за чего замена лизина ведёт к полной инактивации фермента. Решением оказалось создание двойной мутантной формы – Lys249Cys/Cys253Lys, которая всё ещё может распознавать повреждённый нуклеотид, но не способна осуществлять лиазную реакцию.

Таким образом, комбинация структурного анализа и компьютерного моделирования может приносить важные и интересные результаты в том числе при работах с ферментами, узнающими повреждения в ДНК. Кроме того, эти методы позволяют направленно изменять свойства данных ферментов: изменять скорость работы, специфичность и даже механизм каталитической активности.

1.6. Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза APE1

АП-эндонуклеаза 1 человека (hAPE1) – это фермент с молекулярной массой около 36 кДа, который впервые был выделен из клеточной линии HeLa ещё в 1970-ых годах. Из последующих исследований выяснилось, что этот фермент требует наличия ионов Mg^{2+}

для осуществления каталитической реакции [143,144], а оптимальный для АП-эндонуклеазной активности рН находится в промежутке от 7,6 до 7,9 [5,145,146]. Исследования предстационарной кинетики показали, что реакция расщепления фосфодиэфирной связи возле АП-сайта протекает очень быстро, а скорость-лимитирующей стадией является диссоциация продукта [147]. Предполагается, что необходимость быстрого катализа обусловлена большим количеством АП-сайтов, которые нужно как можно быстрее исправить, а медленная диссоциация продукта даёт больше времени для «прибытия» следующего фермента на место повреждения пока ещё hAPE1 связана с ДНК, что снижает вероятность нежелательных цитотоксических реакций промежуточного продукта с окружением.

С помощью методов рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза удалось установить, что hAPE1 состоит из жёсткого глобулярного каталитического домена, отвечающего за осуществление эндонуклеазной активности и располагающегося с С-конца, и гибкого неструктурированного N-концевого фрагмента [148]. Установлено, что N-концевой участок отвечает за способность проявлять окислительно-восстановительную активность (ОВ-активность) и важен для белок-белковых взаимодействий. Кроме того, показано, что связывание с ДНК происходит только за счёт С-концевого домена. Структура нуклеазного домена hAPE1 позволяет отнести фермент к структурному суперсемейству фосфоэстераз, содержащих общий четырёхслойный α/β -сэндвич в качестве ядра и несколько изменчивых петлевых районов и карман активного центра. Этот домен напрямую связывается с ДНК и скользит вдоль цепи в поисках АП-сайта преимущественно благодаря взаимодействиям с сахарофосфатным остовом ДНК [149].

Первые кристаллические структуры hAPE1, связанной с ДНК, дали возможность выяснить, что АП-сайт вывернут из спирали ДНК и располагается полностью внутри активного центра, стабилизированный четырьмя белковыми петлями, в то время как противоположное основание остаётся свободным (рисунок 5) [150,151]. Считается, что вывернутое состояние поддерживается за счёт двух петель, расположенных по одной в большой и малой бороздках. А другие две петли, располагающиеся с 5'- и 3'-сторон от повреждения, фиксируют белок на ДНК-дуплексе.

Полученные позже кристаллические структуры hAPE1 высокого разрешения не только раскрыли более точное положение отдельных частей белка, но и позволили предложить возможные механизмы каталитической реакции [148,152–155]. На основании анализа структурных данных установлено, что в активном центре фермента располагается один ион Mg^{2+} , координированный остатками Asp70, Glu96 и Asp308 [155]. Кроме того, в

активном центре расположена нуклеофильная молекула воды, имеющая связи с Asp210, Asn212 и одним из атомов кислорода фосфатной группы. Было выдвинуто предположение, что во время катализа ион металла сдвигается и начинает координировать немостиновый кислород фосфата [156], которое в дальнейшем не подтвердилось. Дополнительно были обнаружены несколько новых контактов внутри активного центра, о чём будет подробно написано далее.

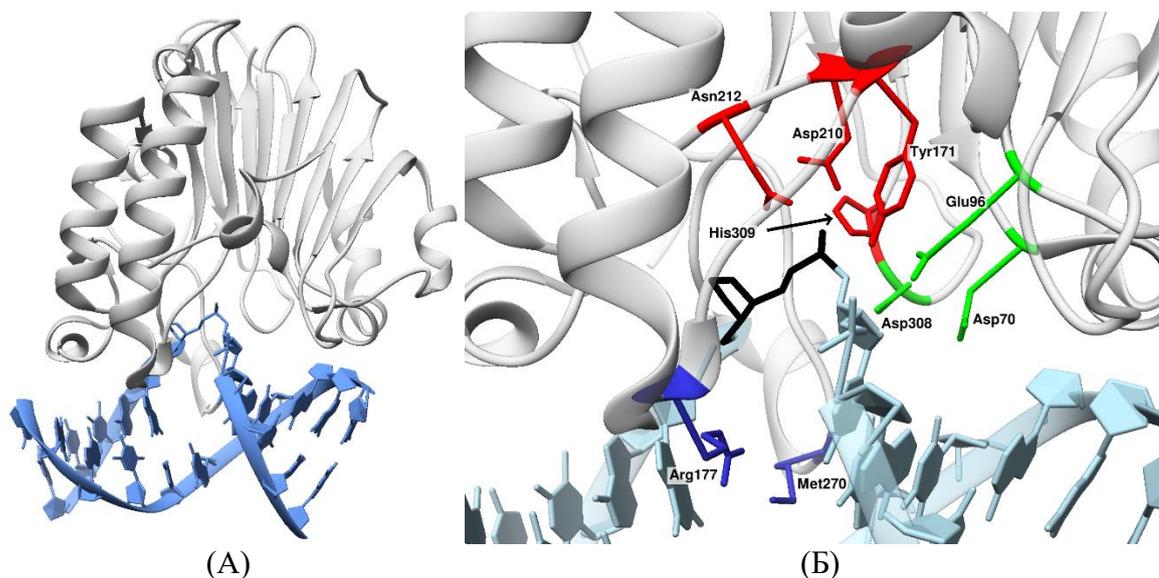


Рисунок 5. (А) Кристаллическая структура комплекса hAPE1 с ДНК, содержащей F-сайт (PDB ID 1DE8). (Б) Активный центр hAPE1 крупным планом. Чёрным цветом выделен F-сайт; красным цветом выделены остатки, непосредственно участвующие в катализируемой реакции – Tyr171, Asp210, Asn212, His309; зелёным цветом – Mg^{2+} -координирующие остатки Asp70, Glu 96 и Asp308; синим цветом выделены остатки, встраивающиеся в ДНК на место повреждения – Arg177 и Met270.

1.6.1. 3'-5'-экзонуклеазная активность APE1

Наличие 3'-5'-экзонуклеазной активности у АП-эндонуклеаз мыши и человека было обнаружено в работе Секи и др. [157]. Далее эта активность исследовалась во множестве работ [104,158–161]. Было показано, что эта активность намного более слабая, по сравнению с АП-эндонуклеазной активностью, которая считается основной. Было замечено, что удаление некомплементарных 3'-нуклеотидов или нуклеотидов с окисленными основаниями происходит более эффективно, что дало основание предполагать о возможной корректирующей активности АП-эндонуклеаз при присоединении ошибочного нуклеотида репарационными ДНК-полимеразами, не имеющими своей 3'-5'-экзонуклеазной корректирующей активности [146,162]. Однако в другой работе было показано, что удаление даже

ошибочных нуклеотидов с 3'-конца происходит со значимой скоростью только при 6-7-кратном избытке фермента, чего не может быть в условиях клетки [161].

Другой возможной биологической ролью экзонуклеазной активности АП-эндонуклеаз АРЕ1 и АРЕ2, стимулированных PCNA, является создание длинных брешей в ДНК, дуплексная 3'-сторона которой является субстратом для пути ответа на повреждение ДНК через белки ATR и Chk1 [163].

Эффективность экзонуклеазной активности зависит от условий реакции, термостабильности ДНК-дуплекса и нуклеотидного состава окружения 3'-концевого нуклеотида [146,158]. Например, было обнаружено, что оптимальной концентрацией Mg^{2+} в случае 3'-5'-экзонуклеазной активности является 0,1-2 мМ, а оптимальным рН является 6,8, что значительно ниже оптимального значения для осуществления эндонуклеазной активности [146,158]. Авторы [146] предположили, что такое различие необходимо, так как ДНК, содержащая 3'-неспаренный конец, и ДНК, содержащая АП-сайт, должны иметь немного различную форму, что достигается изменением концентрации ионов металла.

Результаты работ по исследованию специфичности экзонуклеазной активности АРЕ1 довольно противоречивы. Тем не менее, эти результаты сходятся в том, что среди некомплементарных пар наиболее быстро удаляется 3'-концевой нуклеотид из пары Т-Г [158,161]. 5'-концевая группа также влияет на эффективность экзонуклеазной реакции. В большинстве работ показано, что наиболее предпочтительной для АРЕ1 группой на 5'-конце разрыва в ДНК является гидроксильная, в то время, как зависимость эффективности от наличия на 5'-конце фосфата, F-сайта с фосфатом или F-сайта без фосфата до конца не установлена [146,158,161,164,165].

1.6.2. 3'-диэстеразная активность АРЕ1

В первых работах по исследованию АП-эндонуклеаз из мыши, быка и человека было обнаружено, что эти ферменты также имеют способность удалять различные группы с 3'-конца цепи, такие как фосфаты, фосфогликоляты и 2'-дезоксирибозные фрагменты [157,166]. Подобные 3'-блокирующие группы блокируют присоединение нового нуклеотида ДНК-полимеразой и соединение цепей ДНК ДНК-лигазой. Анализ экстрактов клеток человека показал, что функционирование hARE1 является скоростью-лимитирующей стадией в репарации разрывов цепей ДНК, вызванных пероксидом водорода и блеомицином, из-за которых и возникают дополнительные 3'-блокирующие группы [167]. В других работах было показано, что hARE1 играет важную роль и в удалении 3'-дезоксирибозных фрагментов, образующихся после реакций β -элиминирования бифункциональных ДНК-гликозилаз [168,169]. Следует отметить, что hARE1 эффективно удаляет повреждения с 3'-

конца цепи ДНК при наличии продолжающейся второй цепи и работает существенно медленнее на тупых концах дцДНК [170].

1.6.3. ИРН-активность APE1

Позже было установлено, что hAPE1 может по такому же механизму, что и в случае АП-эндонуклеазной активности, гидролизовать цепь ДНК с 5'-стороны от повреждённых нуклеотидов: ДНУ, 5,6-дигидротимидин, некоторые α -аномеры нуклеотидов и др. [6,171]. При этом эта активность, названная инцизионной репарацией нуклеотидов, не требует наличия других повреждений ДНК (АП-сайтов, 3'-концевых повреждённых нуклеотидов), являющихся субстратами APE1. Таким образом, APE1 предположительно может выступать в качестве «запасного варианта» ДНК-гликозилаз.

Было показано, что оптимальные условия для ИРН-активности отличаются от оптимума АП-эндонуклеазной активности и находятся ближе к оптимуму 3'-5'-экзонуклеазной активности, включая промежуток рН от 6,4 до 6,8 [6]. Кроме того, N-конец, который отвечает за белок-белковые взаимодействия и не влияет на АП-эндонуклеазную активность, имеет значение при осуществлении ИРН-активности [6]. Данные исследования согласуются с результатами более ранней работы, в которой была обнаружена способность hAPE1 гидролизовать ДНК возле нуклеотидов с основаниями-производными бензола [172]. Результаты молекулярного моделирования показали, что активный центр hAPE1 может в достаточной мере менять форму и подстраиваться под бензэтенцитозин, вывернутый из спирали ДНК. Структурные данные относительно ИРН-активности будут описаны более подробно в разделе 1.7.2.

Кроме того, в серии работ Сапарбаева и др. [7,173–176] было показано, что ИРН-активностью обладают многие АП-эндонуклеазы. Бактериальная Nfo и дрожжевая Ape1 обладают схожей эффективностью на α T- и α A-субстратах, при этом hAPE1 не проявляет активности на α T [173].

С целью выяснения возможной биологической роли ИРН-активности в работе [177] были изучены мутантные формы Nfo из *E. coli*, не проявляющие ИРН-активность. Полученные ферменты экспрессировали в штамме *E. coli*, лишённом систем репарации. Показано, что такие мутантные формы фермента приводили к снятию гиперчувствительности бактерий к алкилированию оснований ДНК, но не снимали чувствительность к окислительным повреждениям. Кроме того, на клеточных линиях человека была показана активность hAPE1 в отношении α A. В работе [174] показали, что ДНК, содержащую альфа-аномеры цитидина, в том числе окисленные, среди узнающих повреждения ферментов могут расщеплять только АП-эндонуклеазы. Было сделано

предположение, что биологическая роль ИРН-активности может заключаться в помощи остальным ферментам репарации в удалении летальных повреждений. Также была обнаружена активность АРЕ1 на нуклеотидах, содержащих этено-производные оснований [175] и урацил [176]. Наконец, в работе [7] был полностью воспроизведён возможный путь ИРН-репарации с участием всех необходимых ферментов и получением восстановленного неповреждённого ДНК-дуплекса, что подтверждает возможность осуществления данного пути в клетках.

1.6.4. Рибонуклеазная активность АРЕ1

Как и экзонуклеаза III *E. coli*, hARE1 проявляет рибонуклеазную и РНКазу Н-подобную активности [178]. Биологическая значимость этих типов активности также до сих пор не установлена. В настоящее время нет подтверждения того, что АРЕ1 участвует в удалении РНК-праймеров во время ДНК-репликации, как это делает РНКазу Н. Однако, было показано, что АРЕ1 способна расщеплять РНК, содержащую АП-сайты, что привело к предположению о роли АРЕ1 в деградации повреждённой матричной РНК и предотвращении ошибочной трансляции [179].

Дальнейший анализ рибонуклеазной активности hARE1 выявил способность фермента расщеплять РНК в отсутствие двухвалентных ионов металлов [180], а также способность металло-независимого расщепления ДНК, содержащей ациклическую форму АП-сайта [143]. На основе этих данных было высказано предположение, что на эффективность достижения каталитически-компетентного состояния в составе фермент-субстратного комплекса влияет структура сахарофосфатного остова, в том числе его гибкость в месте повреждения. Кроме того, было показано, что обязательным условием для металло-независимого гидролиза рибозофосфатного остова в случае РНК-субстратов является наличие 2'-гидроксильной группы. Таким образом, у АП-эндонуклеазной и рибонуклеазной активностей АРЕ1 есть как общие черты, так и ключевые различия.

1.6.5. Взаимодействие АРЕ1 с другими ферментами

Взаимодействие АРЕ1 с ферментами ЭРО, действующими в пути репарации как до неё, так и после, было показано во множестве работ. В работах по изучению взаимодействий между АРЕ1 и ДНК-гликозилазами было показано, что АРЕ1 ускоряет работу этих ферментов, а именно ускоряет их диссоциацию из комплекса с ДНК-продуктом [96,181,182]. Изначально выдвигалось две гипотезы о том, как именно могут взаимодействовать ДНК-гликозилазы и АРЕ1: одна предполагала возможность прямого белок-белкового взаимодействия [182–184], другая говорила о ДНК-опосредованном

влиянии ферментов друг на друга [181,185,186]. Последующие исследования свидетельствуют о том, что APE1 не формирует прямых прочных взаимодействий с ДНК-гликозилазами, а вытесняет их с ДНК-интермедиата, по-видимому, через опосредованное взаимодействие с молекулой ДНК [96,181]. При этом участие других ферментов довольно специфично. Например, в случае с 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой человека hOGG1 только hAPE1 может стимулировать её диссоциацию [181], в то время как AAG стимулируется как hAPE1, так и PCNA [96].

Тем не менее, прямые белок-белковые взаимодействия с hAPE1 были показаны для других ферментов ЭРО, выполняющих функции в пути после действия APE1. Взаимодействия между APE1 и Pol β , PARP1, XRCC1 и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразой 1 (TDP1) были изучены с помощью флуоресцентных подходов [187–189], которые выявили физическое взаимодействие между ферментами. Для Pol β и XRCC1 было показано стимулирование АП-эндонуклеазной реакции, при этом сродство этих ферментов выше к полноразмерной APE1, нежели чем к усечённому варианту без N-концевого неструктурированного фрагмента, что говорит о важной роли N-концевого участка в модулировании активности APE1 и белок-белковых взаимодействиях в процессе ЭРО [190].

Кроме того, было показано, что APE1 стимулирует активности Pol β , как dRp-лиазную, так и нуклеотидил-трансферазную [191,192], но в данном случае наличие N-концевого фрагмента уже не влияет на степень модулирования Pol β [190].

Несмотря на то, что основная биологическая функция APE1 применяется в процессе ЭРО, APE1 может участвовать и в других процессах, например восстанавливать транскрипционные факторы (STAT3, AP-1, p53 и NF- κ B) с помощью Cys65 или участвовать во взаимодействии с другими белками за счёт своего неструктурированного N-концевого участка [193].

Известны несколько нерепарационных белковых факторов, включая HSP70 и комплекс RAD9-RAD1-HUS1, которые могут влиять на активность APE1 и модулировать её функции [194]. Сиртуины 1 и 6 также могут регулировать активность APE1 и некоторых других ферментов ЭРО – MUTYH, OGG1, NEIL1, NEIL2 и LIG3 – через деацетилирование остатков лизина [194]. Было показано, что пероксиредоксин 1 (PRDX1), который разлагает H₂O₂ и является шапероном, защищающим другие белки от окислительной дестабилизации, может связывать APE1 и не давать ей активировать транскрипционный фактор NF- κ B, что ведёт к подавлению стимуляции экспрессии провоспалительных генов, таких как IL-8 [195]. Кроме того, тот же PRDX1 может привлекать APE1 к АП-сайтам, образованным NEIL3 в местах TTAGGG-повторов в теломерах [196].

1.7. Структурные особенности APE1

Аминокислотная последовательность hAPE1, за исключением N-концевого участка, имеет высокую гомологию с экзонуклеазой III *E. coli* (ЭкзоIII или Xth). В ранних исследованиях ЭкзоIII было установлено, что фермент, как и hAPE1, обладает широким спектром нуклеазных активностей, за исключением способности процессировать ИРН-субстраты [92]. Ортологи ЭкзоIII присутствуют во многих организмах, что подтверждает их консервативность и важность их роли.

В работах, посвящённых *C. elegans*, было обнаружено, что у этого организма также, как и у *E. coli*, присутствуют ферменты обоих семейств: APN1, имеющий 44% гомологии с эндонуклеазой IV (ЭндоIV), и EXO3, имеющий 27% гомологии с ЭкзоIII из *E. coli* [103]. EXO3, также, как и её бактериальный гомолог, не имеет ИРН-активности, при этом у APN1 эта активность сохранена [197]. Примечательно, что в отличие от большинства остальных исследованных к сегодняшнему дню организмов, выключение генов обеих этих эндонуклеаз в клетках *C. elegans* не приводит к летальному исходу при развитии [198].

Схожая ситуация с *S. cerevisiae*: у организма также есть обе эндонуклеазы – APN1 из семейства ЭндоIV и APN2 из семейства ЭкзоIII [199]. Считается, что APN1 в первую очередь ответственна за расщепление АП-сайтов, хотя у APN2 также сохраняется сильная АП-эндонуклеазная активность. Кроме того, *S. cerevisiae* является ещё одним организмом, в котором выключение обоих генов эндонуклеаз не приводит к смертности [200].

У *D. melanogaster* обнаружена только одна АП-эндонуклеаза, названная белком рекомбинационной репарации 1 (recombination repair protein 1, Rrp1). Rrp1 также является ортологом APE1, но дополнительно к эндонуклеазному домену имеет домен неизвестной структуры, необходимый для участия в рекомбинационной репарации ДНК [201].

Выше были описаны наиболее известные представители группы АП-эндонуклеаз, в том числе гомологичные ферменту APE1 человека, выполняющие важные роли в процессах репарации в клетках. Интересно, что у самих клеток человека и остальных млекопитающих есть вторая АП-эндонуклеаза APE2, гомологичная APE1 и принадлежащая семейству ЭкзоIII. Но с момента открытия APE2 было несколько раз показано, что фермент не имеет значимых АП-эндонуклеазной и 3'-эстеразной активностей [159,202]. В других работах было обнаружено, что различные клетки мышей, лишённые гена APE2, не испытывают бóльших, чем при наличии APE2, проблем при воздействии различных генотоксических агентов, включая пероксид водорода, блеомицин, рентгеновское излучение и метилметансульфонат [203,204]. Эти данные позволяют предположить, что в клетках млекопитающих ключевую роль в процессах репарации ДНК выполняет АП-эндонуклеаза APE1. С другой стороны, в работе [203] было показано, что мыши, лишённые гена APE2,

страдают задержкой развития и нарушенным кроветворением.

Первые кристаллические структуры комплекса hAPE1-ДНК, разрешённые группой Тэйнера [151], показывают, что белок имеет специальную жёсткую и положительно-заряженную поверхность для связывания ДНК и дальнейшего её изгиба с выворачиванием АП-сайта. Фиксация АП-сайта в вывернутом состоянии внутри активного центра обеспечивается боковыми цепями нескольких аминокислотных остатков, расположенных в четырёх белковых петлях ($\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha 11$, $\alpha 14$, рисунок 6).

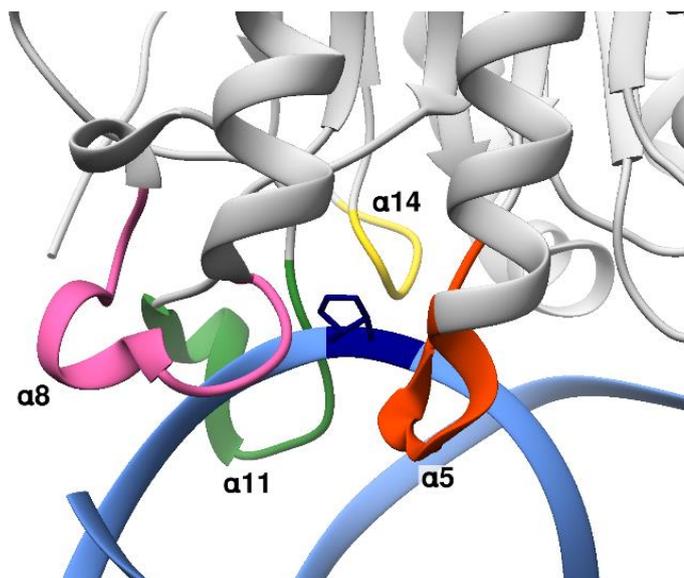


Рисунок 6. Белковые петли $\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha 11$ и $\alpha 14$, фиксирующие АП-сайт в вывернутом состоянии (PDB ID 1DE8).

Кроме того, был выяснен механизм поиска АП-сайтов в ДНК. Оказалось, что hAPE1 способен перемещаться вдоль ДНК на относительно большие расстояния, как минимум 200 нуклеотидов, без полной диссоциации с ДНК-дуплексом, и в процессе такой одномерной диффузии по цепи ДНК происходит поиск повреждённых нуклеотидов [205].

Также следует отметить, что до сих пор механизм каталитического гидролиза фосфодиэфирной связи остаётся предметом дискуссий. Тем не менее, к сегодняшнему дню удалось установить все аминокислотные остатки, отвечающие за каталитическую реакцию гидролиза фосфодиэфирной связи в ДНК, содержащей АП-сайт. Данные остатки можно разделить на две основные подгруппы: остатки, непосредственно участвующие в каталитической реакции (Tyr171, Asp210, Asn212, His309), и остатки, координирующие ион Mg^{2+} (Asp70, Glu96, Asp308, рисунок 6).

1.7.1. Активный центр hAPE1

В первой работе, посвящённой получению структуры hAPE1, группе Тэйнера удалось получить две кристаллические структуры комплекса hAPE1 с ДНК, содержащей F-сайт: структура PDB ID 1DE8 (рисунок 7) является комплексом hAPE1 с ДНК-дуплексом с нерасщеплённой цепью, а структура PDB ID 1DE9 является комплексом с продуктом, в котором повреждённая цепь имеет разрыв с 5'-стороны от F-сайта [151]. Причём ион металла Mn^{2+} был только в структуре с продуктом, так как получить комплекс и с целой ДНК, и с ионом металла-кофактора оказалось невозможным из-за слишком быстрого протекания расщепления ДНК. Как позже стало известно [148], наличие иона металла не меняет принципиально конфигурацию АП-сайта и остатков активного центра, поэтому полученной структуры с субстратом достаточно для понимания тонкой структуры комплекса.

Анализ данных структур позволяет выделить четыре остатка, непосредственно контактирующих с АП-сайтом за счёт водородных связей: Asn174, Tyr171, Asn212 и His309 (рисунок 7). Причём все четыре остатка закономерно связываются именно с атомами фосфатной группы повреждённого нуклеотида, хотя Asn174 имеет связь и с атомом $O4'$. Рассматривая далее окружение АП-сайта, можно увидеть ещё три аминокислотных остатка, боковые цепи которых располагаются очень близко к повреждению: Phe266, Trp280 и Leu282. Их боковые цепи образуют гидрофобный карман для гидрофобной части АП-сайта, за счёт чего по всей видимости увеличивается сродство АП-сайта с активным центром и облегчается выворачивание первого. Тем не менее, наличие триптофана в АЦ обязательно, о чём будет подробнее написано далее.

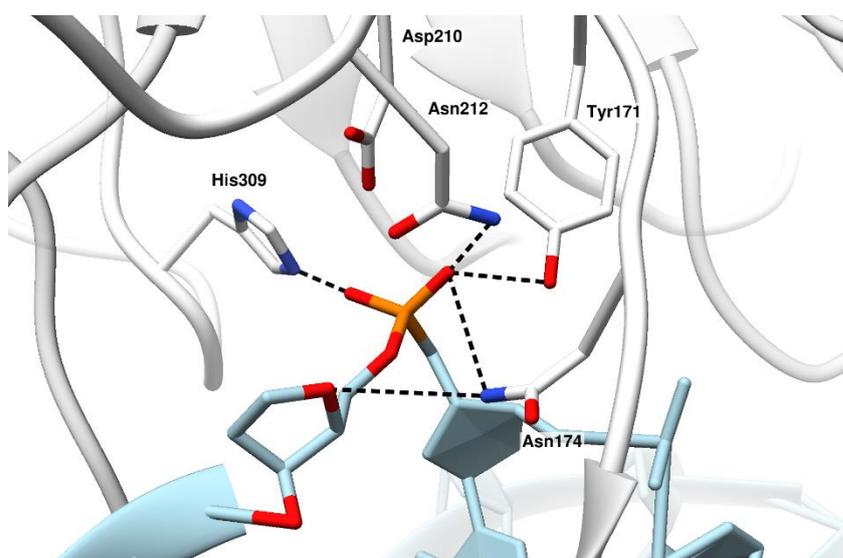


Рисунок 7. Структура АЦ hAPE1 (PDB ID 1DE8) [151]. Чёрными пунктирными линиями обозначены водородные связи, образуемые между аминокислотными остатками фермента и F-сайтом.

После сравнения структур APE1 с продуктом расщепления АП-сайта (PDB ID 1DE9 [151], PDB ID 4IEM [155]) между собой и со структурами с нерасщеплённым ДНК-субстратом (PDB ID 1DE8 [151]), можно заключить, что ион-координирующими остатками являются Asp70, Glu96, Asp308, причём их взаимное расположение не зависит от природы дивалентного иона, закристаллизованного в активном центре рассматриваемых структур. Кроме того, неизменность положения этой триады между структурами с субстратом и с продуктом реакции наталкивает на мысль о том, что и ион металла не меняет своего положения во время катализа. Но последнее утверждение несомненно требует доказательств, и поэтому неоднократно оспаривалось. Причём оспаривалось также и утверждение о необходимости только одного иона металла. Тем не менее, последние исследования показывают, что APE1 является ферментом, зависимым от единственного иона Mg^{2+} [206,207].

Роль отдельных аминокислотных остатков в катализе исследовали в ряде работ [143,148,152,155,156,178,206,208–213]. Методами мутационного анализа и кристаллографии была изучена функциональная роль большого числа аминокислотных остатков активного центра, среди которых Tyr171, Asp210, Asn212, His309, Asp70, Glu96 и Asp308.

Так, на основе анализа кристаллических структур и данных мутационного анализа, остаток Tyr171 изначально рассматривался как инициатор нуклеофильной атаки фосфоэфирной связи [208]. В данной работе авторы показали, что активность фермента значительно увеличивается при добавлении имидазола в раствор. Известно, что имидазол увеличивает долю фенолятной формы остатков тирозина, что по предположению должно положительно сказываться на суммарной эффективности нуклеофильного катализа. С другой стороны, в той же работе сразу были высказаны и контраргументы. Во-первых, имидазол может действовать и на другие остатки активного центра. Во-вторых, была непонятна закономерность влияния концентрации имидазола на активность мутантных форм Tyr171Ala и Tyr171Phe, где в первом случае активность умеренно увеличивалась, а во втором – не менялась. В-третьих, ковалентное связывание боковых цепей аминокислотных остатков с ДНК – редкость, свойственная только топоизомеразам [214].

Отрицательное влияние замены Tyr171Phe на скорость каталитической реакции также было показано в работе [152]. Кроме того, было установлено влияние замены

Tyr171His на ферментативную активность и показано, что данная замена, приводила к ещё большему снижению эффективности катализа, чем в случае замены Tyr171Phe [156]. Полученная совокупность данных указывает на то, что Tyr171 не является донором протона в процессе каталитической реакции и выдвинуто предположение о том, что Tyr171 в первую очередь важен для координации субстрата в активном центре.

Остатку Asp210 в первых работах [143,151] была приписана роль «нейтрализатора» заряда на уходящей группе. Действительно, карбоксильная группа расположена достаточно близко к фосфату повреждённого нуклеотида и может быть донором протона. Это предположение также проверялось в ранних работах [155] и поначалу не было опровергнуто. Оказалось, что при заменах Asp210Ala, Asp210Asn или Asp210His активность сохраняет лишь последний из трёх мутантных ферментов. К сожалению, этой группе исследователей не удалось определить активность фермента при повышенных рН (> 8,0), чтобы проверить гипотезу о роли остатка Asp210 как донора протона, из-за сильного снижения стабильности комплекса АРЕ1-ДНК в таких условиях.

Замена Asp210Asn имеет наибольший эффект на скорость реакции, снижая активность в 10000 раз. Поэтому ведущей гипотетической ролью Asp210 является активация нуклеофильной воды [152,209], которая при этом не противоречит наличию активности у мутантной формы, содержащей замену Asp210His. В дополнение к этому было показано, что замена Asn212Ala снижает активность в 7000 раз, из чего был сделан вывод о том, что Asn212 помогает Asp210 и нуклеофильной молекуле воды занимать необходимые для прохождения реакции положения [215].

В альтернативном механизме, предложенном в работе [152], роль активатора нуклеофила приписывалась остатку His309. Однако сильным контраргументом такого механизма являются данные ЯМР, которые показали, что остаток His309 в фермент-субстратном комплексе находится в протонированной форме [216,217], и поэтому не может служить основанием.

Выяснение важности металл-координирующих остатков было осложнено отсутствием кристаллических структур для активной формы АРЕ1 в присутствии субстрата и ионов магния. В наличии имеются только структуры апофермента [206], комплексов с продуктом [148,151,155] и марганец-содержащих комплексов с фосфоротиоатными аналогами ДНК [148].

В Mg²⁺-содержащем комплексе ион металла имеет октаэдрическую координационную сферу (PDB ID 4IEM [155]). Mg²⁺ напрямую взаимодействует с тремя молекулами воды, две из которых координируются Asp308, с карбоксильной боковой цепью Glu96 и 3'-ОН и с 5'-dRp концами разрезанной цепи ДНК. С другой стороны, в комплексе с Mn²⁺ и

серосодержащей ДНК ион металла не взаимодействует с ДНК, зато появляется связь с Asp70 [148]. Подобная конфигурация наблюдается и в случае свободного фермента (PDB ID 4QHE [206]).

Важность Glu96 подтверждается результатами мутагенеза: замены Glu96 снижают АП-эндонуклеазную активность в 600 раз [143,210], замены Asp70 – в 25 раз [143], замены Asp308 – в 5 раз [211]. Отмечается также влияние и непрямых контактов между различными частями комплекса. Замена Lys98, взаимодействующего через молекулы воды с Glu96 и с Asp70, на аланин ведёт к изменению констант связывания АРЕ1 с ДНК. Интересно отметить, что в случае F-субстрата повышается константа ассоциации первичного фермент-субстратного комплекса, но снижается равновесная константа, характеризующая образование каталитически компетентного комплекса, в то время как на АП-субстрате, наоборот, стабильность каталитического комплекса повышается [212]. Кроме того, замена Lys98Ala на порядок снижает каталитическую константу в случае F-субстрата.

1.7.2. Аминокислотные остатки, влияющие на субстратную специфичность hAPE1

Как уже говорилось, одну из сторон кармана активного центра АРЕ1 формируют гидрофобные остатки Phe266, Trp280 и Leu282. Замены ароматических боковых цепей на неароматические сильно снижают эффективность АП-эндонуклеазной реакции [159,218]. Интересно, что замена триптофана практически инактивирует фермент, в то время как замена фенилаланина более щадящая. Кроме того, примечательным фактом является практически полная работоспособность мутантного фермента, в котором триптофан и фенилаланин поменяны местами. С другой стороны, было замечено, что те же замены на остатки с меньшими боковыми цепями улучшают экзонуклеазную активность АРЕ1. Структурные исследования аминокислотных остатков, важных для экзонуклеазной активности, показывают, что наиболее вероятной причиной таких изменений является то, что полноценным нуклеотидам не требуется гидрофобность кармана активного центра, так как они не выворачиваются полностью, как это делает АП-сайт [219]. При этом полноценным нуклеотидам вполне может быть более удобно располагаться в активном центре большего размера, чем у фермента дикого типа.

Были обнаружены ещё две замены, улучшающие экзонуклеазную активность hAPE1: Arg177Ala и Met270Ala [219]. Боковые цепи Arg177 и Met270 образуют так называемый RM-мостик, проникая в полость ДНК с двух сторон на месте АП-сайта и поддерживая повреждение в вывернутом состоянии. Тем не менее, замена каждого из этих остатков не имеет заметного влияния на АП-эндонуклеазную активность [7,220].

Улучшение же экзонуклеазной активности, по предположению исследователей, происходит, как и в случае с заменами, описанными ранее, из-за увеличения объёма пространства, доступного для расположения нуклеотида и его основания. Кроме того, исходя из кинетических данных, также видно, что обе замены ускоряют диссоциацию комплекса с продуктом [219].

Что касается субстратной специфичности по отношению к ИРН-субстратам, то её причины до сих пор изучены слабо. Известно, что hAPE1 может узнавать в ДНК DHU, 5,6-дигидротимидин, 2'-дезоксуридин, 2'-дезокси-5-гидроксиуридин, альфа-тимидин, альфа-аденозин (α A) [6], 5-гидроксицитидин [174], 1,N6-этенoadенозин (ϵ A) и 3,N4-этеночитидин [175] (рисунок 8). Причём наиболее эффективно происходит гидролиз ДНК, содержащей дигидропиримидины.

В ранних работах [173,175,176] было показано, что замена Asp308Ala, слабо влияющая на АП-эндонуклеазную активность, уменьшает ИРН-активность на медленно расщепляющихся (далее «сложных») субстратах, таких как альфа-аномеры нуклеотидов, этенонуклеотиды и уридин. На основе резкого различия в эффективности расщепления АП-сайта и известных ИРН-субстратов был сделан вывод о том, что каталитические механизмы АП-эндонуклеазной и ИРН-активностей несколько отличаются друг от друга. Однако, позже было показано [220], что замена Asp308Ala приводящая к потере ИРН-активности по отношению к альфа-аденозину не влияет на активность по отношению к DHU. Таким образом, можно предположить, что влияние замены Asp308Ala заключается не в нарушении каталитического механизма.

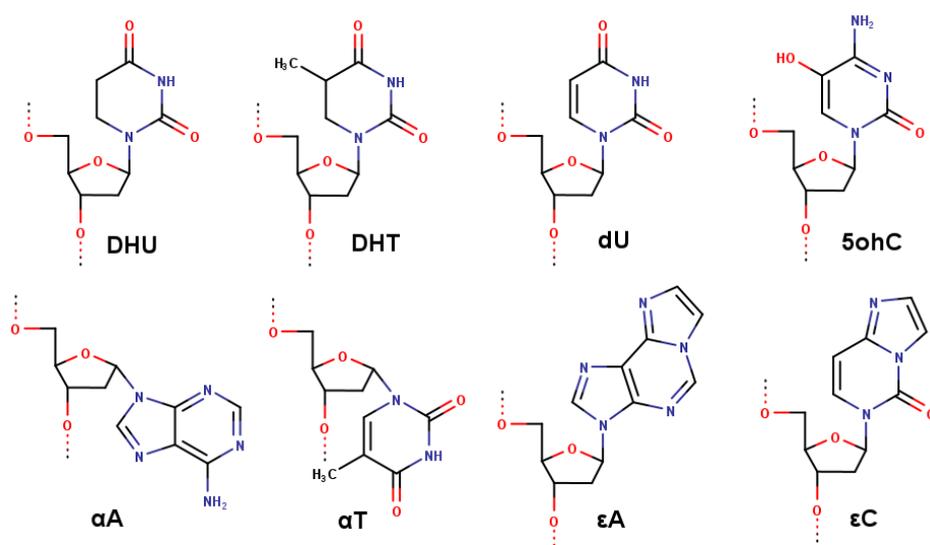


Рисунок 8. Известные субстраты ИРН-активности hAPE1.

Подобное избирательное изменение эффективности фермента также было показано на примере замены Thr268Asp [9,220]. Выбор остатка аспартата, на который меняли треонин, был обусловлен наличием аспартата в аналогичном положении у эндонуклеазы ЭкзоIII, которая не имеет ИРН-активности. Было сделано предположение о том, что важными отличиями фермента человека, обуславливающими приобретение ИРН-активности hAPE1 по сравнению с бактериальной АП-эндонуклеазой ЭкзоIII, могут быть замены Tyr128His, Asn174Gln и Gly231Ser. Однако в работе [9] это предположение было опровергнуто после анализа данных мутантных форм, показавших примерно одинаковую эффективность АП-эндонуклеазной и ИРН-активностей.

Следует отметить, что hAPE1 с заменой Thr268Asp имела на порядок сниженную АП-эндонуклеазную активность. Влияние замены Thr268Asp на активность hAPE1, по видимому, связано с тем, что Thr268 расположен в непосредственной близости от остова ДНК, в той же петле, в которой находится Met270, встраивающийся в спираль ДНК после выворачивания повреждённого нуклеотида. Несмотря на то, что Thr268 не имеет прямых связей с ДНК, вставка отрицательно заряженной боковой цепи на его место может привести к электростатическому отталкиванию от ДНК и ухудшению неспецифического связывания с нуклеиновыми кислотами.

Ещё одним важным для ИРН-активности остатком является Lys98. В случае АП-эндонуклеазной активности замена Lys98Ala влияет лишь на отдельные стадии связывания, не давая значительных изменений в общей эффективности расщепления АП-сайта. При этом в случае таких ИРН-субстратов, содержащих DHU и α A, эта замена приводит к снижению активности в несколько раз [7,212]. Основной предположительной причиной считалось косвенное участие Lys98 в координации иона металла, которое более важно для осуществления ИРН-активности, так как ИРН-активность требует пониженной концентрации Mg^{2+} , а значит, по предположению авторов, требуется и улучшенная координация иона металла.

Та же группа авторов [7] исследовала влияние на разные активности APE1 замены ещё одного остатка – Arg185. Остов этого аргинина располагается в альфа-спирали на поверхности белка, но боковая цепь находится в самом центре одной из границ активного центра. Несмотря на то, что этот остаток не взаимодействует с АП-сайтом, он участвует в формировании сети контактов с несколькими другими остатками активного центра. Замена Arg185Ala приводила к снижению и АП-эндонуклеазной и экзонуклеазной активностей в 17-20 раз, к снижению ИРН-активности по отношению к DHU – примерно во столько же, а активность по отношению к альфа-аденозину уменьшалась уже примерно в 200 раз. Влияние замены Arg185Ala на активность фермента и внутрибелковые взаимодействия

боковой цепи Arg185 свидетельствуют о том, что этот остаток скорее всего важен для поддержания структуры белка. О причинах разного влияния на разные ИРН-субстраты на данный момент гипотез нет.

МД-моделирование каталитически компетентного состояния комплексов APE1 с ДНК, содержащей F-сайт, DHU, α A и ϵ A, в отсутствие иона металла было проведено в работе [8]. По результатам моделирования было обнаружено, что данные повреждения могут стабильно располагаться внутри АЦ фермента. Однако, из полученных моделей видно, что сахарофосфатный остов α A и ϵ A вывернут из ДНК не в полной мере, если сравнивать с положением F-сайта и DHU, что может свидетельствовать о том, что пуриновые основания могут быть достаточно велики для полного размещения в АЦ APE1. Тем не менее все контакты с остатками активного центра, которые есть в комплексе с F-сайтом, сохраняются и в этих случаях.

1.8. APE1-подобные эндонуклеазы

Изучение гомологичных ферментов является хорошим способом поиска сходств и отличий в активности или специфичности фермента, возникающих из-за различий в аминокислотных последовательностях. Известны работы, посвящённые изучению гомологов APE1 человека из *D. rerio*, *X. laevis* и *D. melanogaster*.

Гены, кодирующие ферменты APE1 у позвоночных, высококонсервативны, и ген *apel* *D. rerio* на 67% идентичен гену *hapel* человека [221]. Этот ген кодирует белок с молекулярной массой примерно 35 кДа. Установлено, что APE1 из *D. rerio* (zAPE1), также как и hAPE1, обладает АП-эндонуклеазной, ИРН- и 3'-5'-экзонуклеазной активностями [222,223].

В 1994 Мацумото и коллегами была изучена активность экстрактов из ооцитов *Xenopus laevis* по отношению к ДНК, содержащей АП-сайт. В одном из случаев исследователи увидели расщепление ДНК с 5'-стороны от повреждения, что означало наличие АП-эндонуклеазной активности и возможное содержание гомолога hAPE1 [224]. Позднее, при секвенировании генома *X. laevis* было показано, что ген, кодирующий гомолог hAPE1, действительно есть [225]. Дальнейшие исследования по выделению и изучению данного фермента показали, что xAPE1, как и zAPE1, очень похож по свойствам на фермент человека. Фермент из *X. laevis* также обладает хорошей АП-эндонуклеазной активностью и существенной ИРН-активностью [222].

Каталитический С-концевой домен Rrp1 (recombination repair protein 1) *D. melanogaster* состоит из примерно 260 остатков, которые также имеют достаточно высокую степень гомологии с hAPE1 – 50%. Как было показано, именно этот домен проявляет АП-

эндонуклеазную, 3'-5'-экзонуклеазную, 3'-фосфатазную и 3'-фосфодиэстеразную активности [201]. В то же время N-концевой участок Rrp1, состоящий из 421 аминокислотного остатка, не обладает гомологией ни с каким другим известным на данный момент белком и, как было показано в экспериментах *in vitro*, проявляет уникальные характеристики, такие как перенос цепей ДНК и ренатурация одноцепочечной ДНК в гомологичной рекомбинации [261]. Кроме того, как и hAPE1, данный фермент оказывает предпочтение неправильно спаренным нуклеотидам на 3'-конце [226]. С другой стороны, только в случае Rrp1 N-концевой домен фермента оказывает влияние на эффективность осуществления 3'-активности, в то время как у hAPE1 такого эффекта не наблюдается [227].

В работе [222] по изучению APE1-подобных эндонуклеаз было выяснено, что Rrp1 обладает сниженной в несколько раз относительно других APE1-подобных ферментов АП-эндонуклеазной активностью. ИРН-активность Rrp1 оказалась в целом сходной с другими исследованными эндонуклеазами за исключением случая с ДНК, содержащей αА, на которой Rrp1 не проявлял каталитическую активность.

Заключение

На данный момент известен и изучен широкий круг ферментов, процессирующих АП-сайты. Помимо АП-эндонуклеазы APE1, для которой гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АП-сайта является основной функцией, можно выделить гомологичную APE2, которая в первую очередь проявляет 3'-5'-экзонуклеазную активность, а также ряд ферментов, проявляющих АП-лиазную активность, среди которых встречаются не только «классические» ферменты репарации, такие как ДНК-гликозилазы, но и ферменты, участвующие в совершенно иных клеточных процессах, например, рибосомальный белок uS3 [228]. Тем не менее APE1-подобные АП-эндонуклеазы выделяются из этого списка наличием специфичности к широкому набору нуклеотидов с модифицированными основаниями.

Следует отметить, что несмотря на многолетнюю историю исследования АП-эндонуклеаз, в настоящее время не установлен механизм, обеспечивающий широкую субстратную специфичность этих ферментов. APE1 может работать не только с разными типами нуклеиновых кислот – ДНК и РНК [180,220,229], и разными структурами – дуплексы, выпетливания, глазки, квадруплексы [222,229,230], но и имеет примечательную специфичность среди повреждённых нуклеотидов, проявляя ИРН-активность по отношению и к пиримидинам, и к пуринам, к альфа- и бета-аномерам. Субстратная специфичность APE1 пересекается с некоторыми ДНК-гликозилазами, но кроме того включает и субстраты, неузнаваемые ДНК-гликозилазами, например, альфа-аномеры нуклеотидов. В сово-

купности, эти особенности делают этот фермент интересным и актуальным объектом изучения как для биотехнологических целей, так и с точки зрения энзимологии. Обладая уникальной субстратной специфичностью и возможностью расщеплять ДНК и РНК в местах определённых повреждений, APE1 может быть использована как фермент, детектирующий наличие определённых нуклеотидов в ДНК, как фермент, вносящий разрывы в синтетическую ДНК в местах, не опознаваемых эндонуклеазами рестрикции, и как фермент, деблокирующий 3'-концевую гидроксильную группу, делая её доступной для других ферментов. Понимание механизма работы APE1 и его модификация помогут как разобраться в необычных свойствах фермента, так и позволят получить на его основе варианты, обладающие новыми, уникальными свойствами.

Помочь в решении обозначенных вопросов могут компьютерные методы и, в частности, метод молекулярной динамики (МД). Метод МД является мощным инструментом исследования структур биополимеров и подходит не только для оптимизации структуры в случае небольших структурных изменений, но и для моделирования сложных конформационных превращений, включая движения одних молекул относительно других в комплексах. Это даёт возможность применения метода МД в изучении механизмов работы ферментов как на начальном этапе взаимодействия с субстратом, так и в каталитических состояниях, а также позволяет проводить рациональный дизайн ферментов для широкого спектра внедряемых модификаций. Метод направленной молекулярной динамики успел хорошо себя зарекомендовать при изучении работы ферментов репарации, узнающих различные повреждения ДНК.

В связи с этим в рамках данной работы с применением методов молекулярной динамики, мутационного и кинетического анализа было выполнено исследование, направленное на выяснение механизма работы АП-эндонуклеаз, включающее определение принципиальных этапов механизма, обеспечивающего субстратную специфичность ферментов данного класса, и создание ряда мутантных форм АП-эндонуклеазы zAPE1 из *D. rerio*, обладающих изменённой субстратной специфичностью.

2. Материалы и методы

2.1. Моделирование ДНК-белковых комплексов методом молекулярной динамики

В качестве начальной структуры для моделирования hAPE1 была взята кристаллическая структура PDB ID 1DE8 [151]. В этой кристаллической структуре отсутствует ион магния, поэтому для моделирования в неё был добавлен Mg^{2+} из структуры с номером 4IEM (комплекс с продуктом) [155], наложенной на структуру 1DE8 по алгоритму Нидлмана-Вунша. Для моделирования комплексов zAPE1 была взята кристаллическая структура белка с номером 2O3C [221], и к ней с помощью наложения добавлены ДНК и ион магния из структур 1DE8 и 4IEM соответственно.

Для АП-эндонуклеаз из *X. laevis* и *D. melanogaster* нет опубликованных кристаллических структур, поэтому в этих случаях сначала был применён метод моделирования по гомологии. Моделирование по гомологии на основе последовательностей соответствующих белков было выполнено с помощью интернет-сервиса Swiss-model [231]. Далее тем же образом к структурам белков были добавлены ДНК и Mg^{2+} . При моделировании по гомологии последовательности xAPE1 и Rrp1 имели длину, аналогичную длине hAPE1 из 1DE8, и перекрытие 100%.

Структуры ДНК-дуплексов, содержащие нуклеотиды с повреждёнными основаниями, были взяты из [8] и с помощью наложения подставлены на место ДНК начальных структур с F-сайтами.

Моделирование выполнено в GROMACS 2019.6 [44] с использованием силового поля AMBER ff99SB-ILDN [232] и поправками BSC1 [233]. Состояние ионизации аминокислотных остатков активного центра было взято из работы [234]. Молекулы растворителя были представлены моделью воды TIP3P [235]. Несколько случайных молекул воды были замещены ионами натрия для нейтрализации заряда системы. Моделирование проводили при температуре 300 К. Энергия систем с водой была сначала минимизирована методом перевала, после чего проводили двухстадийное уравнивание системы при действии сдерживающих сил с коэффициентом $1000 \text{ кДж}/(\text{моль} \cdot \text{нм}^2)$ на тяжёлые атомы белка и ДНК: 200 пс в NVT-ансамбле и 200 пс в NPT-ансамбле. Далее проводили запуск основных симуляций – минимум по три повторных МД-траектории для каждой модели, в которых отличались начальные скорости атомов.

В случае направленной МД был использован метод дополнительных сил, действующих на определённые атомы ДНК или белка в направлениях, соответствующих ожидаемым конформационным изменениям. Были выбраны три пары атомов, на которые действовали дополнительные силы:

1. атом азота повреждённого основания, участвующий в образовании *N*-гликозидной связи, отталкивался от аналогичного атома азота противоположного основания;
2. атом азота повреждённого основания, участвующий в образовании *N*-гликозидной связи, притягивался к атому Asn212 С.
3. атом Ala230 C^α отталкивался от атома Ser176 N.

Подробное описание применения этих сил будет приведено в параграфе 3.2.3.

Функция дополнительных сил, заданных в Gromacs, имела форму ступеньки (рисунок 9), величина и точка разрыва которой задавались вручную. Расстояние между выбранными атомами, при котором сила переставала действовать, было на 1-2 Å меньше (больше), чем то, что было присуще этой паре атомов при моделировании без действия силы притяжения (отталкивания).

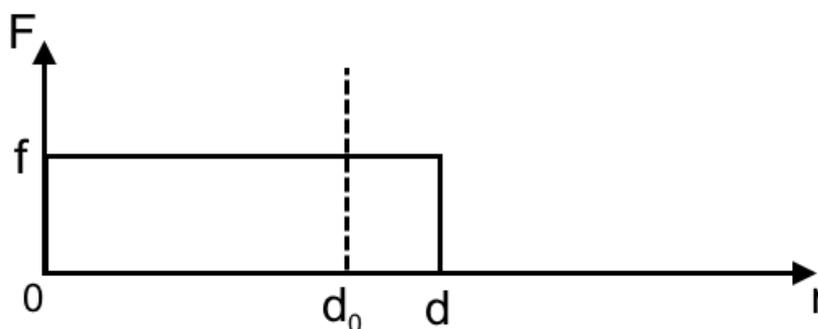


Рисунок 9. Зависимость величины (F) дополнительных сил, задаваемых в Gromacs во время направленной МД, от расстояния между атомами (r) для случая силы отталкивания. f – величина силы, действующей на расстоянии от 0 до d между атомами, d_0 – расстояние между атомами в системе без дополнительных сил ($d_0 < d$). В случае силы притяжения сила действует на промежутке $[d, \infty)$ при $d_0 > d$.

Чтобы определить величину силы, минимально достаточную для перехода каждой системы из одного состояния в другое, получали серию МД траекторий с постепенным повышением силы с шагом 1 кДж/(моль·нм) от 0 до той величины, при которой впервые происходил переход за время до 300 нс. Далее проводились по три моделирования при найденной силе и при силах на 0,5 кДж/(моль·нм) больше и меньше. Сила, при которой происходило как минимум на два перехода больше, чем при меньшей, нарекалась минимально достаточной для данного перехода.

Для демонстрации структур полученных моделей комплексов из каждой серии траекторий с определённым комплексом фермент-ДНК выбирался кадр, в котором значения расстояний между атомами повреждённого нуклеотида и каталитическими остатками АЦ

были наиболее близки к средним значениям соответствующих расстояний в траектории комплекса hAPE1-F-сайт. Значения среднеквадратичного отклонения (СКО) вдоль МД траекторий были посчитаны по атомам C^α белка.

2.2. Реакционные буферные растворы

Буферные растворы были приготовлены из химически чистых реагентов с использованием бидистиллированной воды. Буфер ЭРО содержал 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитола (ДТТ), 1 мМ ЭДТА и 7% глицерина (v/v). Буфер ИРН содержал 50 мМ Tris-HCl (pH 6,5), 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА и 7% глицерина (v/v). Выбор 1 мМ концентрации катионов Mg²⁺ в присутствии 1 мМ ЭДТА обусловлен тем, что во многих работах было показано, что для реализации ИРН-активности АП-эндонуклеазами достаточно наличия ионов Mg²⁺ в реакционной смеси даже в следовых количествах (0,01-0,5 мМ) [6,173–176].

2.3. Синтез и очистка олигодезоксирибонуклеотидов

Используемые в работе олигодезоксирибонуклеотиды представлены в таблице 1. Синтез олигодезоксирибонуклеотидов проведён на ДНК/РНК синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Новосибирск, Россия) с использованием стандартных коммерческих фосфорамидитов и носителей CPG от Glen Research (США). Синтезированные олигодезоксирибонуклеотиды были очищены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Подтверждение гомогенности олигодезоксирибонуклеотидов было осуществлено с помощью гель-электрофореза в 20% (w/v) полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Определение концентраций олигодезоксирибонуклеотидов проводили спектрофотометрическим методом на основании оптической плотности их растворов на длине волны 260 нм (A₂₆₀); расчёт концентраций производили по закону Бугера-Ламберта-Бэра с учётом коэффициентов молярной экстинкции олигодезоксирибонуклеотидов [236].

Таблица 1. Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в работе*

| Название | Последовательность |
|---|--|
| FRET-X-субстрат X = F-сайт, DHU, dU, C | 5'-FAM-GCTCA X GTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGTGCATGTCTCGAC-BHQ1-5' |
| FRET-Y-субстрат Y = α A, ϵ A | 5'-FAM-GCTCA Y GTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGTTCATGTCTCGAC-BHQ1-5' |

* ДНК-дуплексы, использованные для визуализации в ПААГ, отличаются от данных за счёт отсутствия тушителя BHQ1

В качестве специфических ДНК-субстратов для ферментов zAPE1 использовали олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие такие повреждённые нуклеотиды, как F-сайт, dU, DHU, α A и ϵ A (таблица 1). В качестве неспецифических субстратов были использованы неповреждённые ДНК-дуплексы. Для регистрации глобальных конформационных перестроек, происходящих со структурой ДНК-субстратов в процессе взаимодействия с ферментами, использовали FRET пару: остаток 6-карбоксифлуоресцеина (FAM) в качестве флуорофора и остаток black hole quencher 1 (BHQ1) в качестве тушителя. FAM вводили на 5'-конец содержащей повреждение цепи ДНК (или соответствующей ей неповреждённой цепи), а BHQ1 – на 5'-конец комплементарной цепи. Структуры всех повреждённых нуклеотидов и красителей, использованных в работе, представлены на рисунках 10 и 11.

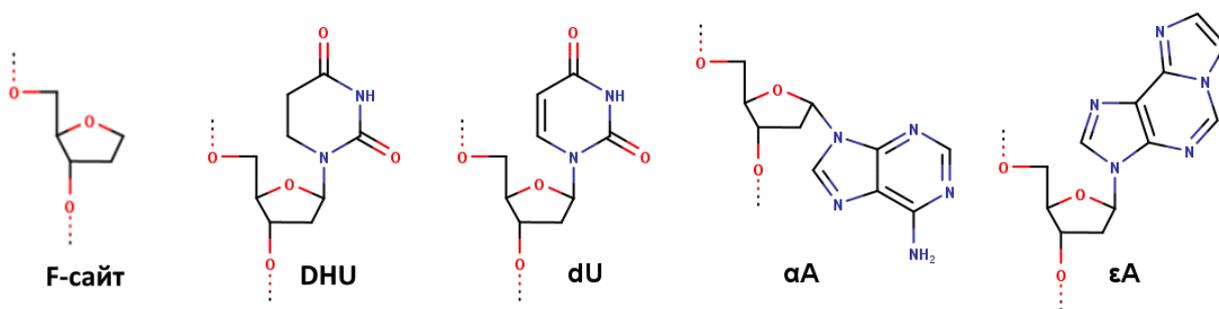


Рисунок 10. Структуры повреждённых нуклеотидов, использованных в работе.

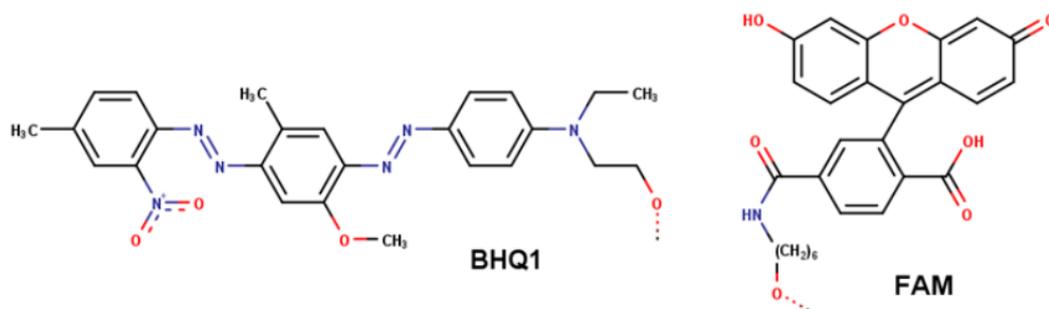


Рисунок 11. Структуры ДНК-красителей, использованных в работе.

2.4. Мутагенез гена zAPE1

Плазмида pET28c, содержащая ген zAPE1 дикого типа, была предоставлена Кузнецовым Н.А. Для получения генов с мутациями был использован подход, включающий наработку ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров с заменами нуклеотидов. После ПЦР продуктом реакции трансформировали клетки *E. coli* ElectroMax с помощью электропорации на приборе Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Клетки выращивали в среде LB с добавлением канамицина в концентрации 50 мкг/мл. Далее ДНК выделяли и проводили проверку полученных экс-

прессионных векторов путём секвенирования последовательности включённого гена. Все экспрессионные вектора имели ожидаемые последовательности.

2.5. Выделение и очистка ферментов

Ферменты zAPE1 дикого типа и мутантных форм были выделены из клеток-продуцентов *E. coli* ArcticExpress, трансформированных плазмидой pET28с, несущей ген, кодирующий соответствующий белок с N-концевой меткой His6. Для наработки белка брали 1 л питательной среды LB, содержащей канамицин в концентрации 50 мкг/мл. В этот объём добавляли клетки бактерий с необходимой векторной конструкцией и растили при 37°C до тех пор, пока значение оптической плотности при 600 нм (A600) не достигало 0,6-0,7. Индукцию синтеза белка в клетках проводили путём добавления изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,3 мМ. После 15 часов индукции в вентилируемом инкубаторе при температуре 16°C клетки собрали путём центрифугирования (4000 × g, 20 мин). Далее клетки были ресуспендированы в буфере [20 мМ HEPES-KOH (pH 7,8), 40 мМ NaCl] с добавлением смеси ингибиторов протеаз (Complete inhibitor cocktail, Мангейм, Германия). Лизис клеток проводили с помощью пресса Фрэнча (Thermo Electron Corporation, Нидем, США). Все процедуры по очистке проводили при 4°C. Каждый гомогенат центрифугировали при 40000 × g в течение 40 мин. Затем отбирали жидкость над осадком и доводили концентрацию NaCl в ней до 250 мМ.

Первая стадия очистки белка проводилась путём ионообменной хроматографии с использованием колонки с 30 мл Q-Sepharose Fast Flow (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, Мальборо, Массачусетс, США), предварительно уравновешенной тем же буфером. После колонки с Q-сефарозой к раствору белка добавляли раствор имидазола до концентрации 20 мМ и раствор NaCl до концентрации 500 мМ. Полученный раствор наносили на 1 мл хроматографическую хелатирующую колонку HiTrap-Chelating (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, Мальборо, Массачусетс, США). Белки, связавшиеся со смолой, смывали в линейном градиенте имидазола с концентрацией от 20 до 600 мМ. Регистрацию поглощения раствора проводили при длине волны 280 нм. Гомогенность выделенных белков была подтверждена методом разделения в ПААГ с помощью гельэлектрофореза (рисунок 12).

Концентрация белка была измерена по методу Брэдфорда [237]. Для этого к 500 мкл раствора белка в буфере PBS добавляли 500 мкл реагента Брэдфорда (100 мг Coomassie G-250, 50 мл этанола, 100 мл ортофосфорной кислоты на один литр воды) и ждали окраски белка в течение 5 мин. Оптическую плотность полученного раствора измеряли спектрофотометрически на длине волны 595 нм. В качестве стандарта для построения калибровоч-

ной кривой использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) с известной концентрацией.

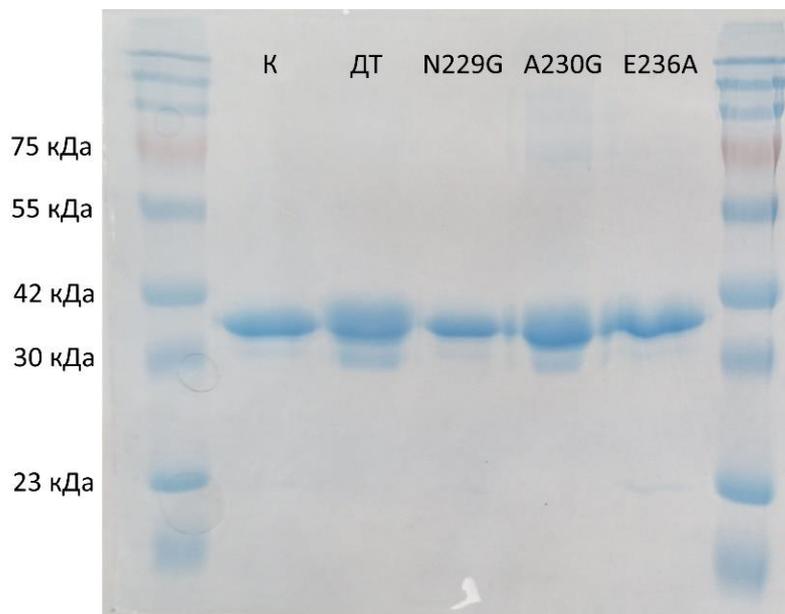


Рисунок 12. Анализ гомогенности использованных фракций выделенного белка zAPE1 ДТ и мутантных форм методом гель-электрофореза. Контролем (К) является белок zAPE1 дикого типа, полученный в работе [222].

2.6. Анализ активности ферментов zAPE1 в стационарных условиях

Анализ активности ферментов zAPE1 дикого типа и мутантных форм по отношению к ДНК-субстрату FRET-F/G проводили при 25°C в 10 мкл реакционной смеси, содержащей буфер ЭРО (раздел 2.2). Для ДНК-субстратов FRET-U/G, FRET-αA/T, FRET-εA/T и FRET-DHU/G (таблица 1) активность фермента определяли с использованием буфера ИРН (раздел 2.2) при 37 °C. Реакцию инициировали добавлением 5 мкл фермента в разных концентрациях к 5 мкл ДНК-субстрата в концентрации 1 мкМ. После инкубирования в течение определённого времени реакцию останавливали добавлением 10 мкл смеси, содержащей 7 М мочевины, 25 мМ ЭДТА и буфер для нанесения на гель, с последующим нагреванием при 95°C в течение 3 мин и нанесением на 20% (w/v) ПААГ, содержащий 7 М мочевины. Все эксперименты проводили с тремя повторами. Гель-электрофорез проводили при комнатной температуре и напряжении 100 В при силе тока около 10 мА. Для визуализации ДНК в геле использовали гель-документирующую систему E-Box CX.5 TS (Vilber Lourmat, Франция). Анализ степени расщепления ДНК-субстратов был проведён путём сканирующей денситометрии в программе Gel-Pro Analyzer v.4.0 (Media Cybernetics, США). Значение уровня расщепления определяли как отношение площади пика продукта

к сумме площадей пиков на электрофореграмме, соответствующих продукту и исходному ДНК-субстрату, умноженное на 100%.

2.7. Кинетические измерения методом «остановленного потока»

Предстационарный кинетический анализ проводили с использованием метода остановленного потока путём регистрации изменений интенсивности FRET-сигнала. В работе были использованы спектрометры остановленного потока SX.18MV и SX20 (Applied Photophysics Ltd., Великобритания), оснащённые ксеноновой лампой мощностью 150 Вт и кюветой с длиной оптического пути 2 мм. Мёртвое время приборов составляло 1,4 и 1,0 мс, соответственно. Флуоресценцию FAM возбуждали светом с длиной волны $\lambda_{ex} = 494$ нм, а изменения FRET-сигнала определяли, измеряя интенсивность света на $\lambda_{em} > 530$ нм с использованием фильтра OG-530 (Schott, Mainz, Германия) и фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Каждая представленная на рисунках флуоресцентная кривая была получена как результат усреднения от трёх или более экспериментальных кривых. Экспериментальная погрешность не превышала 5%.

Флуоресцентные кривые, характеризующие взаимодействие ферментов zAPE1 с ДНК-субстратами, содержащими αA , ϵA , DHU и dU, были получены в экспериментах, которые проводили в буфере ИРН. Эксперименты с участием субстрата FRET-F/G или неповреждённой ДНК проводили в буфере ЭРО. Анализ взаимодействия с FRET-F/G-субстратом проводили при 25 °С, в остальных случаях – при 37 °С.

Для расчёта величин констант скорости, характеризующих конформационные переходы ДНК, содержащей F-сайт, при взаимодействии с ферментами, были получены серии кинетических кривых для разных концентраций фермента и фиксированной концентрации ДНК-субстрата. Концентрация ДНК-субстратов составляла 1 мкМ, а концентрацию фермента варьировали в пределах от 0,25 до 2 мкМ. Растворы, содержащие фермент и субстрат, заранее помещали не менее чем на 2 мин в два отдельных шприца спектрометра остановленного потока для достижения необходимой температуры, после чего происходило смешивание.

2.8. Математическая обработка кинетических кривых

Наборы кинетических кривых, полученных для различных концентраций ферментов в процессе взаимодействия с повреждённой ДНК, были проанализированы с использованием программы DynaFit (BioKin, Pullman, США) [238], как описано ранее [239–241].

2.9. Анализ межмолекулярных взаимодействий с использованием микротермофореза

Величины констант связывания ДНК-субстратов FRET-F/G с ферментами zAPE1 дикого типа и мутантных форм были определены с помощью метода микроскопического термофореза (МСТ) на приборе Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies, Германия). Концентрация олигодезоксирибонуклеотидов в экспериментах по титрованию составляла 0,5 мкМ, а концентрацию zAPE1 варьировали от 0,1 до 10,0 мкМ. Реакционные смеси инкубировали при 25 °С в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ KCl и 2,0 мМ ЭДТА.

$$\text{МСТ}_{\text{сигнал}} = F_{\text{фон}} + F_{\text{амп}} \times \frac{[\text{zAPE1}]}{K_d + [\text{zAPE1}]} \quad (1)$$

Величину K_d определяли согласно уравнению (1), где $F_{\text{фон}}$ – фоновый сигнал, $F_{\text{амп}}$ – амплитуда изменения МСТ сигнала, K_d – равновесная константа диссоциации (М) фермент-субстратного комплекса.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Сравнительный анализ APE1-подобных АП-эндонуклеаз

Для выяснения причин субстратной специфичности APE1-подобных эндонуклеаз было решено провести сравнительный анализ четырёх ферментов: hAPE1 человека, zAPE1 из *D. rerio*, xAPE1 из *X. laevis* и Rrp1 из *D. melanogaster*. Эти АП-эндонуклеазы имеют похожие С-концевые домены, но довольно сильно различаются по своим N-концевым участкам. Среди четырёх выбранных эндонуклеаз выделяется Rrp1, имеющая N-концевой участок длиной более 400 аминокислотных остатков. Но общей чертой N-концевых участков всех четырёх ферментов является обилие основных остатков – аргининов и лизинов. По этой причине предполагается, что N-концевой участок APE1-подобных эндонуклеаз ответственен за неспецифическое связывание с ДНК, на что также указывают результаты нескольких работ, показывающие, что ферменты без N-концевого участка образуют менее стабильные комплексы с ДНК [242,243].

Сравнение последовательностей и структур четырёх ферментов показало, что Rrp1 хоть и имеет многочисленные замены относительно hAPE1, лишь немногие из них располагаются в частях белка, взаимодействующих с ДНК (рисунок 13). Среди ДНК-связывающих остатков выделяются положения с заменами Gly178Lys, Arg181Asn, Gly225Asn и делецией Lys125. Известно, что замена Arg181Asn у hAPE1 снижает сродство к ДНК-продукту [148]. Другая известная замена, уже Mg²⁺-координирующего остатка, – Asp70Ala – влияет на эффективность АП-эндонуклеазной и ИРН-активностей hAPE1 [143].

Эндонуклеаза xAPE1, имея 66%-ое сходство с hAPE1, несёт в себе только три потенциально важные замены, все – вблизи кармана активного центра напротив предположительного положения основания нуклеотида: Ala175Ser, Asn229Thr и Ala230Pro. Фермент из *D. rerio* имеет почти такое же значение сходства, как и xAPE1 (67% [221]), но не имеет замен, которые можно было бы считать важными для АП-эндонуклеазной и ИРН-активностей.

| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | |
|------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>H. sapiens</i> | 57 G K P A T L K I C S W N V D G L R A W I K K K G L D W V K E E A P D I L C L Q E T K C S E N K L P A E L Q | | | | | 109 |
| <i>D. rerio</i> | 81 G R A A N M K I T S W N V D G L R A W V K K N G L D W V R K E D P D I L C L Q E T K C A E K A L P A D I T | | | | | 133 |
| <i>X. laevis</i> | 56 G K K Y T L K I S S W N V D G I R A W I K K Q G L N W V R E E D P H I M C L Q E I K C A E K L L P P D V K | | | | | 108 |
| <i>D. melanogaster</i> | 422 D K E F N L K I C S W N V A G L R A W L K K D G L Q L I D L E E P D I F C L Q E T K C A N D Q L P E E V T | | | | | 474 |
| | | 120 | 130 | 140 | 150 | |
| <i>H. sapiens</i> | 110 E L P G L S H Q Y W S A P S D K E G Y S G V G L L S R Q C P L K V S Y G I G D E E H D Q E G R V I V A E F | | | | | 162 |
| <i>D. rerio</i> | 134 G M P E Y P H K Y W A G S E D K E G Y S G V A M L C K T E P L N V T Y G I G K E E H D K E G R V I T A E F | | | | | 186 |
| <i>X. laevis</i> | 109 D M P E Y P H K Y W A C P D E K E G Y S G V A M L C K D K P L N V T Y G I G I E E H D K E G R V I T A E F | | | | | 161 |
| <i>D. melanogaster</i> | 475 R L P G Y - H P Y W L C M P G - - G Y A G V A I Y S K I M P I H V E Y G I G N E E F D D V G R M I T A E Y | | | | | 524 |
| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | |
| <i>H. sapiens</i> | 163 D S F V L V T A Y V P N A G R G L V R L E Y R Q R W D E A F R K F L K G L A S R K P L V L C G D L N V A H | | | | | 215 |
| <i>D. rerio</i> | 187 P D F F L V T A Y V P N A S R G L V R L D Y R K T W D V D F R A Y L C G L D A R K P L V L C G D L N V A H | | | | | 239 |
| <i>X. laevis</i> | 162 D S F F V I A A Y I P N S S R G L V R L D Y R Q R W D V D F R A Y L K G L D S K K P L I L C G D L N V A H | | | | | 214 |
| <i>D. melanogaster</i> | 525 E K F Y L I N V Y V P N S G R K L V N L E P R M R W E K L F Q A Y V K K L D A L K P V V I C G D M N V S H | | | | | 577 |
| | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | |
| <i>H. sapiens</i> | 216 E E I D L R N P K G N K K N A G F T P Q E R Q G F G E L L Q A V P L A D S F R H L Y P N T P Y A Y T F W T | | | | | 268 |
| <i>D. rerio</i> | 240 Q E I D L K N P K G N R K N A G F T P E E R E G F T Q L L E A G - F T D S F R E L Y P D Q A Y A Y T F W T | | | | | 292 |
| <i>X. laevis</i> | 215 Q E I D L K N P K T N K K T P G F T P Q E R Q G F G E L L A E G - Y L D S F R E L Y P D K P S A Y T F W T | | | | | 266 |
| <i>D. melanogaster</i> | 578 M P I D L E N P K N N T K N A G F T Q E E R D K M T E L L G L G - F V D T F R H L Y P D R K G A Y T F W T | | | | | 629 |
| | 280 | 290 | 300 | 310 | | |
| <i>H. sapiens</i> | 269 Y M M N A R S K N V G W R L D Y F L L S H S L L P A L C D S K I R S K A L G S D H C P I T L Y L A L | | | | | 318 |
| <i>D. rerio</i> | 293 Y M M N A R S K N V G W R L D Y F V L S S A L L P G L C D S K I R N T A M G S D H C P I T L F L A V | | | | | 342 |
| <i>X. laevis</i> | 267 Y M M N A R A K N V G W R L D Y F V L S K A L R P A L C D C K I R S K V M G S D H C P I T L L M A I | | | | | 316 |
| <i>D. melanogaster</i> | 630 Y M A N A R A R N V G W R L D Y C L V S E R F V P K V V E N E I R S Q C L G S D H C P I T I F F N I | | | | | 679 |

Рисунок 13. Выравнивание последовательностей каталитических доменов четырёх АРЕ1-подобных ферментов. Mg²⁺-координирующие остатки выделены зелёным цветом, каталитические остатки – красным, ДНК-связывающие – синим и остатки кармана активного центра – жёлтым. Замены относительно hАРЕ1, которые потенциально могут оказать существенный эффект на активность фермента, отмечены цветным фоном.

3.2. Моделирование комплексов АП-эндонуклеаз с ДНК

3.2.1. Анализ моделей комплексов АРЕ1 человека с ДНК

Для получения модельной структуры комплекса hАРЕ1 с ДНК, содержащей F-сайт, использовали кристаллическую структуру 1DE8 с ионом магния. На основе этой структуры были получены три МД-траектории длиной 100 нс. Итоговые структуры оказались одинаковыми в пределах величины колебаний атомов, о чём можно судить по графикам СКО (рисунок 14), поэтому из одной из них был взят последний кадр и сравнен с кристаллической структурой (рисунок 15).

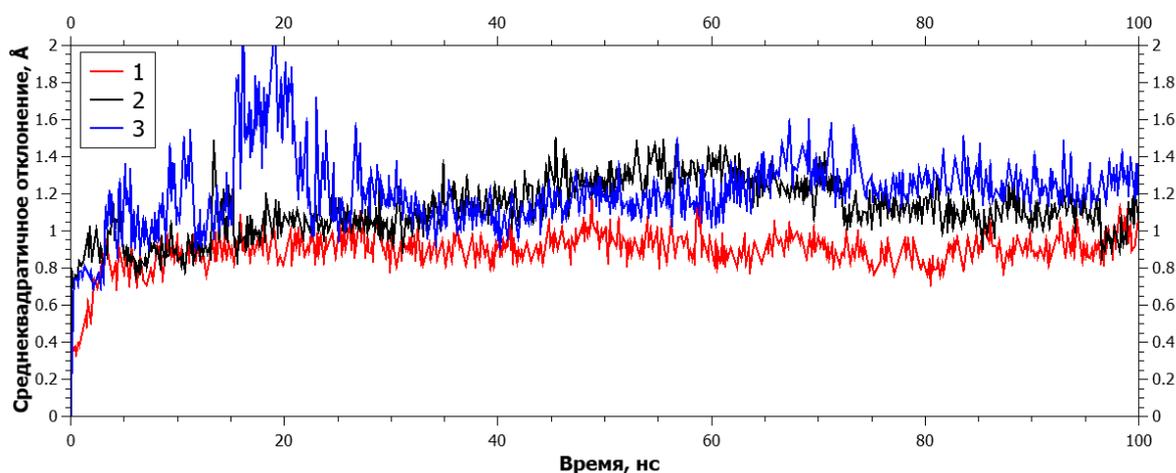


Рисунок 14. Динамика СКО в трёх траекториях с комплексами hAPE1-F-сайт, созданных на основе кристаллической структуры PDB ID 1DE8.

Сравнение наложенных друг на друга структур показало, что заметные различия есть лишь в точном положении атомов фосфатной группы F-сайта, влияющем на набор водородных связей между фосфатной группой и окружающими аминокислотными остатками активного центра. Критериями наличия водородной связи являлись расстояние между атомами ($< 3,5 \text{ \AA}$) и угол ($< 20^\circ$). В кристаллической структуре фосфатная группа F-сайта образует три водородные связи: O1P - Asn212 N $^{\delta 2}$, O1P - Tyr171 O n и O2P - His309 N $^{\epsilon 2}$. В то же время в модели комплекса у фосфата присутствует тоже три связи, но другие: O5' - Asn212 N $^{\delta 2}$, O1P - Tyr171 O n и O5' - His309 N $^{\epsilon 2}$. При этом принципиальные положения как аминокислотных остатков АЦ, так и атомов F-сайта в модели не претерпели изменений относительно кристаллической структуры. Таким образом, можно заключить, что полученная модель комплекса hAPE1-F-сайт в достаточной мере соответствует рентгеноструктурным данным, и на её основе могут быть построены комплексы с остальными повреждениями ДНК. Модель структуры, в которой присутствуют водородные связи O5' - Asn212 N $^{\delta 2}$, O1P - Tyr171 O n и O5' - His309 N $^{\epsilon 2}$ между фосфатной группой повреждённого нуклеотида и белком, далее будет именоваться нами "структурой в каталитически компетентном состоянии".

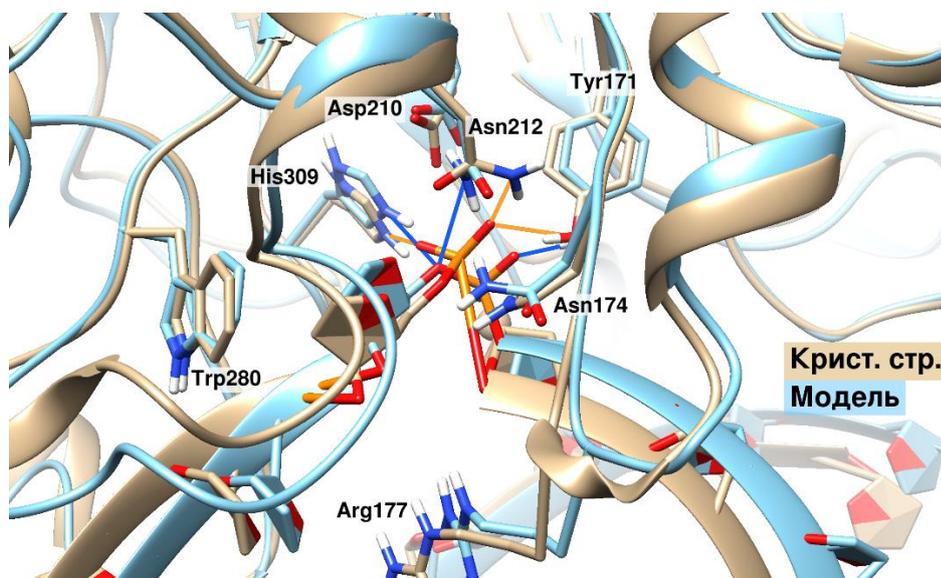


Рисунок 15. Наложение двух комплексов hAPE1-F-сайт: кристаллической структуры 1DE8 (бежевый цвет) и полученной модели (голубой цвет). Оранжевыми и синими линиями показаны водородные связи между белком и F-сайтом в соответствующих комплексах.

При моделировании комплекса hAPE1-DHU были выявлены значительные отклонения в структуре АЦ относительно комплекса с F-сайтом. При этом фермент в целом был стабилен, имея СКО $< 2 \text{ \AA}$. Из водородных связей между фосфатом повреждённого нуклеотида и остатками АЦ остались стабильными только две - O1P - Asn212 N^{δ2} и O1P - Tyr171 Oⁿ (рисунок 16А). Сильно изменилось положение остатков, образующих границу кармана АЦ, а именно остатков с номерами от 229 до 233 (рисунок 16Б). Белковая петля, содержащая эти остатки, была отеснена основанием повреждённого нуклеотида. При этом были разорваны две водородные связи внутри белка, предположительно важные для сохранения нужной вторичной структуры белка: Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε1} и Ala214 N - Gly231 O (рисунок 17Б). Следует отметить, что эти связи в комплексе с ДНК, содержащей F-сайт, во всех полученных МД-траекториях оставались стабильными (рисунок 17А). Было выдвинуто предположение, что разрыв именно этих связей позволяет активному центру подстраиваться под более объёмное повреждение и достигать каталитически компетентного состояния. А значит данные изменения должны наблюдаться для всех нуклеотидов с повреждёнными азотистыми основаниями.

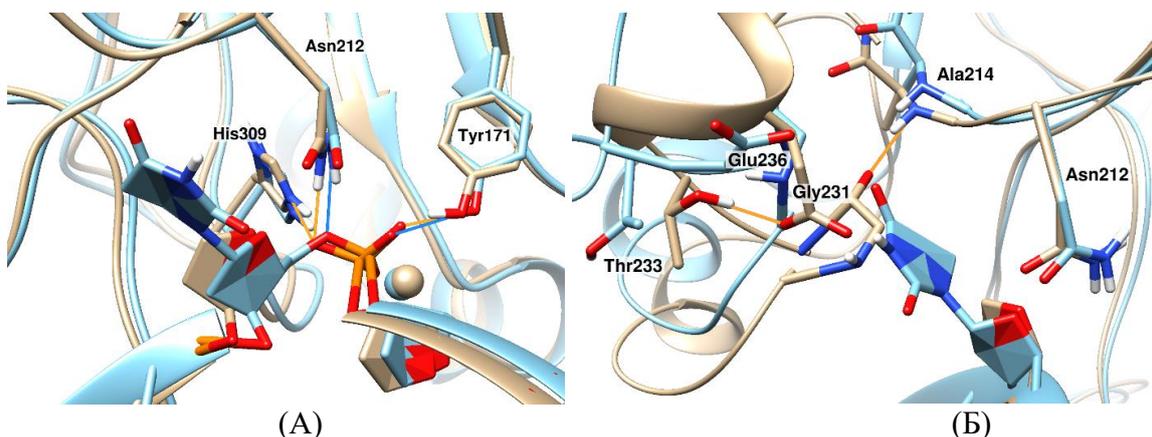


Рисунок 16. Сравнение комплексов hAPE1-F-сайт (бежевый цвет) и hAPE1-DHU (голубой цвет). Оранжевыми и синими линиями показаны водородные связи между белком и F-сайтом в соответствующих комплексах. А) Вид на остатки АЦ. Комплекс с DHU имеет на одну Н-связь меньше, чем комплекс с F-сайтом. Б) Вид на петлю с остатками Asn229-Thr233. У комплекса с F-сайтом показаны Н-связи Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε1} и Ala214 N - Gly231 O, которые отсутствуют в составе комплекса с DHU.

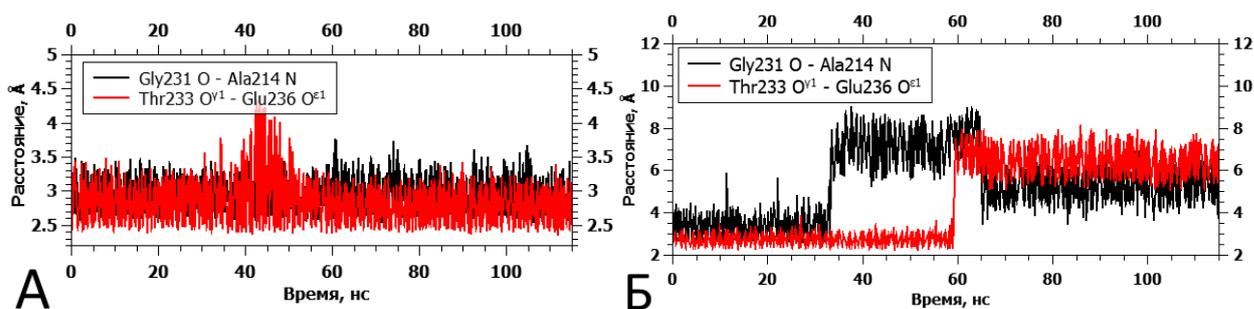


Рисунок 17. Динамика расстояний между атомами в парах Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε1} и Ala214 N - Gly231 O при моделировании комплекса А) hAPE1-F-сайт и Б) hAPE1-DHU. В случае комплекса с DHU в некоторый момент расстояния в среднем становятся больше 3,6 Å, что означает потерю Н-связей.

Моделирование комплексов hAPE1 с остальными повреждениями (αA, εA) подтвердило это предположение. В обоих случаях водородные связи Thr233 - Glu236 и Ala214 - Gly231 разрывались во время моделирования (рисунок 18). При этом структуры ферментов в комплексах с αA и εA были стабильны, имея СКО < 2 Å. Кроме того, было замечено, что в обоих случаях разрывалась связь между атомами αA/εA O1P и Asn212 N^{δ2}, а также отсутствовала связь O2P - His309 N^{ε2} в случае комплекса с εA (рисунок 19). Разрывы связей с остатками АЦ в случаях с нуклеотидами с повреждёнными основаниями предположительно произошли из-за относительно большого размера повреждений, которые с трудом помещаются в карман АЦ, предназначенный для АП-сайта, даже при необходимых конформационных изменениях в петле Asn229-Thr233.

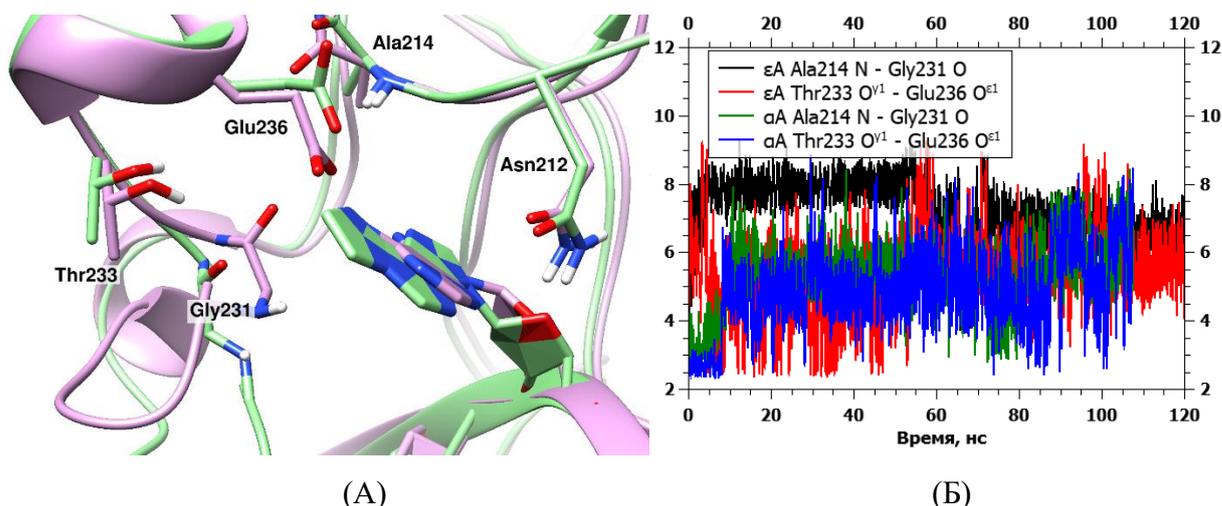


Рисунок 18. А) Наложение комплексов hAPE1- α A (розовый цвет) и hAPE1- ϵ A (зелёный цвет) с видом на петлю Asn229-Thr233. Связи Thr233 O γ^1 - Glu236 O ϵ^1 и Ala214 N - Gly231 O отсутствуют. Б) Динамика расстояний между атомами в парах Thr233 O γ^1 - Glu236 O ϵ^1 и Ala214 N - Gly231 O в моделях комплексов hAPE1 с α A и ϵ A. Начиная с некоторого момента, все расстояния в среднем становятся больше 3,6 Å, что означает потерю H-связей.

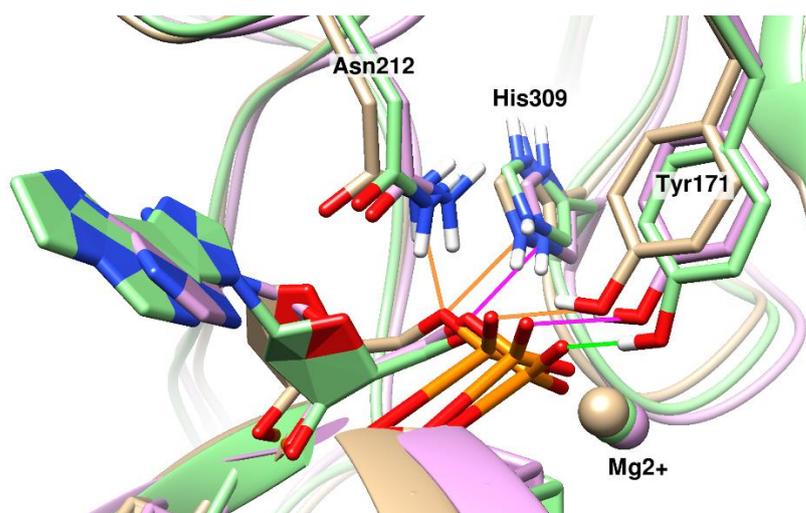


Рисунок 19. Сравнение комплексов hAPE1-F-сайт (бежевый цвет), hAPE1- α A (розовый цвет) и hAPE1- ϵ A (зелёный цвет) с видом на АЦ. В комплексе с α A сохранились две H-связи (розовые линии), а в комплексе с ϵ A – только одна (зелёная линия).

Моделирование комплексов hAPE1 с F-, DHU-, α A- и ϵ A-субстратами ранее было проведено в работе [8]. В работе [8] применяли метод МД с использованием неявного растворителя, а также вводились ограничения на подвижность атомов белка с целью узнать, способны ли нуклеотиды с модифицированными азотистыми основаниями вписаться в АЦ, объём которого соответствует F-сайту. Было установлено, что АЦ фермента способен вмещать нуклеотиды, содержащие повреждённые основания – DHU и ϵ A.

В настоящей работе с помощью МД-моделирования было показано, что в отсутствие сдерживающих потенциалов для размещения DHU, α A, ϵ A в активном центре и формирования каталитически компетентного или близкого к нему состояния в случае ИРН-субстратов границы АЦ фермента должны быть смещены за счёт пластичности субстрат-связывающего кармана. Для этого необходимы конформационные перестройки, которые заключаются в вытеснении белковой петли с аминокислотными остатками Asn229-Thr233, названной нами "распознающей", в сторону от повреждения, что уменьшает количество стерических конфликтов с ДНК и предположительно позволяет разместить в АЦ нуклеотиды, содержащие повреждённые азотистые основания. Стоит отметить, что Thr233 и Glu236 являются консервативными остатками среди семейства APE1 (рисунок 13). Известно также, что ферменты APE1 имеют жёсткую форму АЦ, которая практически не меняется при связывании с ДНК-субстратом, содержащим F-сайт [148,155]. Исходя из этого можно предположить, что остатки Thr233 и Glu236 играют важную роль в сохранении формы АЦ и придании ему жёсткости для обладания определённой специфичностью.

Кроме того, отсутствие водородных связей между фосфатной группой повреждения и остатками АЦ в случаях комплексов с α A- и ϵ A-субстратами относительно комплекса с F-сайтом предположительно свидетельствует о сниженной стабильности таких комплексов. Эти данные согласуются с результатами работ, где было показано, что hAPE1 работает намного медленнее на α A- и ϵ A-субстратах, нежели на DHU и тем более F-сайте [8,175].

3.2.2. Сравнительный анализ моделей комплексов ДНК с гомологичными ферментами APE1

После получения моделей комплексов с hAPE1 тем же способом были получены модели комплексов с zAPE1, xAPE1 и Rrp1. Модели комплексов эндонуклеаз с F-сайт-содержащей ДНК были стабильны во время моделирования, структуры ферментов имели СКО менее 1,3 Å, не имели значимых отличий в структурах в целом и оказались практически одинаковыми во взаимном расположении F-сайта и аминокислотных остатков АЦ (рисунок 20). Во всех случаях сохранились три водородные связи описанных ранее остатков АЦ с фосфатной группой F-сайта, а также две водородные связи в петле Asn229-Thr233 (здесь и далее нумерация остатков соответствует последовательности hAPE1).

В моделях комплексов с DHU также не обнаружилось различий: с фосфатной группой взаимодействовали только Asn212 и Tyr171 (рисунок 21), а связи Thr233 O^γ1 - Glu236 O^ε1 и Ala214 N - Gly231 O временно разрывались во время моделирования (рисунок 22, в Rrp1 на месте, аналогичном Ala214 hAPE1, находится серин). СКО при моделировании всех комплексов с DHU не превышало 2 Å.

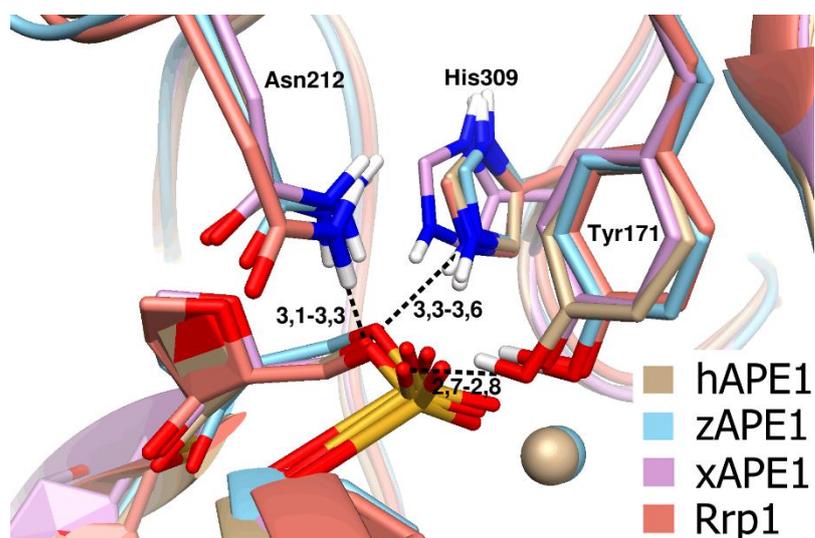


Рисунок 20. Сравнение комплексов АП-эндонуклеаз с F-сайт-содержащей ДНК. Пунктирными линиями соединены пары атомов, между которыми образованы Н-связи. Рядом с пунктирами указаны числовые промежутки, в которых находятся средние значения расстояний между соответствующими атомами в Å. Все значения меньше 3,6 Å, что означает наличие всех необходимых Н-связей.

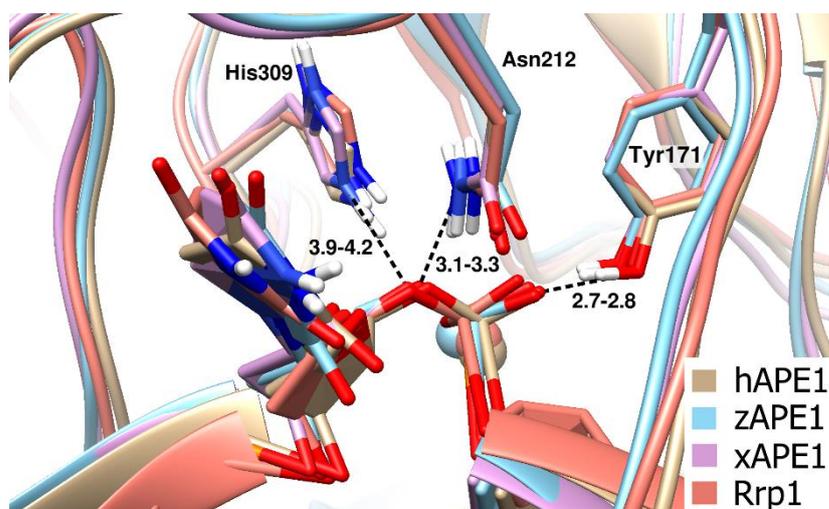


Рисунок 21. Сравнение комплексов АП-эндонуклеаз с ДНК, содержащей DNU. Пунктирными линиями соединены пары атомов, между которыми должны образовываться Н-связи. Рядом с пунктирами указаны числовые промежутки, в которых находятся средние значения расстояний между соответствующими атомами в Å. Значения меньше 3,6 Å есть только у пар Asn212 N^{δ2} - O5' и Tyr171 Oⁿ - O1P, что означает, что данные Н-связи сохранены, а связь His309 N^{ε2} - O5' – нет.

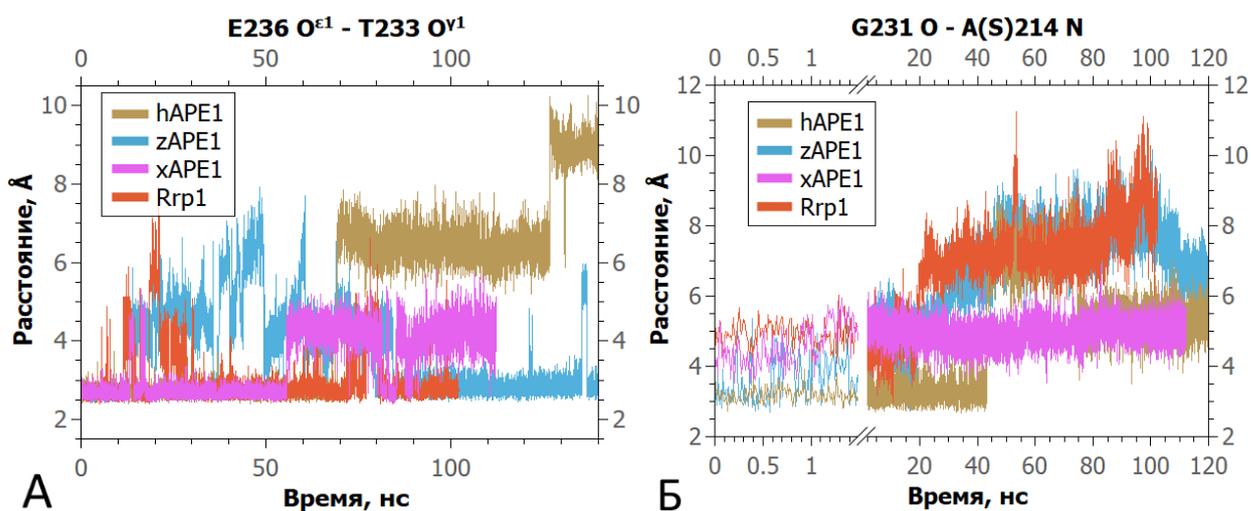


Рисунок 22. Динамика расстояний в Н-связях, образуемых остатками петли Asn229-Thr233, в комплексах АП-эндонуклеаз с ДНК, содержащей DHU. Обе Н-связи хотя бы временно разрываются во время всех траекторий. А) Расстояние Thr233 O γ 1 - Glu236 O ϵ 1. Б) Расстояние Ala(Ser)214 N - Gly231 O.

Среди комплексов с α A выделялся комплекс с Rrp1. В случаях с hAPE1, zAPE1 и xAPE1 полученные модели можно описать таким же образом, как и ранее был описан комплекс с hAPE1: отсутствует Н-связь между Asn212 и фосфатной группой повреждения, а также отсутствуют обе важные связи остатков петли Asn229-Thr233 - Thr233 O γ 1 - Glu236 O ϵ 1 и Ala214 N - Gly231 O (рисунки 23, 24). В то же время в комплексе с Rrp1 отсутствовали сразу две связи между α A и каталитическими остатками: не только между Asn212 N δ 2 - α A O5', но и между His309 N ϵ 2 - 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: основание не повернуто в сторону Asn212, а 2'-дезоксирибоза располагается в среднем несколько дальше от АЦ. Таким образом, α A не достиг каталитически компетентного состояния в комплексе с Rrp1, тем не менее полученное состояние было стабильным, и СКО при моделировании не превышало 2 Å.

Чтобы понять причины различий в положениях α A между комплексом с Rrp1 и остальными комплексами, была исследована окрестность повреждённого нуклеотида. Значительные отличия наблюдались для конформаций ДНК и белка с 3'-стороны от α A (рисунок 25). Помимо сдвига 2'-дезоксирибозы α A на 1,5-2 Å дальше от АЦ (относительно остальных комплексов) наблюдался сдвиг ещё и двух следующих нуклеотидов повреждённой цепи ДНК в сторону от белка.

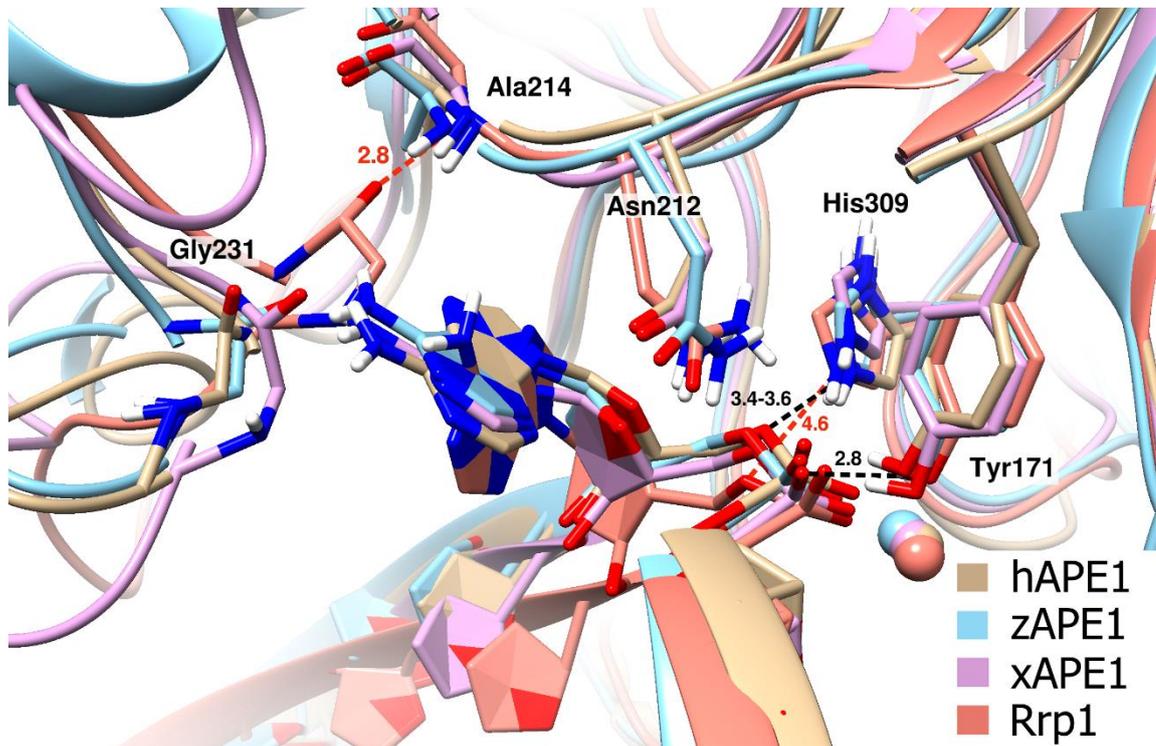


Рисунок 23. Сравнение комплексов АП-эндонуклеаз с ДНК, содержащей αA . Во всех комплексах отсутствует связь $\text{Asn212 N}^{\delta 2} - \alpha A \text{ O5}'$, в комплексе с Rrp1 дополнительно отсутствует связь $\text{His309 N}^{\epsilon 2} - \alpha A \text{ O5}'$, а связь $\text{Ala214 N} - \text{Gly231 O}$ наоборот стабильна (средние расстояния между соответствующими атомами обозначены красным).

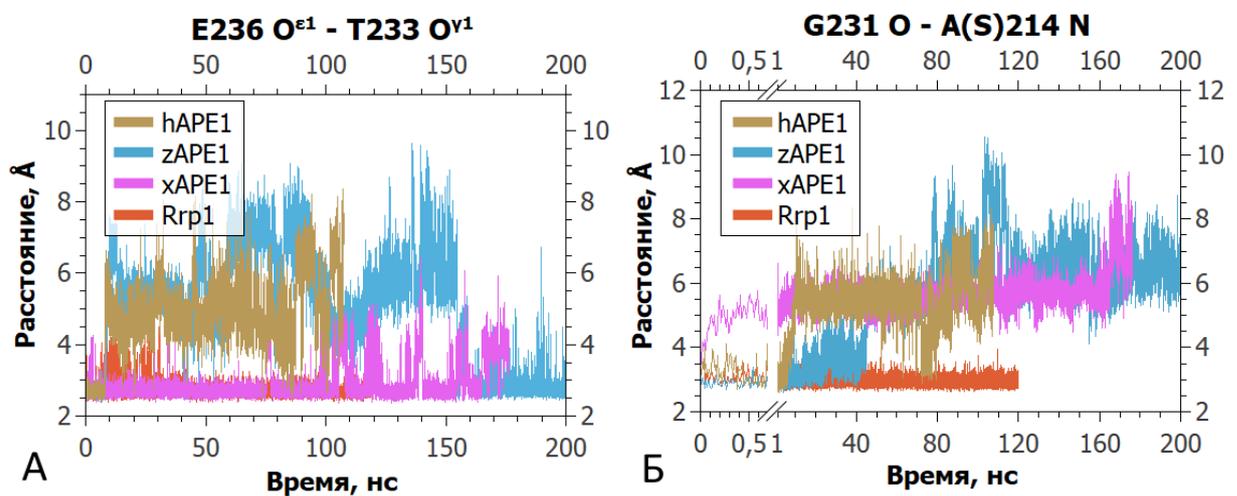


Рисунок 24. Динамика расстояний в Н-связях, образуемых остатками петли Asn229-Thr233, в комплексах АП-эндонуклеаз с ДНК, содержащей αA . Обе Н-связи хотя бы временно разрываются во время траекторий с hAPE1, zAPE1 и xAPE1, в то время как в комплексе с Rrp1 обе связи устойчивы. А) Расстояние $\text{Thr233 O}^{\gamma 1} - \text{Glu236 O}^{\epsilon 1}$. Б) Расстояние $\text{Ala(Ser)214 N} - \text{Gly231 O}$.

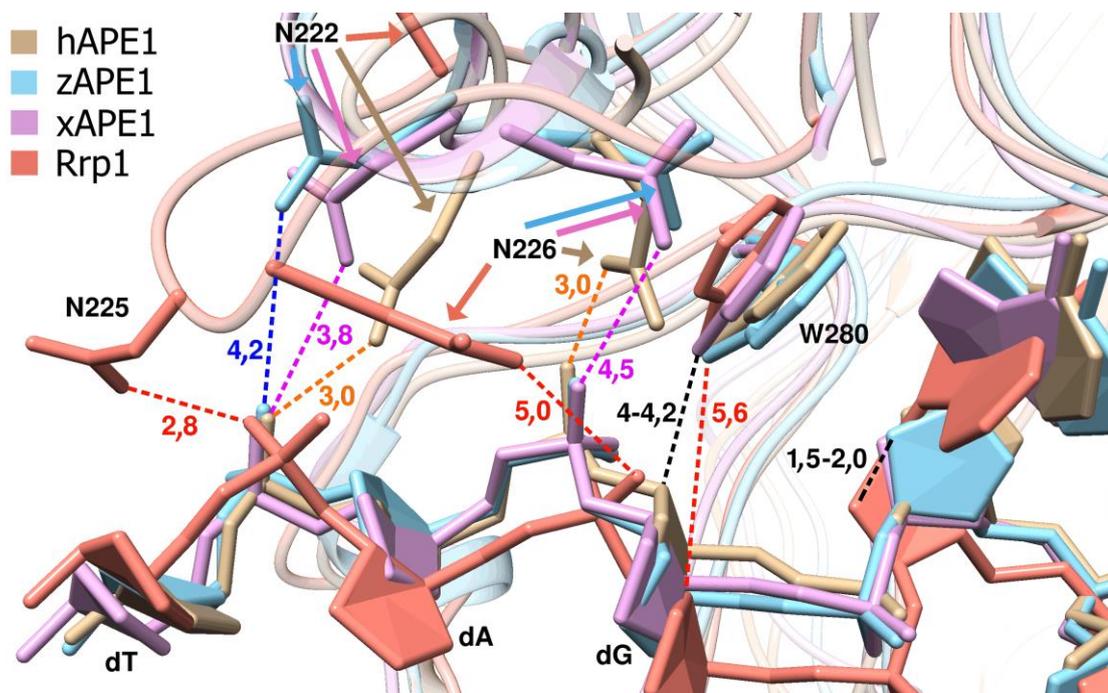


Рисунок 25. Сравнение комплексов АП-эндонуклеаз с ДНК, содержащей αА с видом на часть распознающей петли с остатками Asn222-Lys228, взаимодействующей с ДНК с 3'-стороны от повреждения. В случаях с hAPE1, zAPE1 и xAPE1 с ДНК могут взаимодействовать остатки Asn222, Asn226 и Trp280. В комплексе с Rrp1 вместо трёх этих связей есть только одна – с Asn225.

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 слабые нерегулярные взаимодействия с ДНК за счёт двух остатков аспарагина - Asn222 и Asn226, - то в комплексе с Rrp1 оба этих остатка не взаимодействовали с ДНК. Вместо них с ДНК взаимодействовал 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 остовами нуклеотидов, что влечёт за собой смещение ДНК в сторону от белка и увеличение расстояний до важных аминокислотных остатков фермента. Кроме того, следует отметить, что в случаях hAPE1, zAPE1 и xAPE1 образуется стабилизирующий контакт между Trp280 и фосфатной группой соседнего нуклеотида, тогда как для Rrp1 эта связь отсутствует за счёт смещения сахарофосфатного остова из АЦ.

Среди комплексов с εА уже не обнаружилось таких больших различий между структурами для четырёх разных белков, как в случае с комплексами с αА. Повреждённый

нуклеотид занимал примерно одинаковые положения в АЦ всех изученных ферментов (рисунок 26). В комплексах с hAPE1 и zAPE1 сохранялась лишь одна связь между фосфатом ϵ A и остатками АЦ - Tyr171 Oⁿ - ϵ A O1P. При этом было установлено, что в двух других комплексах также оставалась стабильной связь Asn212 N ^{δ^2} - α A O5'. Однако связи Thr233 O ^{γ^1} - Glu236 O ^{ϵ^1} и Ala214 N - Gly231 O разрывались во всех случаях (рисунок 27). СКО во всех траекториях не превышало 2 Å.

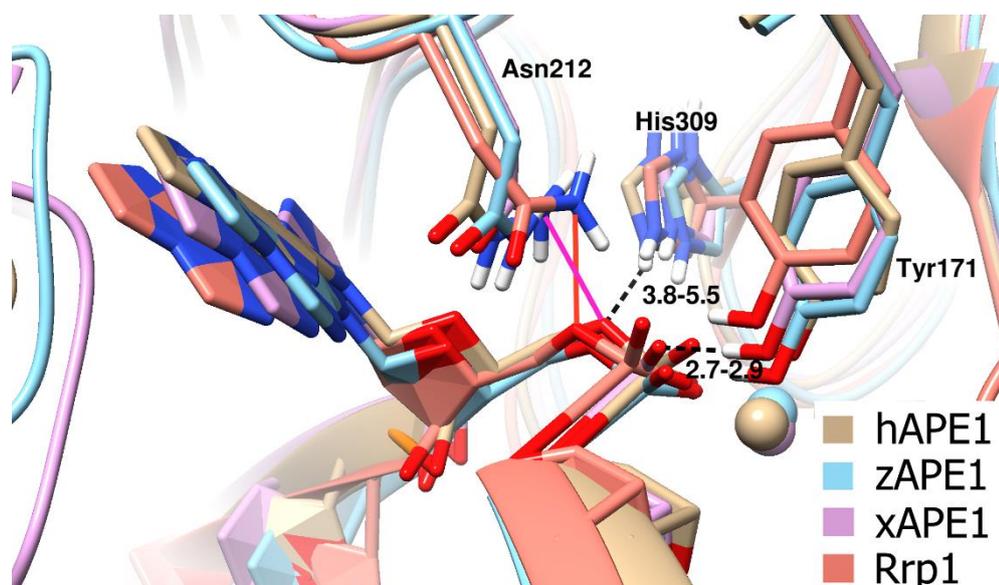


Рисунок 26. Сравнение комплексов АП-эндонуклеаз с ДНК, содержащей ϵ A. Во всех комплексах отсутствует связь His309 N ^{ϵ^2} - ϵ A O5', в комплексах с hAPE1 и zAPE1 дополнительно отсутствует связь Asn212 N ^{δ^2} - ϵ A O5'.

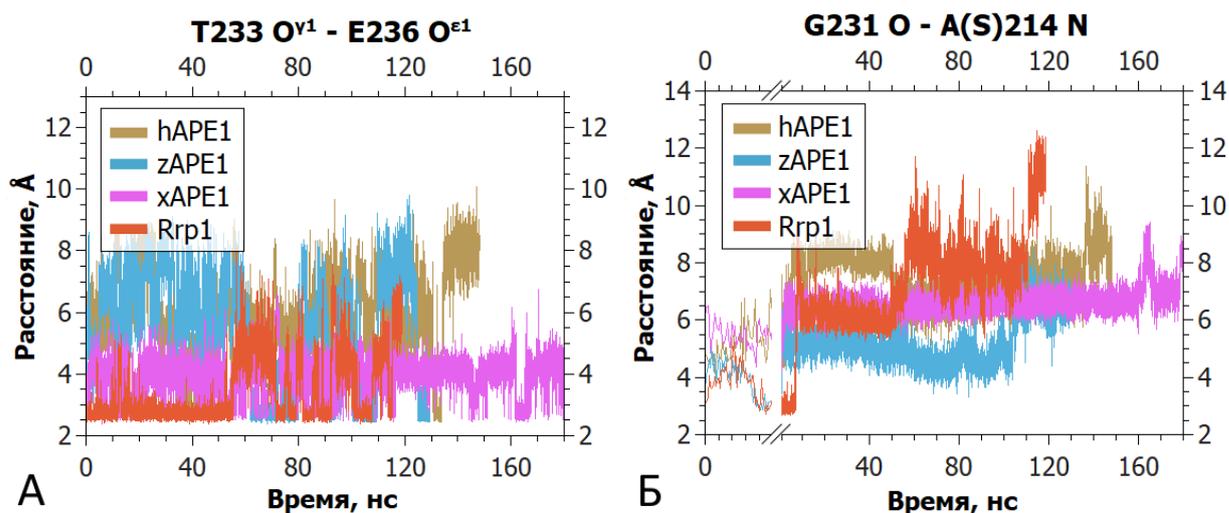


Рисунок 27. Динамика расстояний в петле Asn229-Thr233 в комплексах с ϵ A. Обе Н-связи хотя бы временно разрываются во время траекторий с hAPE1, zAPE1 и xAPE1, в то время как в комплексе с Rrp1 обе связи устойчивы. А) Расстояние Thr233 O ^{γ^1} - Glu236 O ^{ϵ^1} . Б) Расстояние Ala(Ser)214 N - Gly231 O.

Таким образом, на основе сравнения моделей комплексов четырёх АРЕ1-подобных эндонуклеаз можно сделать два основных заключения. Во-первых, в отличие от F-сайта принятие нуклеотидами с повреждёнными основаниями положения, характерного для каталитически компетентного состояния, требует разрыва двух внутрибелковых связей, уменьшающих подвижность вторичной структуры белковой глобулы, а именно происходит потеря контактов Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε1} и Ala(Ser)214 N - Gly231 O, стабилизирующих участок с Asn229 по Glu236 вблизи активного центра. После разрыва данных связей, петля Asn229-Thr233 отодвигается от основания повреждённого нуклеотида без чего, по-видимому, повреждённое основание не может быть расположено в АЦ. Второй вывод заключается в структурном обосновании того, что Rrp1 должен иметь заметно более низкую активность по отношению к ДНК, содержащей альфа-аденозин, т.к. в моделировании не удалось получить комплекс αA-Rrp1 в каталитически компетентном состоянии. Действительно, в работе [222], посвящённой сравнительному анализу активностей АРЕ1-подобных АП-эндонуклеаз, было экспериментально показано, что Rrp1 не проявляет активности по отношению к αA-субстрату.

3.2.3. Моделирование траекторий выворачивания нуклеотидов в активный центр zARE1

Для моделирования выворачивания нуклеотидов были выбраны две белковые структуры: фермент дикого типа zARE1 и его мутантная форма, содержащая замену Glu236Ala. Был выбран фермент из *D. rerio*, так как этот организм является известным модельным организмом, подходящим для исследования многих биологических и биохимических процессов, в том числе процессов репарации ДНК, на котором в будущем теоретически могут быть опробованы полученные результаты и выяснена биологическая роль исследуемых замен. Перед созданием комплексов с белками, ДНК-дуплексы были промоделированы в течение 100 нс в свободном состоянии с повреждёнными нуклеотидами, находящимися внутри спирали ДНК. Затем для обоих белков были построены комплексы с данными ДНК-дуплексами. Для этих комплексов также было проведено моделирование в течение 300 нс без приложения дополнительных сил для уравнивания системы. Во всех случаях значения СКО не превышали 2 Å.

В комплексах с F-сайтом для выворачивания повреждённого нуклеотида прилагать дополнительные силы не требовалось – F-сайт переходил в конечное состояние самостоятельно в течение нескольких наносекунд в комплексах с обоими белками. Таким образом, в траектории выворачивания F-сайта можно выделить всего два относительно стабильных положения: начальное (внутри спирали ДНК) и конечное, каталитически компетентное

(рисунки 28), в котором имеются водородные связи с тремя остатками активного центра Tyr171, Asn212 и His309. В начальном же состоянии фосфатная группа F-сайта имеет только одну водородную связь с ферментом – между O1P и Asn212 N^{δ2}. На рисунке 29 показана динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N, Thr233 O_{γ1} - Glu236 O_{ε1}), и между атомом F-сайта C1' и атомами, относительно которых в дальнейшем будут прикладываться дополнительные силы: dG N9 и Asn212 C.

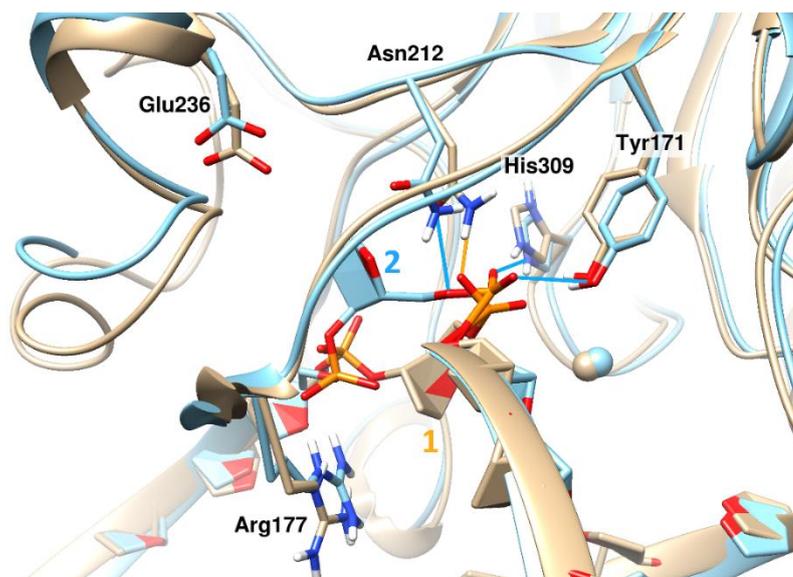


Рисунок 28. Начальное (бежевое) и конечное (голубое) положения F-сайта в траектории выворачивания повреждение в активный центр zAPE1 дикого типа и Glu236Ala. Цветными линиями показаны образующиеся водородные связи между повреждением и ферментом.

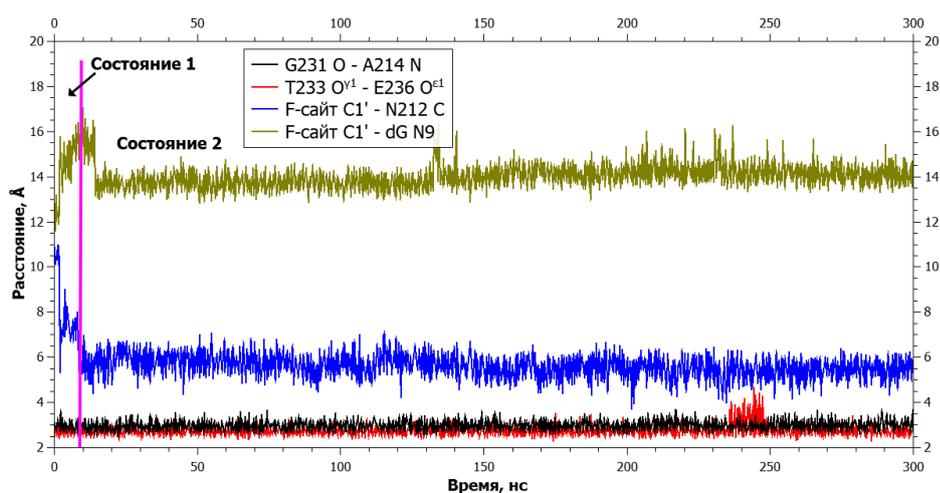


Рисунок 29. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N, Thr233 O_{γ1} - Glu236 O_{ε1}), и между атомами F-сайт C1' - dG N9, F-сайт C1' - Asn212 C. Вертикальной линией показан момент перехода между состояниями.

Выворачивание DHU уже не происходило самостоятельно, что означало необходимость применения дополнительной силы. 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 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 должно предположительно происходить движение нуклеотида. Во-вторых, угол между вектором силы и *N*-гликозидной связью должен быть как можно ближе к 90° для наибольшей эффективности силы. Из-за второго условия пришлось использовать два разных атома в парах с N1/N9, так как среди атомов остатков активного центра не нашлось атомов, находящихся под достаточным углом к *N*-гликозидной связи в начальном состоянии комплекса. Поэтому в начале моделирования траектории выворачивания происходило отталкивание от *N*-гликозидного азота противоположного основания. Далее уже действовала сила притяжения к атому C Asn212, который является ближайшим атомом к *N*-гликозидным азотам повреждённого нуклеотида среди атомов активного центра.

При выворачивании DHU в комплексах с обоими белками оказалось достаточным единовременное действие одной дополнительной силы: в начале траектории действовала сила отталкивания атомов противоположных оснований DHU N1 - dG N9, далее действовала сила притяжения между атомами DHU N1 и Asn212 C. Траектория выворачивания DHU содержала помимо начального и конечного положений ещё два квазистабильных промежуточных положения, из которых не происходило самостоятельного продолжения выворачивания в течение 300 нс. Эти положения также были одинаковы для обоих ферментов (рисунок 30). В первом (начальном) положении DHU не имеет водородных связей с ферментом, но при его выворачивании из двойной спирали такие контакты постепенно образуются (рисунок 30): во втором положении появилась связь DHU O1P - Tyr171 Oⁿ, в третьем – ещё 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 (рисунок 30).

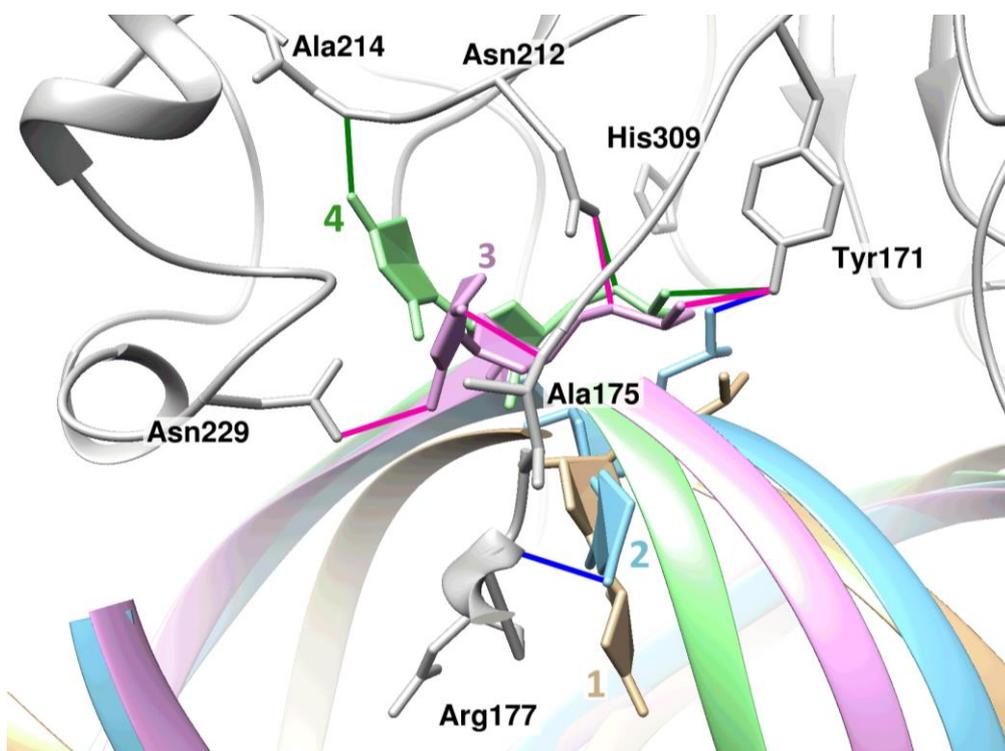


Рисунок 30. Репрезентативные структуры, характеризующие процесс выворачивания повреждённого нуклеотида, содержащего DHU. Помимо начального (бежевого) и конечного (зелёного) положений, DHU проходит через два квазистабильных промежуточных положения. В этих положениях повреждённое основание образует специфические контакты с остатками ДНК-связывающего и активного центров фермента: во втором положении – DHU O4 - Arg177 N (выделена синим), во третьем – DHU O2 - Asn229 N^{δ2} и DHU O4 - Ala175 N (выделены розовым).

Кроме постепенного образования связей с ферментом, закономерным образом сокращались и расстояния между атомами повреждённого нуклеотида и аминокислотными остатками активного центра. На рисунках 31, 32 показана динамика изменения расстояний (между атомами Gly231 O - Ala214 N, Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε1}, DHU N1 - dG N9 и DHU N1 - Asn212 C. Из графиков видно, что при переходах между положениями происходят довольно резкие скачки средних значений расстояний между атомами. При переходе из начального положения во второе в первую очередь увеличивается расстояние между атомами DHU N1 и dG N9, между которыми действовала сила отталкивания, но при этом сокращалось и расстояние DHU N1 - Asn212 C. При втором переходе большой скачок претерпевало уже расстояние между DHU N1 и Asn212 C.

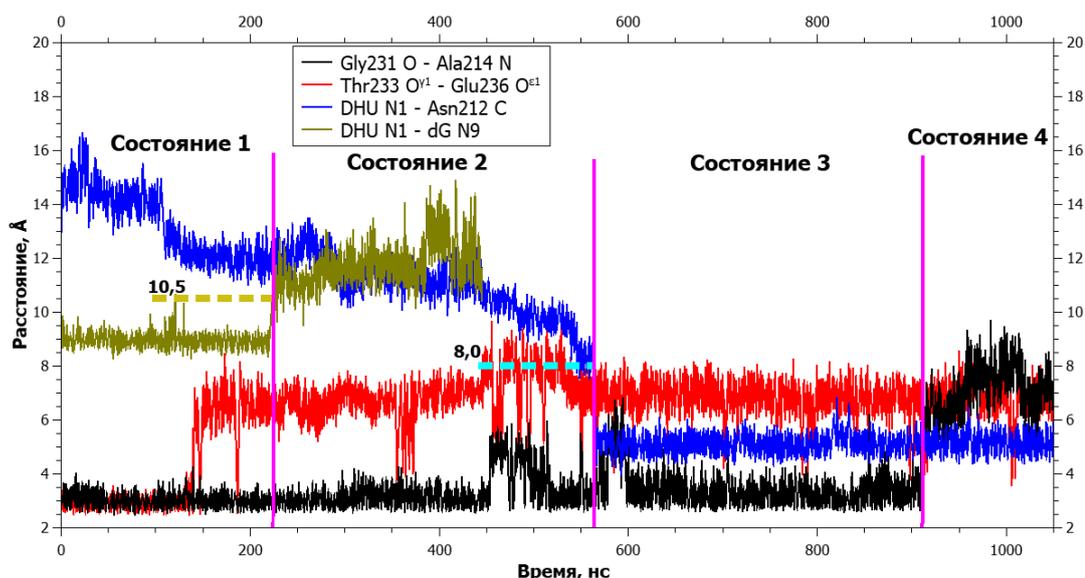


Рисунок 31. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N, Thr233 O γ^1 - Glu236 O ϵ^1), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (DHU N1 - dG N9, DHU N1 - Asn212 C), при выворачивании DHU в комплексе с ферментом дикого типа. Вертикальными линиями показаны моменты переходов между состояниями. Пунктирными линиями обозначено действие дополнительных сил: высота соответствует значению расстояния, до которого действовала сила, а левая и правая границы задают временной промежуток действия.

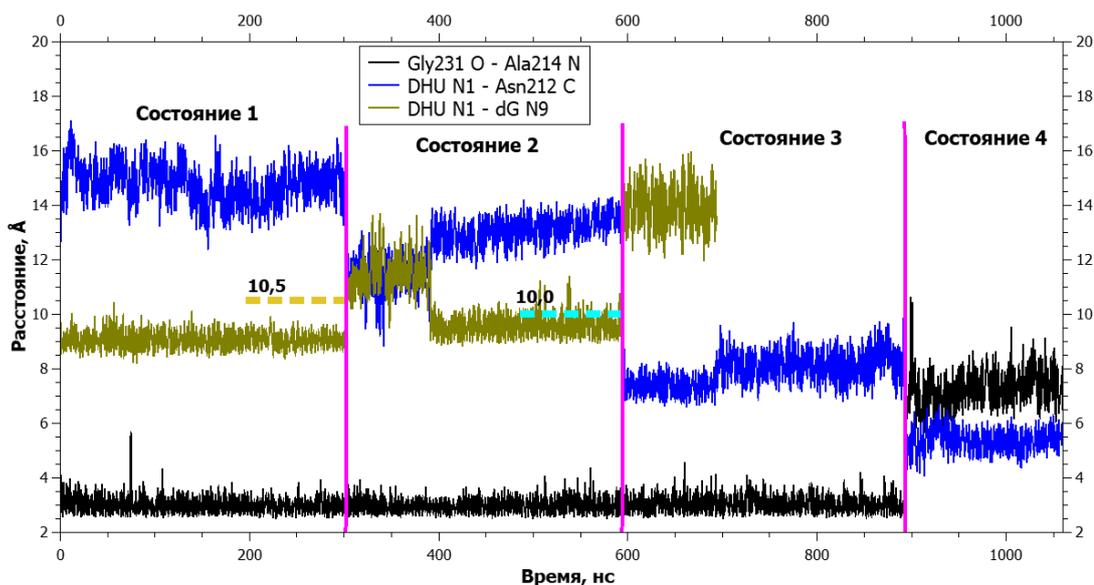


Рисунок 32. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (DHU N1 - dG N9, DHU N1 - Asn212 C), при выворачивании DHU в комплексе с ферментом zAPE1 Glu236Ala.

При переходе в конечное положение дополнительные силы не действовали ни в одном из комплексов (таблица 2), повреждённое основание самостоятельно «доворачивалось» в карман активного центра с одновременным перестроением распознающей петли и разрывом связи Gly231 O - Ala214 N. Кроме того, в случае мутантной формы zAPE1 Glu236Ala в конце траектории наблюдалось ещё некоторое сокращение расстояния DHU N1 - Asn212 C (рисунок 32), чего не происходило в ферменте дикого типа. Интересно отметить, что в ферменте дикого типа водородная связь Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε1} разрывалась ещё в начальном положении при действии силы DHU N1 - dG N9.

Таблица 2. 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 атомов DHU N1 и dG N9, |
| 2→3 | | 3 | Притяжение атомов DHU N1 и Asn212 C |
| 3→4 | | 0 | - |

При выворачивании повреждённого нуклеотида, содержащего урацил, в активный центр фермента дикого типа оказалось, что одной дополнительной силы недостаточно для перехода основания из второго положения (рисунок 33, голубая структура) в третье (рисунок 33, розовая структура). Препятствием на пути выворачивания урацила является белковая петля с остатками Val172-Arg177, которую основание не могло "пройти" ни при какой притягивающей в активный центр силе вплоть до 100 кДж/(моль•нм), при которой происходило разрушение комплекса.

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 остатка Ser176. При этом аналогичный переход DHU происходил, как уже было описано, при действии единственной силы притяжения к Asn212 C.

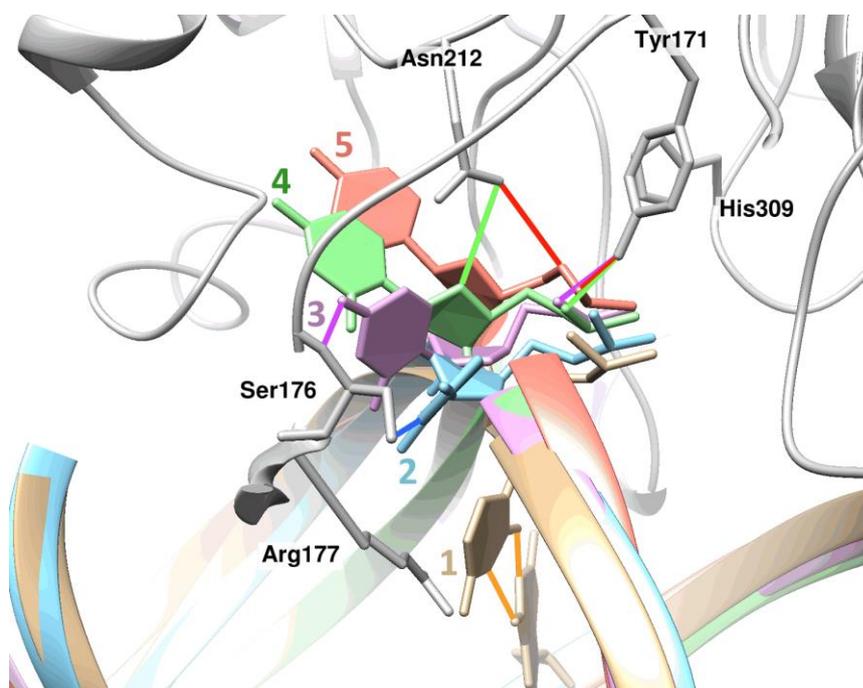


Рисунок 33. Репрезентативные структуры, характеризующие процесс выворачивания повреждённого нуклеотида, содержащего dU. Помимо начального (бежевого) и конечного (красного) состояний показаны три квазистабильных промежуточных положения основания в процессе выворачивания – второе (голубое), третье (розовое) и четвёртое (зелёное). В этих положениях повреждённое основание образует следующие специфические контакты с ферментом: во втором положении – dU N3 - Ser176 O γ (выделена синим), в третьем положении – dU O4 - Ser176 N (выделена зелёным). В четвёртом положении специфических контактов урацила с ферментом не образовывалось.

Сравнение структуры с урацилом во втором положении со структурами всех повреждений в конечных положениях, полученных в предыдущем разделе, 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 основания необходимо увеличение расстояния между этими петлями. При моделировании с одной дополнительной силой притяжения между dU N1 и Asn212 C это не происходило, поэтому было решено применить вторую дополнительную силу – силу отталкивания двух белковых петель (рисунок 34). Данная сила была приложена к атомам Ala230 C α и Ser176 N, расположенным в самом центре «механического» контакта петель Val172-Arg177 и Asn229-Gly231. 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) выворачивание основания продолжилось и происходил переход в третье положение. В последующих двух переходах до конечного положения применение дополнительной силы отталкивания двух белковых петель, действующей между атомами Ala230 C^α и Ser176 N, уже не требовалось. В последнем переходе не требовалось также и действие притягивающей силы между атомами dU N1 и Asn212 C.

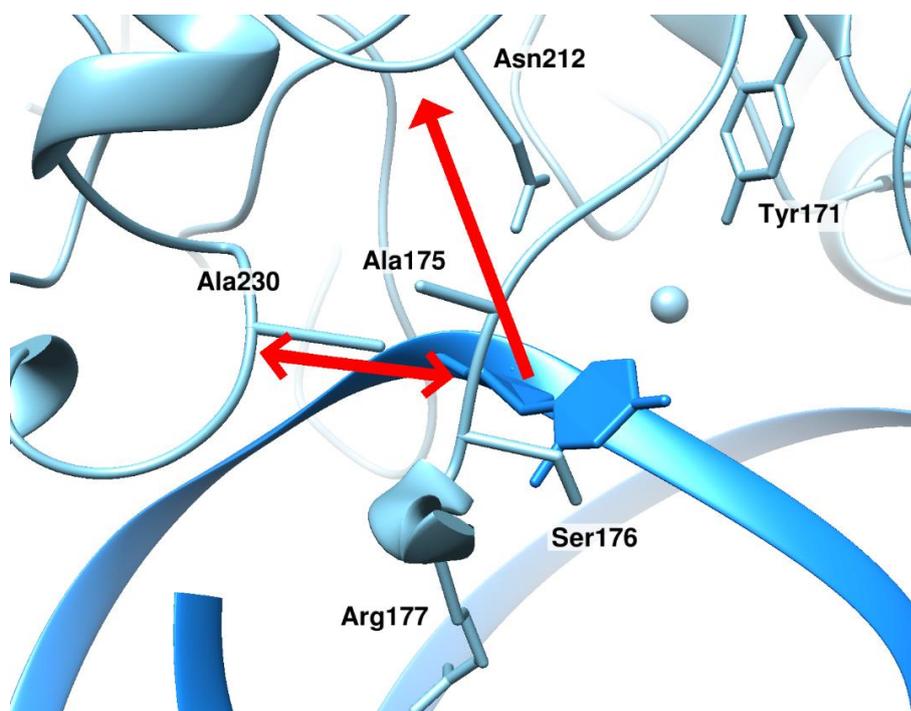


Рисунок 34. При выворачивании дезоксиуридина (dU), альфа-аденозина (αA) и этеноаденозина (εA) в определённых положениях применялись одновременно две дополнительные силы – сила притяжения основания к активному центру (*N*-гликозидный атом азотистого основания и Asn212 C, вертикальная стрелка) и сила отталкивания двух белковых петель (атомы Ala230 C^α и Ser176 N, горизонтальная двусторонняя стрелка).

При моделировании выворачивания dU в комплексе с мутантной формой Glu236Ala выяснилось, что урацил проходит через те же квазистабильные промежуточные состояния, что и в комплексе с ферментом дикого типа. То есть траектории выворачивания dU для обеих форм фермента одинаковы, как и в случае с DHU. В комплексе с мутантной формой Glu236Ala также пришлось применять 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 дикого типа, где была необходима сила минимум 7,5 кДж/(моль•нм) (таблица 3). Примечательно, что в обоих ферментах по-

сле перехода в третье состояние, то есть после "перехода" основания через белковую петлю Val172-Arg177, уже не требовалось действие дополнительных сил для дальнейшего выворачивания.

Таблица 3. Величины дополнительных сил в комплексах с dU (кДж/(моль•нм)), 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 атомов dU N1 и dG N9 |
| 2→3 | 4 | | Притяжение атомов dU N1 и Asn212 C |
| | 7,5 | 5 | Отталкивание атомов Ala230 C ^α и Ser176 N |
| 3→4 | 0 | | - |
| 4→5 | 0 | | - |

Из графиков динамики расстояний (рисунок 35) видно, что, в отличие от случая с DHU, при выворачивании урацила водородная связь Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε1} в ферменте дикого типа теряет стабильность не в самом начале траектории, а при переходе в третье положение. В то же время водородная связь Gly231 O - Ala214 N, как и в случае с DHU, разрывается только при переходе в конечное положение в обоих ферментах (рисунки 35, 36).

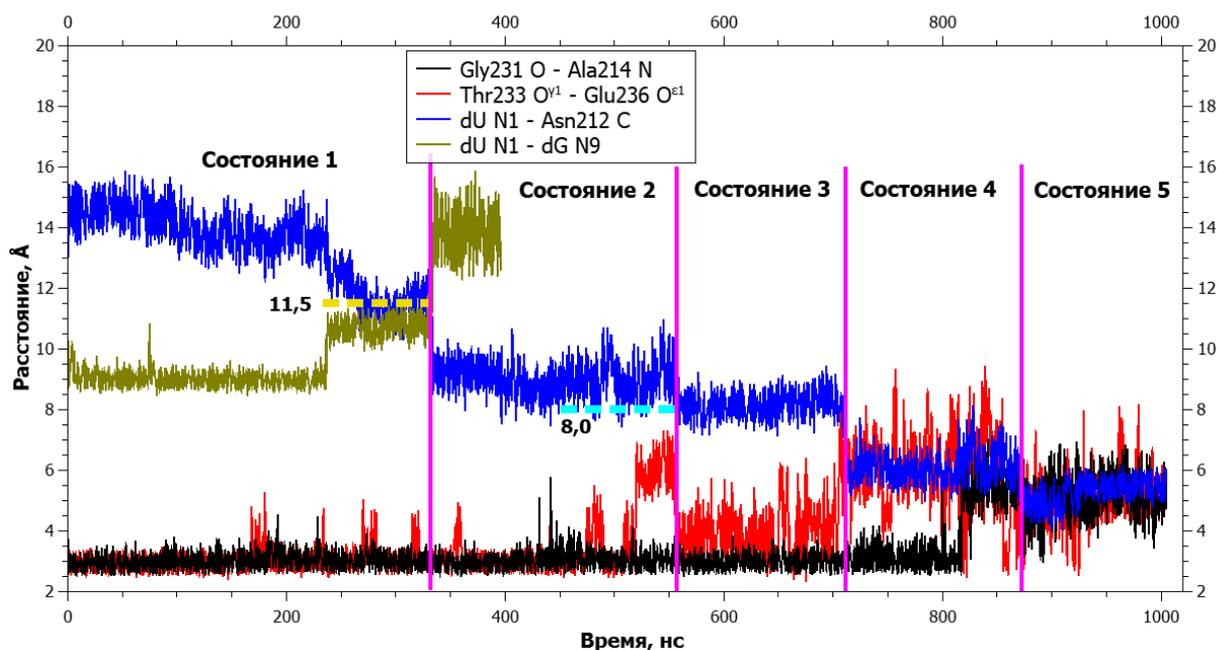


Рисунок 35. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N, Thr233 O γ^1 - Glu236 O ϵ^1), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (dU N1 - dG N9, dU N1 - Asn212 C), при выворачивании dU в комплексе с ферментом zAPE1 дикого типа.

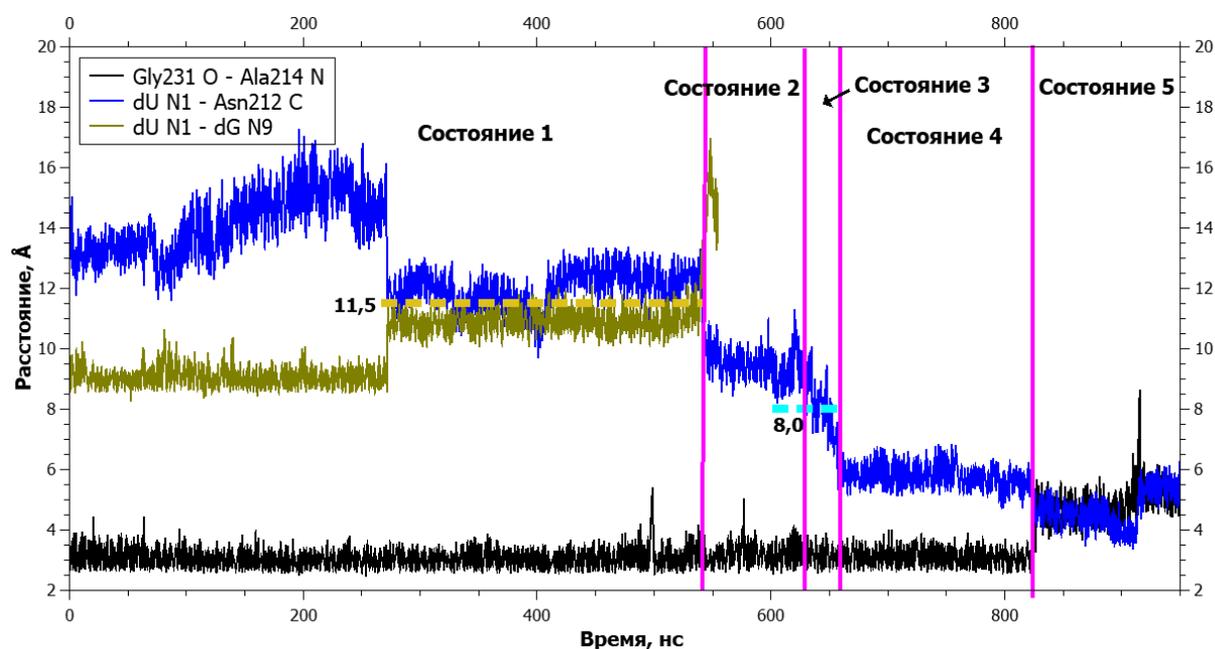


Рисунок 36. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (dU N1 - dG N9, dU N1 - Asn212 C), при выворачивании dU в комплексе с ферментом zAPE1 Glu236Ala.

Выворачивание альфа-аденозина у обоих ферментов проходило через три промежуточных состояния (рисунок 37), также как и в случае с урацилом. Кроме того, для одного из переходов, а именно для перехода в четвертое состояние, требовалось применять силу отталкивания белковых петель. Причём оказалось, что величины этих сил равны величинам сил для случая с урацилом (таблица 4), и для мутантной формы требуется в полтора раза меньшая сила.

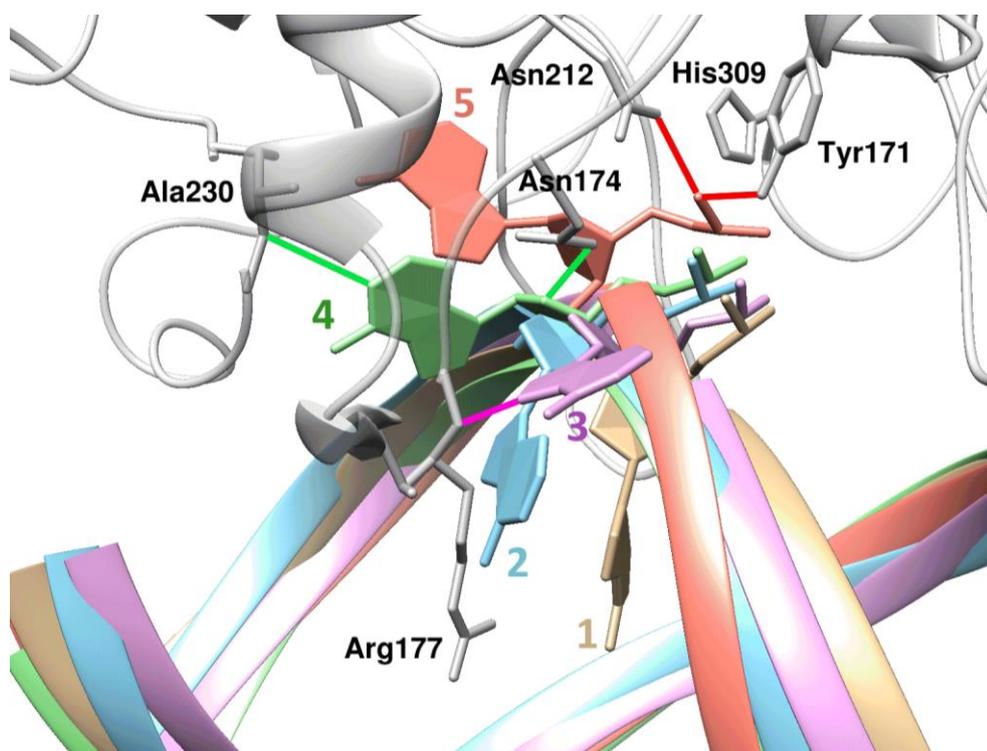


Рисунок 37. Репрезентативные структуры, характеризующие процесс выворачивания повреждённого нуклеотида, содержащего α A. Показано три квазистабильных промежуточных положения нуклеотида (голубое, розовое, зелёное). В третьем и четвертом положениях основание образует следующие специфические контакты с ферментом: в третьем – α A N7 - Arg177 N (выделена розовым), в четвертом – α A N1 - Ala230 N и α A O4' - Asn174 N ^{δ 2} (выделены зелёным). Связи фосфатной группы с Asn212 N ^{δ 2} и Tyr171 Oⁿ образовывались только в конечном положении.

Таблица 4. Величины дополнительных сил в комплексах с αA (кДж/(моль \cdot нм)), требовавшихся для переходов нуклеотида из одного положения в следующее при выворачивании

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

Следует отметить, что конечное положение основания альфа-аденозина при моделировании полной траектории не совпало с положением, смоделированным ранее (рисунки 23, 37). В моделях комплексов, описанных в разделах 3.2.1 и 3.2.2 данной работы, аденин был повернут пятичленным циклом в сторону кармана активного центра. Такое положение задавалось изначально, на основе результатов работы [8]. Во время моделирования комплексов в каталитически компетентном состоянии основание αA вращалось вокруг *N*-гликозидной связи и в итоге располагалось 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 активный центр своим шестичленным циклом и ориентировано в таком положении до конца моделирования. Таким образом, модели структур с альфа-аденозином, полученные в предыдущих разделах, и положение повреждённого нуклеотида в них можно понимать как результат незавершённого перестроения повреждения в сторону оптимального положения, которое не завершилось из-за недостаточного времени моделирования.

Связь Thr233 O $^{\gamma 1}$ - Glu236 O $^{\epsilon 1}$ в ферменте дикого типа теряет стабильность в четвёртом положении (рисунок 38). Водородная связь Gly231 O - Ala214 N в ферменте дикого типа разрывается только после перехода в конечное положение, в то время как в ферменте zAPE1 Glu236Ala она теряет стабильность уже при переходе в четвёртое положение (рисунок 39).

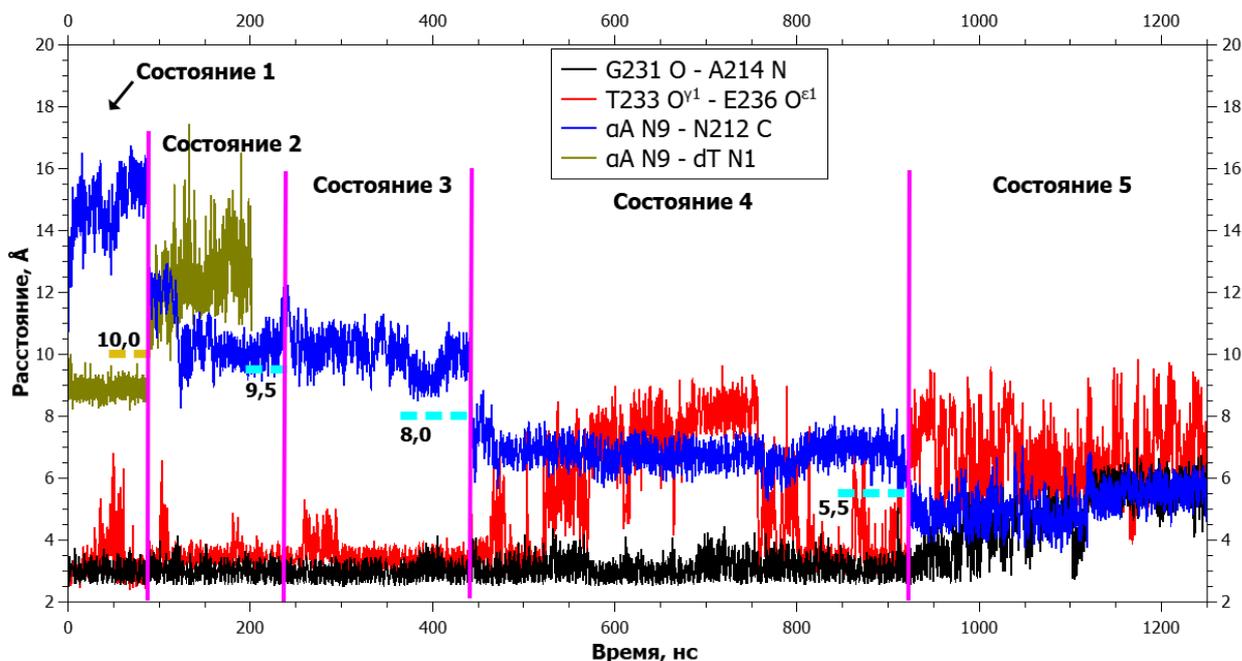


Рисунок 38. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N, Thr233 O^{γ1} - Glu236 O^{ε1}), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (αA N9 - dT N1, αA N9 - Asn212 C), при выворачивании αA в комплексе с ферментом дикого типа.

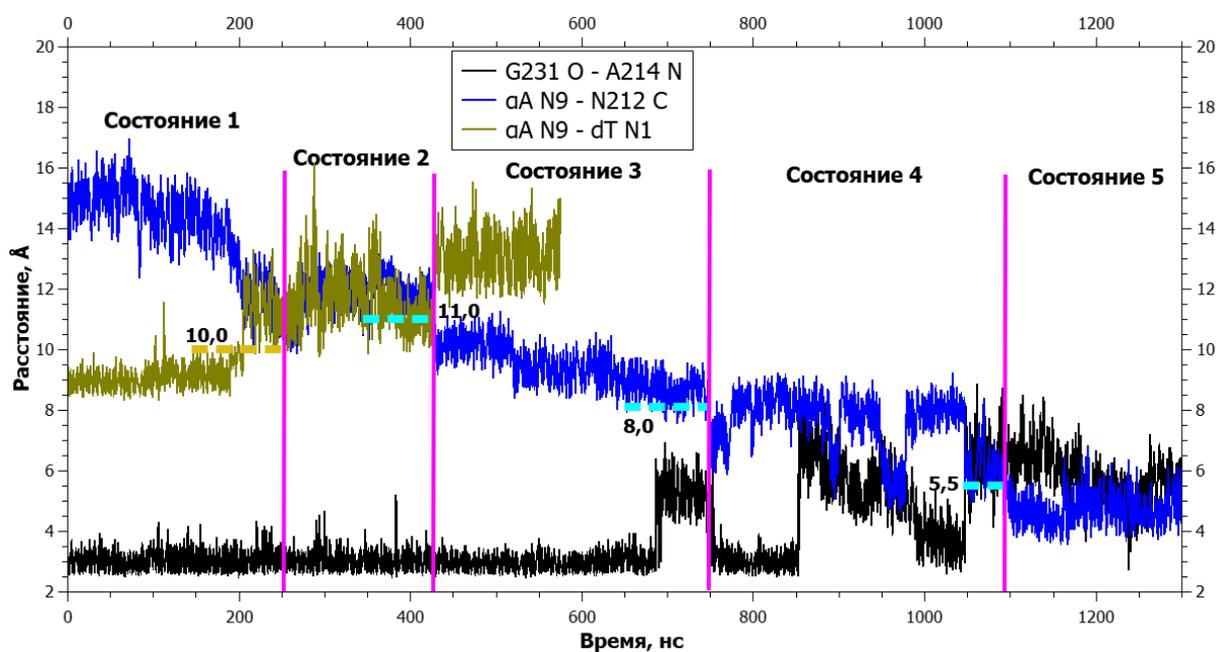


Рисунок 39. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (αA N9 - dT N1, αA N9 - Asn212 C), при выворачивании αA в комплексе с ферментом zAPE1 Glu236Ala.

1,N6-Этеноаденозин при выворачивании проходил через два промежуточных состояния в комплексах обоих ферментов (рисунок 40). Неожиданно оказалось, что при выворачивании данного нуклеотида в обоих комплексах не требуется применение дополнительной силы между атомами Ala230 C^α и Ser176 N, расталкивающей белковые петли на пути основания (таблица 5). 1,N6-Этеноаденозин изначально располагался с стороны от белковой петли Val172-Arg177, с которой могло продолжиться выворачивание, и по всей видимости вынуждал эту петлю отдаляться от петли Asn229-Gly231.

Рассматривая структуру комплекса с εА в начальном положении (рисунок 40, бежевая структура) становится понятным, что εА имеет настолько объёмное основание, что вынуждает боковую цепь Arg177, находящуюся изначально напротив повреждённого основания, смещаться в сторону ещё при моделировании комплекса в начальном положении. Причём смещение во всех репликах идёт в 5'-сторону от повреждения. В случаях остальных промоделированных повреждений боковая цепь Arg177 либо остаётся напротив повреждения (в комплексах с dU и αА), либо смещается в 3'-сторону от повреждения (в комплексах с DHU). Судя по всему, такое поведение Arg177 и задаёт направление всей траектории.

Таблица 5. Величины дополнительных сил в комплексах с εА (кДж/(моль•нм)), требовавшихся для переходов нуклеотида из одного положения в следующее при выворачивании

| Переход | zAPE1 | zAPE1 Glu236Ala | Тип силы |
|---------|-------|-----------------|------------------------------------|
| 1→2 | | 7 | Отталкивание атомов εА N9 и dG N9 |
| 2→3 | | 4 | Притяжение атомов εА N9 и Asn212 C |
| 3→4 | | 5 | Притяжение атомов εА N9 и Asn212 C |

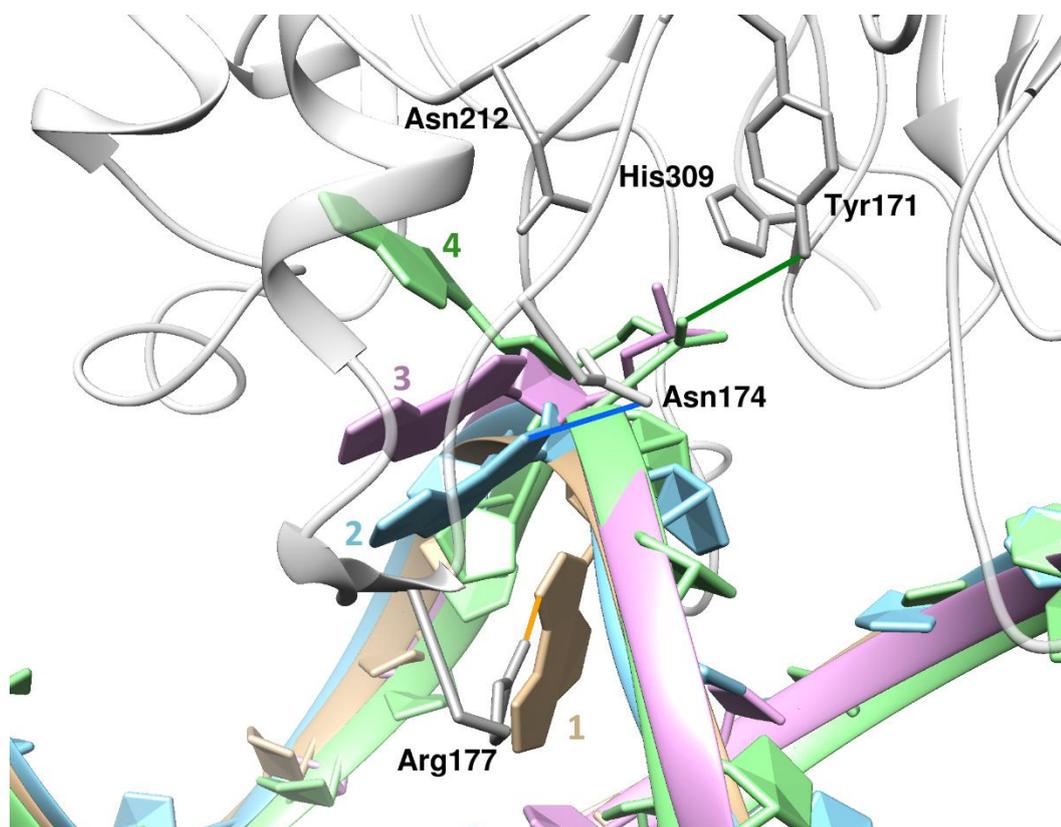


Рисунок 40. Репрезентативные структуры, характеризующие процесс выворачивания повреждённого нуклеотида, содержащего ϵ A. Основание проходит через два квазистабильных промежуточных положения (выделены голубым и зелёным цветом). В начальном положении (бежевое) 1,N6-этноаденозин образует водородную связь с Arg177 за счёт своего атома N7. Во втором положении образуется связь ϵ A N7 - Asn174 N δ^2 . Единственная связь фосфатной группы с остатками АЦ (Tyr171) образовывалась только в конечном положении (розовое).

Связь Thr233 O γ^1 - Glu236 O ϵ^1 в ферменте ДТ теряла стабильность уже в начальном положении до действия каких-либо дополнительных сил (рисунок 41). Водородная связь Gly231 O - Ala214 N в комплексах обоих ферментов разрывалась только после перехода в конечное положение (рисунки 41, 42).

Другим интересным наблюдением является то, что в отличие от альфа-аденозина, основание 1,N6-этноаденозина хоть и поворачивалось вокруг своей N-гликозидной связи при выворачивании, но не разворачивалось на 180 градусов. После выворачивания ϵ A занимал то же положение, что и при моделировании только конечного состояния (рисунок 26).

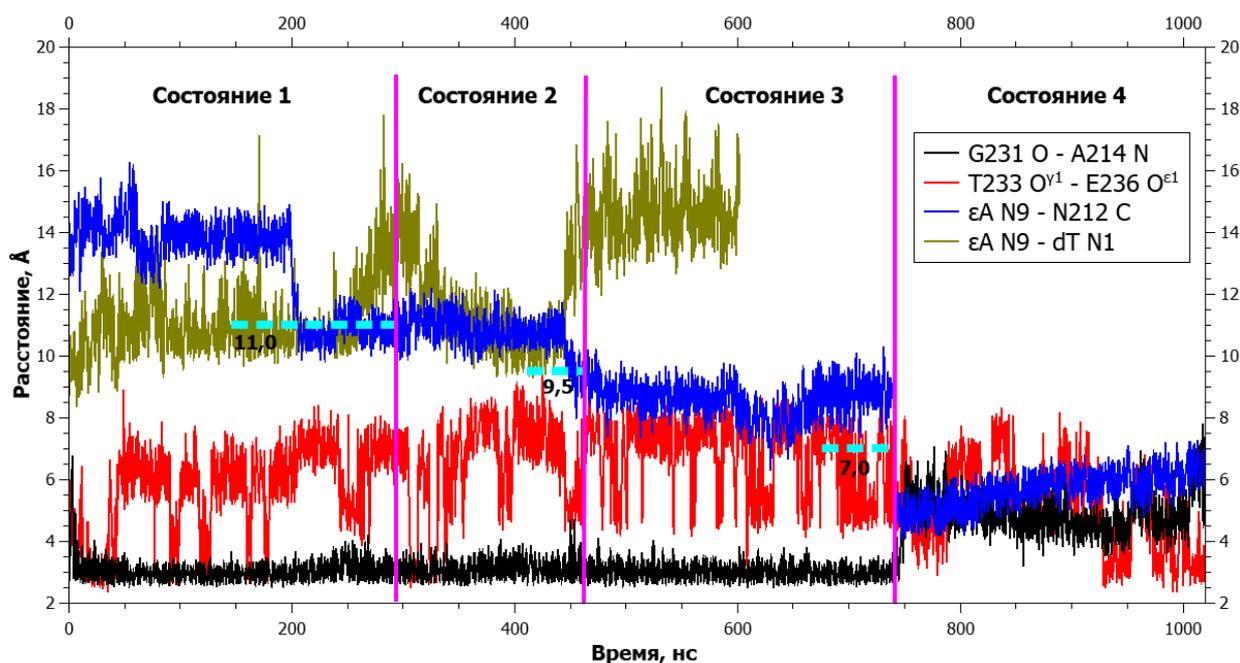


Рисунок 41. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N, Thr233 O γ^1 - Glu236 O ϵ^1), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (ϵ A N9 - dT N1, ϵ A N9 - Asn212 C), при выворачивании ϵ A в комплексе с ферментом ДТ.

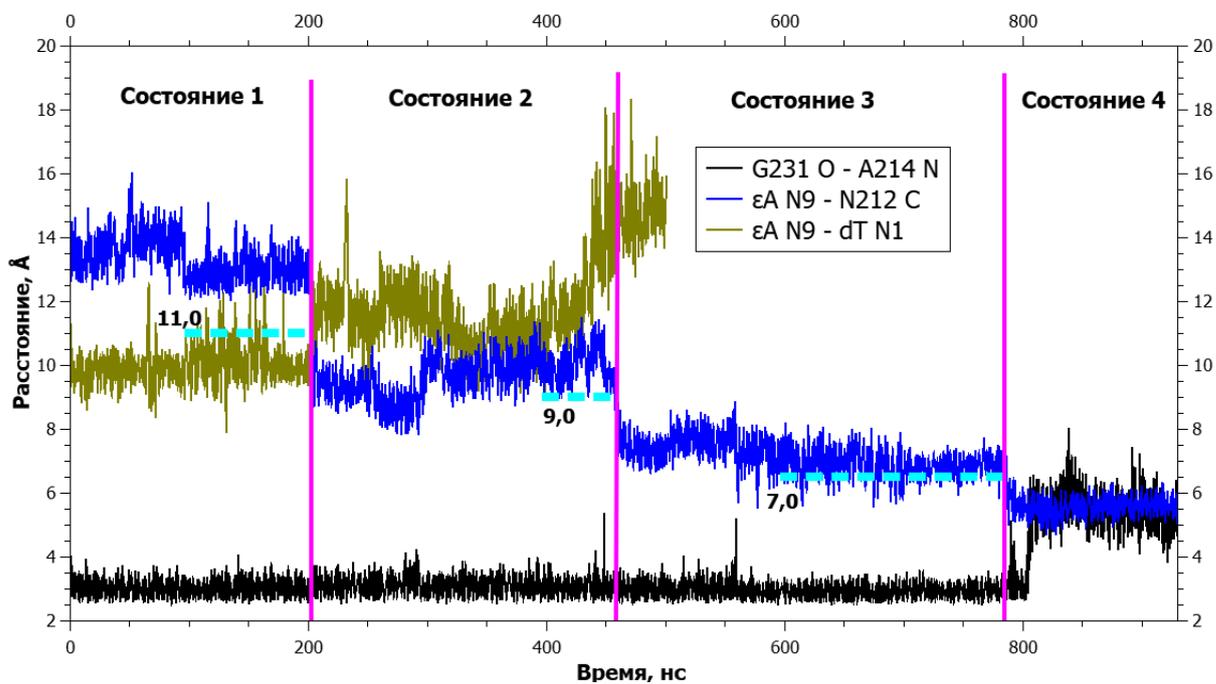


Рисунок 42. Динамика расстояний между парами атомов, участвующими в водородных связях в петле Asn229-Thr233 (Gly231 O - Ala214 N), и между атомами, задействованными в приложении дополнительных сил (ϵ A N9 - dT N1, ϵ A N9 - Asn212 C), при выворачивании ϵ A в комплексе с ферментом zAPE1 Glu236Ala.

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 при условии, что начальное состояние комплекса, используемое в данной работе, в реальности формируется до начала выворачивания. 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 мутантной формы 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 внутреннего пространства между петлями для молекул воды, которые дополнительно могут способствовать увеличению подвижности данных петель.

В работе [244] была исследована способность АП-эндонуклеаз разных структурных классов, включая hAPE1, гидролизовать ДНК возле АП-сайта, ковалентно связанного с олигопептидами. Было показано, что фермент человека проявляет очень низкую активность на подобных субстратах. Такой результат также может свидетельствовать о том, что олигопептиды, связанные с АП-сайтом, являющиеся очень объёмными повреждениями, не позволяют вывернуться АП-сайту в АЦ, встречая препятствия на пути выворачивания.

3.3. АП-эндонуклеазная активность ферментов zAPE1 дикого типа и мутантных форм

3.3.1. Выбор заменяемых аминокислотных остатков

После получения результатов моделирования на основе анализа структур было решено создать три мутантные формы zAPE1 для экспериментального исследования. Главным принципом рационального выбора аминокислотных остатков для замены и остатков, на которые будут производиться 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 и Ala230Gly, снижающие количество возможных контактов с выворачиваемым основанием, а также замена Glu236Ala, снижающая количество внутрибелковых контактов (рисунок 43).

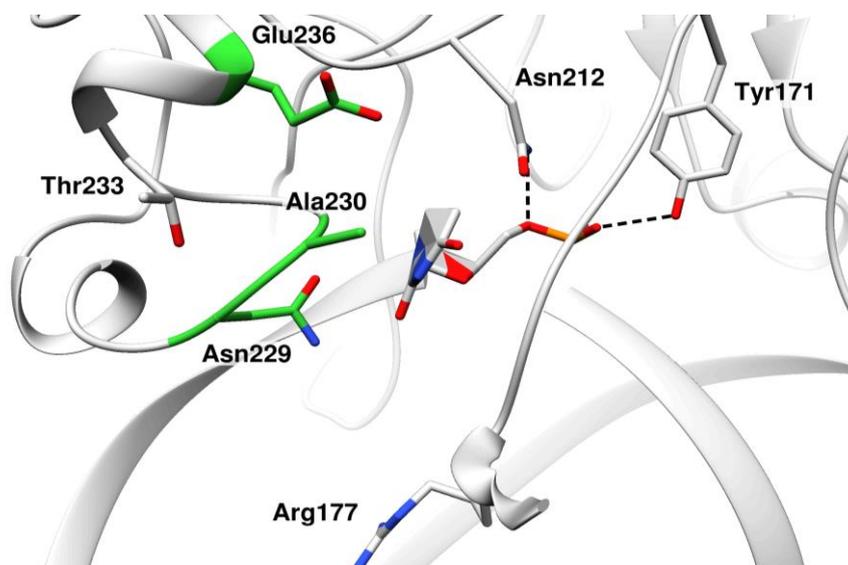


Рисунок 43. Модель комплекса zAPE1-DHU. Зелёным цветом выделены заменяемые остатки.

3.3.2. Сравнительный анализ АП-эндонуклеазной активности методом ПААГ-электрофореза

Анализ АП-эндонуклеазной активности мутантных форм zAPE1 в стационарном режиме протекания реакции показал, что все исследуемые варианты zAPE1 активны примерно в той же степени, что и фермент дикого типа. Исходя из этого было решено выбрать следующие условия реакции для F-субстрата, при которых выполняются условия кинетики Михаэлиса-Ментен: $[E] = 0,04$ мкМ, $[S] = 1$ мкМ, температура реакционной смеси равна 25 °С, время реакции – от 10 до 600 с. По результатам оценки степени расщепления субстрата методом регистрации продукта реакции в ПААГ для F-сайта была получена кинетика накопления продукта реакции (рисунки 44, 45). Далее полученные кинетические кривые были аппроксимированы функцией

$$F(t) = A_1(1 - e^{-k_{\text{набл}}t}) + k_{\text{лин}}t, \quad (2)$$

где A_1 – амплитуда экспоненциального роста (%), $k_{\text{лин}}$ – скорость линейного роста (%/с), $k_{\text{набл}}$ – наблюдаемая константа скорости быстрой фазы (с^{-1}).

Полученные данные свидетельствуют о том, что с наибольшей скоростью F-субстрат расщепляется мутантной формой Asn229Gly (рисунки 44, 45). Величина $k_{\text{набл}}$ для этой мутантной формы оказалась в полтора раза больше, чем у ДТ – $0,09$ с^{-1} и $0,06$ с^{-1} , соответственно (рисунок 46). Другие два фермента оказались, наоборот, заметно медленнее: для Ala230Gly и Glu236Ala величины наблюдаемых констант равны $0,04$ и $0,03$ с^{-1} соответственно.

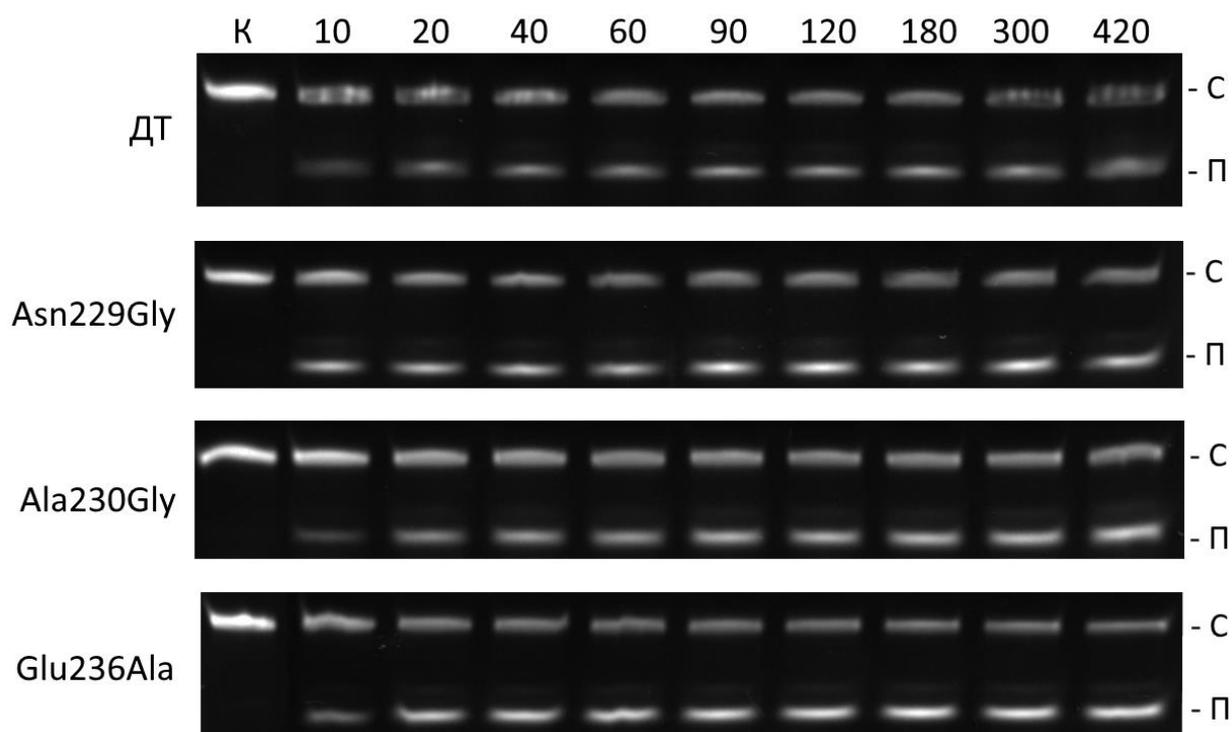


Рисунок 44. ПААГ с продуктами реакции F-субстрата для ферментов zAPE1 ДТ и мутантных форм. В каждом столбце представлены полосы с нерасщеплённым субстратом (С) и продуктом (П). В первом столбце находится контрольная полоса без фермента (К). Над столбцами указано время в секундах, после которого реакция останавливалась. $[E] = 0,04$ мкМ, $[S] = 1$ мкМ.

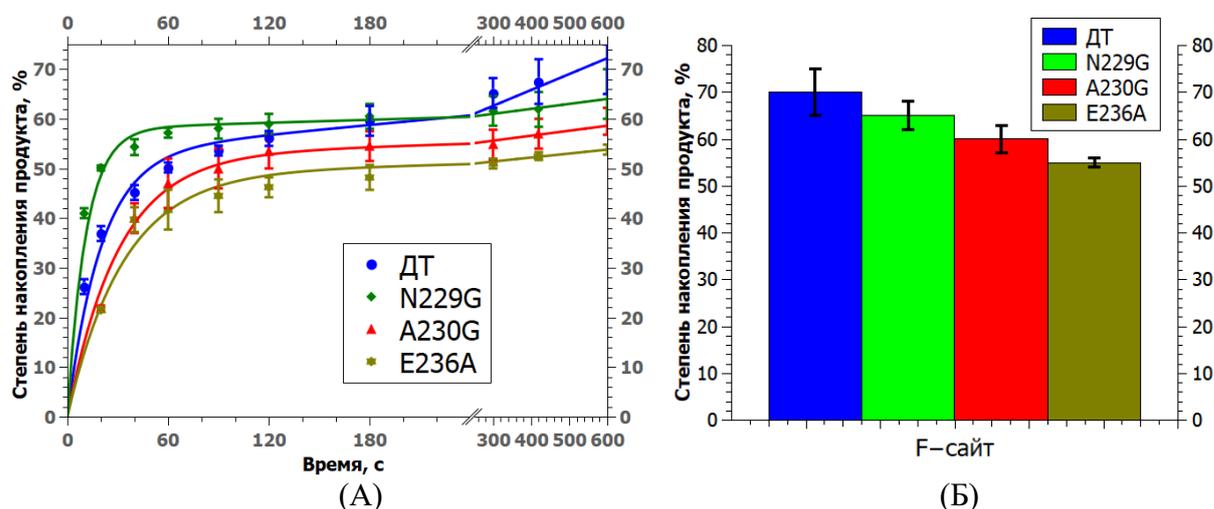


Рисунок 45. ПААГ-анализ накопления продуктов гидролиза F-субстрата ферментом zAPE1 ДТ и его мутантными формами. (А) Кривые накопления и (Б) максимальная степень расщепления в течение 10 мин. Зависимости построены на основе трёх повторных экспериментов. Ошибки определения величины, указанные для каждой экспериментальной точки, равны стандартным отклонениям.

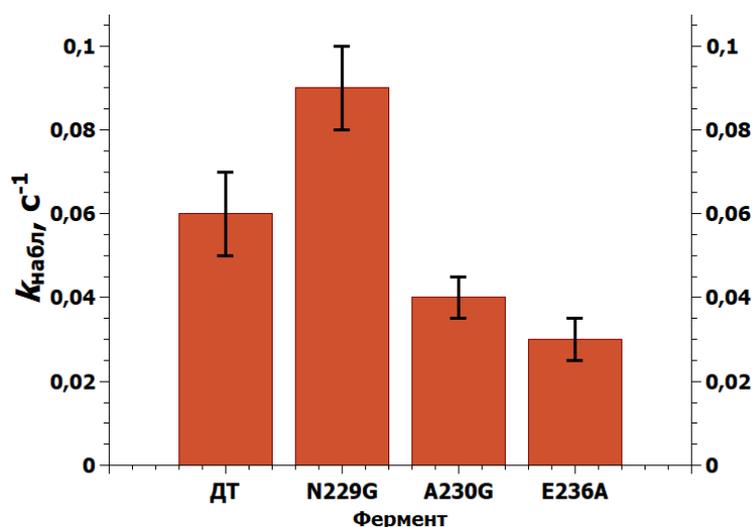


Рисунок 46. Величины наблюдаемых констант скорости (среднее \pm СКО, с^{-1}) АП-эндонуклеазной реакции ферментов zAPE1 с F-сайтом, вычисленные при анализе кинетических кривых (рисунок 45) с помощью уравнения (2).

При этом следует отметить, что фермент дикого типа имел наибольшую степень расщепления субстрата среди всех проверенных вариантов. Действительно, за 10 мин фермент ДТ способен расщеплять до $70 \pm 5\%$ F-субстрата (рисунок 45), в то время как Asn229Gly $65 \pm 3\%$, а процент расщеплённого субстрата для мутантных форм, содержащих замены Ala230Gly и Glu236Ala, составляет $60 \pm 3\%$ и $55 \pm 1\%$ соответственно.

Интересно отметить, что в работе [245] исследовали АП-эндонуклеазу 1 человека, несущую замену Asn229Ala. Было показано, что мутантная форма hAPE1 Asn229Ala также имеет увеличенную по сравнению с ферментом ДТ активность. Таким образом, можно предположить, что замена объёмного бокового заместителя в положении Asn229 повышает эффективность действия АП-подобных ферментов.

3.3.3. Сравнительный анализ АП-эндонуклеазной активности методом остановленного потока

Для более детального изучения кинетики взаимодействия между ДНК-субстратом, содержащим F-сайт, и ферментами zAPE1 регистрировали изменение сигнала флуоресценции FRET-пары, расположенной на ДНК-субстрате, с помощью спектрометра остановленного потока. Необходимо отметить, что регистрация FRET-сигнала была использована ранее для изучения эффективности расщепления ДНК ферментом hAPE1 [220,234,246]. Динамика изменения интенсивности сигнала во времени свидетельствует о соответственно увеличении и уменьшении расстояния между флуорофором FAM и тушителем BHQ1, которое происходит из-за конформационных перестроек ДНК-дуплекса, происходящих

при образовании фермент-субстратного комплекса и последующем расщеплении F-сайта. Тем самым кинетические кривые позволяют судить о стадии реакции, которая происходит в каждый момент времени, и о её скорости.

Была определена относительная активность всех четырёх ферментов (ДТ, Asn229Gly, Ala230Gly, Glu236Ala) в одинаковых экспериментальных условиях (концентрация фермента 2 мкМ, концентрация F-субстрата 1 мкМ). Полученные кривые были приближены функциями в виде экспоненциальных многочленов:

$$F(t) = \sum_n A_n e^{-k_n t}, \quad (3)$$

где A_n – амплитуды n-ой фазы (отн. ед.), k_n – наблюдаемые константы скорости n-ой фазы (c^{-1}). Степень каждого многочлена выбиралась минимально возможной, при которой теоретические функции не отклонялись от экспериментальных кривых больше, чем на величину шума.

Все полученные кривые изменения интенсивности флуоресценции имели схожие формы и единственную фазу до выхода на плато – фазу быстрого роста, соответствующую накоплению продукта (рисунок 47). Наиболее похожи были кривые, соответствующие ДТ и мутантной форме, содержащей замену Asn229Gly. Эти кривые были приближены функциями с двумя экспоненциальными членами, причём одночлены каждой функции, имеющие наибольшие $k_{набл}$, имели отрицательную амплитуду (таблица 6). Кривые, соответствующие мутантным формам Ala230Gly и Glu236Ala, могли быть описаны одноэкспоненциальным уравнением с положительной амплитудой.

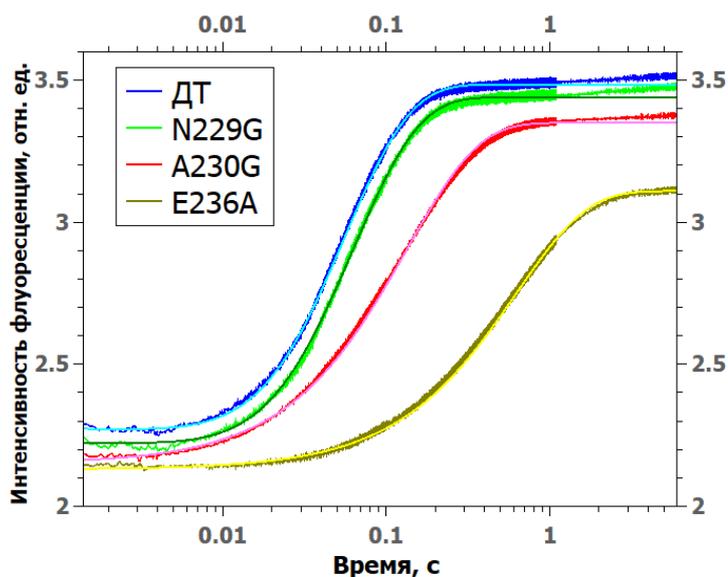


Рисунок 47. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции при взаимодействии вариантов zAPE1 ($[E] = 2$ мкМ) с F-субстратом ($[S] = 1$ мкМ), аппроксимированные экспоненциальными функциями (3).

При этом именно формы фермента ДТ и Asn229Gly обладали наибольшими и примерно одинаковыми величинами констант скорости, соответствующими растущим экспонентам – 20 и 17,4 с⁻¹ соответственно (таблица 6). Ala230Gly и Glu236Ala имели заметно меньшие аналогичные величины констант – 7,5 и 1,6 с⁻¹ соответственно. Результаты разных кинетических схем не могут сравниваться напрямую, тем не менее значительные отличия в скорости работы мутантных форм Ala230Gly и Glu236Ala между собой и относительно фермента ДТ и мутантной формы Asn229Gly хорошо видны визуально на кинетических кривых – моменты выхода на плато для разных кривых на рисунке 47 заметно различаются, и чем позже этот момент наступает, тем медленнее фермент.

Таблица 6. Величины наблюдаемых констант скорости k (с⁻¹), полученных с помощью уравнения (3), характеризующие взаимодействие четырёх zAPE1 с F-субстратом. Ошибки вычислений составляют около 10% от соответствующих значений для всех величин

| | ДТ | Asn229Gly | Ala230Gly | Glu236Ala |
|-------|-------|-----------|-----------|-----------|
| k_1 | 91 | 85 | - | - |
| A_1 | -0,42 | -0,39 | - | - |
| k_2 | 20 | 17,4 | 7,5 | 1,6 |
| A_2 | 1,63 | 1,6 | 1,2 | 1 |

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, которая приводит к формированию коротких олигонуклеотидных фрагментов в составе продукта реакции и сопровождается диссоциацией комплекса фермент-продукт, приводящей к отдалению флуорофора и тушителя в пространстве и существенному росту сигнала. При этом следует отметить, что изменения FRET-сигнала при формировании фермент-субстратного комплекса имеют небольшую амплитуду. В связи с этим даже минимальное ухудшение эффективности связывания фермента и ДНК в случае мутантных форм Ala230Gly и Glu236Ala не позволило рассчитать параметры этого процесса вследствие большего перекрытия соседних фаз во времени и соответственно потери первой фазы на кинетических кривых.

Полученные результаты в совокупности с результатами ПААГ-анализа степени расщепления субстрата позволяют предположить, что мутантные формы Ala230Gly и Glu236Ala обладают сниженной способностью связывания ДНК по сравнению с ферментом ДТ. Данное предположение решено было проверить методом микроскопического термофореза (МСТ).

3.3.4. Определение величин констант связывания методом микротермофореза

Для определения вклада изменения эффективности связывания с ДНК в изменение эффективности АП-эндонуклеазной реакции в случае каждой мутантной формы относительно фермента ДТ было выполнено определение величин констант диссоциации фермент-субстратных комплексов методом микроскопического термофореза в отсутствие расщепления субстрата. Величины констант 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 для мутантной формы Glu236Ala оказалось в 3-4 раза выше значений остальных ферментов – 1,4 мкМ. Следует отметить, что полученный порядок величин констант диссоциации (ДТ < Asn229Gly < Ala230Gly < Glu236Ala) является обратным порядку величин наблюдаемых констант скорости k_2 (ДТ > Asn229Gly > Ala230Gly > Glu236Ala), определённых в предыдущем разделе (рисунок 48, таблица 7).

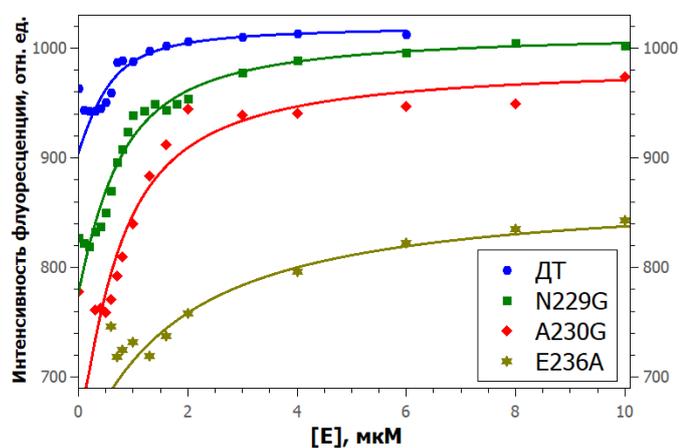


Рисунок 48. Кривые флуоресценции, полученные методом микротермофореза для ферментов zAPE1, приближенные функциями (1). [S] = 0,5 мкМ.

Таблица 7. Вычисленные по МСТ-кривым величины констант диссоциации

| Фермент | K_d , мкМ |
|-----------|---------------|
| ДТ | $0,3 \pm 0,1$ |
| Asn229Gly | $0,4 \pm 0,1$ |
| Ala230Gly | $0,5 \pm 0,2$ |
| Glu236Ala | $1,4 \pm 0,3$ |

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что стандартные отклонения величин 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 значительно ухудшает эффективность образования фермент-субстратного комплекса.

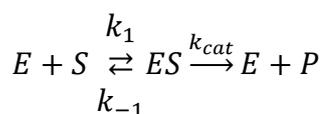
3.3.5. Определение величин констант АП-эндонуклеазной реакции методом остановленного потока для мутантных форм zAPE1

Для дополнительного определения роли отобранных аминокислотных остатков на отдельных стадиях узнавания повреждения, образования каталитически активного комплекса и непосредственно каталитической реакции методом остановленного потока были зарегистрированы конформационные изменения F-субстрата в процессе взаимодействия с ферментами zAPE1 Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala. Для этого были получены серии кинетических кривых, отражающих изменение интенсивности флуоресценции FRET-пары красителей в составе F-субстрата (рисунок 49).

Подробное исследование механизма взаимодействия hAPE1 дикого типа с АП- и F-сайтами было проведено в работах Канажевской Л. Ю. [215,247,248]. В данных работах также использовали метод остановленного потока для изучения быстрых стадий фермент-субстратного взаимодействия. Конформационные изменения наблюдали с помощью флуоресценции остатков Trp белка или 2-аминопурина, встроенного в ДНК по соседству с повреждённым нуклеотидом. Такое сочетание подходов и данные, собранные с помощью них, позволили предложить кинетический механизм работы фермента, содержащий три стадии формирования каталитического комплекса, стадию катализа и стадию диссоциации комплекса с продуктом. Кроме того, было показано, что расщепление ДНК, содержащей F-сайт, происходит примерно в 1,5 раза медленнее, чем в случае ДНК, содержащей АП-сайт.

В работе Давлетгильдеевой А. Т. [222] было продолжено исследование АП-эндонуклеазной активности АП-эндонуклеаз 1 методом остановленного потока, но уже с использованием гомологичных ферментов из разных организмов и субстратов, содержащих FRET-пару красителей. Было показано, что АП-эндонуклеазы дикого типа из *D. rerio*, *X. laevis* и *D. melanogaster* имеют одинаковый кинетический механизм, описываемый двухстадийной схемой 1. Кроме того, было показано, что фермент из *D. melanogaster* обладает сниженной по сравнению с остальными активностью, предположительно из-за отсутствия Mg²⁺-координирующего остатка на месте Asp70.

Схема 1. Распознавание субстрата FRET-F/G ферментом zAPE1 ДТ [222]. E – фермент, S – ДНК-субстрат, ES – фермент-субстратный комплекс, P – продукт реакции.

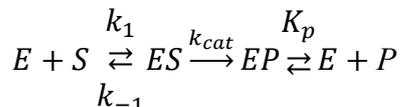


В случае с мутантными формами zAPE1 Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala, схемой с минимальным количеством стадий, которой удалось описать все серии кривых, ока-

залась схема с тремя стадиями (схема 2), включающая обратимую стадию связывания фермента и субстрата, необратимую каталитическую стадию и обратимую стадию диссоциации комплекса фермент-продукт. Теоретические кривые, полученные в соответствии со схемой 2, были построены в программе DynaFit что позволило рассчитать соответствующие величины констант скорости, входящих в данную кинетическую схему (рисунок 49, таблица 8).

Более того, следует отметить, что данные, представленные на рисунках 46 и 47, свидетельствуют о том, что условия протекания реакции могут оказывать влияние на общую эффективность работы фермента, так в условиях одного оборота фермента активность zAPE1 ДТ и Asn229Gly не отличается, тогда, как в стационарном режиме реакции активность Asn229Gly увеличивается по сравнению с ДТ, что свидетельствует о вкладе стадии диссоциации продукта на скорость превращения F-субстрата. Эти данные дополнительно указывают на необходимость использования усложнённой кинетической схемы 2 по сравнению с ранее использованной схемой 1.

Схема 2. Распознавание субстрата FRET-F/G мутантными формами zAPE1. E – фермент, S – ДНК-субстрат, ES – фермент-субстратный комплекс, EP – комплекс фермента с продуктом, P – продукт реакции.



При построении теоретических кривых величины K_a , соответствующие первой стадии, были заданы на основе результатов МСТ. Помимо K_a , значительные отличия между ферментами наблюдались и в величинах констант двух других стадий. Величины каталитических констант k_{cat} расположились в том же порядке, что и величины наблюдаемых констант скоростей, вычисленные в разделе 3.3.3 - Asn229Gly > Ala230Gly > Glu236Ala. Наибольшая величина параметра k_{cat} наблюдалась для zAPE1 Asn229Gly – $13 \pm 2 \text{ c}^{-1}$. У Ala230Gly значение k_{cat} было примерно в полтора раза ниже - $8 \pm 1 \text{ c}^{-1}$, а у Glu236Ala ещё в два раза ниже – $4,0 \pm 0,5 \text{ c}^{-1}$. Для величин констант диссоциации комплекса с продуктом K_p ожидаемо наблюдался порядок (Glu236Ala > Ala230Gly > Asn229Gly), обратный порядку величин констант ассоциации с субстратом K_a (Asn229Gly > Ala230Gly > Glu236Ala).

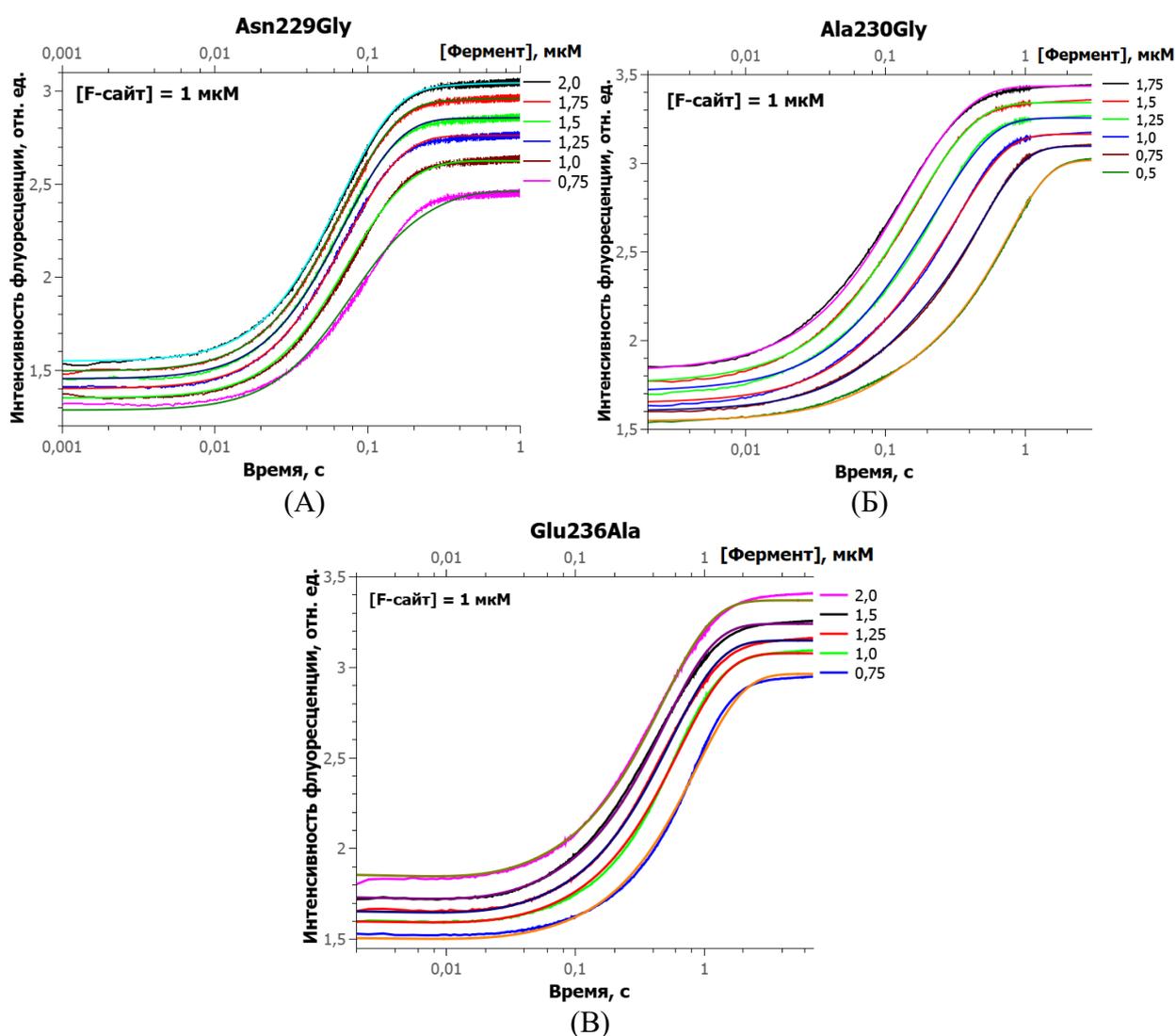


Рисунок 49. Изменения интенсивности FRET-сигнала в ходе взаимодействия ферментов zAPE1 Asn229Gly (A), Ala230Gly (Б) и Glu236Ala (B) с FRET-F/G. [FRET-F/G] = 1,0 мкМ, концентрации ферментов указаны на графиках. Теоретические кривые и величины констант скорости были получены в программе DynaFit.

Таблица 8. Вычисленные величины констант скорости и равновесия, соответствующие схемам 1 и 2

| Константа | ДТ [222] | Asn229Gly | Ala230Gly | Glu236Ala |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| $k_1, \text{мкМ} \cdot \text{с}^{-1}$ | $3,8 \pm 0,4$ | 29 ± 2 | 24 ± 3 | 11 ± 2 |
| $k_{-1}, \text{с}^{-1}$ | $5,6 \pm 0,7$ | 12 ± 2 | 12 ± 2 | 13 ± 4 |
| $K_a, \text{мкМ}^{-1}$ | $0,7 \pm 0,2$ | $2,5 \pm 0,5$ | $2,0 \pm 0,4$ | $0,9 \pm 0,2$ |
| $k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$ | $2,2 \pm 0,1$ | 13 ± 2 | 8 ± 1 | $4,0 \pm 0,5$ |
| $K_p, \text{мкМ}$ | - | 4 ± 1 | 7 ± 1 | 10 ± 2 |

Сравнение констант скорости для фермента ДТ, полученные ранее в работе [222], и мутантных форм Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala показало, что их величины значительно отличаются. Такое отличие, по-видимому, связано с использованием разных кине-

тических схем для обработки результатов фермента ДТ [222] и мутантных форм (в данном исследовании), отличающихся стадией диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. В связи с этим далее мы проводили сравнение параметров между исследуемыми мутантными формами zAPE1.

В настоящей работе, благодаря сравнению результатов, полученных методами остановленного потока и регистрации продукта в геле, видно, что основной вклад в изменение скорости АП-эндонуклеазной реакции среди исследованных мутантных форм zAPE1 вносит изменение сродства к субстрату (таблицы 7 и 8) и продукту реакции (таблица 8). При этом наибольшие отличия от остальных форм фермента zAPE1 имеет мутантная форма Glu236Ala, величины констант диссоциации с субстратом и с продуктом реакции которой в 2-2,5 раза выше, чем таковые для мутантных форм Asn229Gly и Ala230Gly. Величины констант мутантной формы Ala230Gly имеют тенденцию быть ниже аналогичных значений для мутантной формы Asn229Gly, но значения констант ассоциации совпадают в пределах ошибки.

Интересно отметить, что согласно полученным в пункте 3.1 структурным моделям, построенным на основе рентгеноструктурных данных для hAPE1, ни один из рассматриваемых аминокислотных остатков в ферменте не взаимодействует с ДНК, а также ни в одном случае не нарушается структура белка в комплексе с ДНК. Тем не менее, выявленные в случае замены Glu236Ala отличия, позволяют предположить, что остаток Glu236 участвует в стабилизации комплекса с ДНК, а его замена дестабилизирует комплекс и уменьшает эффективность образования каталитически-компетентного состояния. В тоже время замена Asn229Gly, по-видимому, оказывает дестабилизирующий эффект на комплекс фермента с продуктом реакции, что повышает эффективность работы фермента в режиме множественных оборотов.

3.4. ИРН-активность ферментов zAPE1 дикого типа и мутантных форм

3.4.1. Сравнительный анализ ИРН-активности методом ПААГ-электрофореза

DNU-содержащая ДНК является одним из самых эффективно гидролизуемых ИРН-субстратов для APE1-подобных эндонуклеаз [222]. Для этого субстрата, как и для ДНК-субстрат, содержащего F-сайт, было проведён кинетический анализ накопления продукта. При соотношении концентраций $[E]/[S] = 0,2/1$ мкМ самым эффективным ферментом оказался ДТ с $k_{набл} = 0,015$ (рисунок 50). Полученные данные показали, что все мутантные формы фермента были в 1,5-2 раза медленнее, чем фермент дикого типа. Важным результатом оказалось то, что все мутантные формы превосходили ДТ по максимальной степени расщепления, так ДТ имел процент расщеплённого субстрата за 60 мин равный 44 ± 4 %, в

то время как Ala230Gly – $49 \pm 5 \%$, Asn229Gly – $55 \pm 1 \%$ и Glu236Ala – $64 \pm 4 \%$ (рисунки 50, 51). Интересно отметить, что в случае мутантной формы Glu236Ala, имеющей худшую эффективность в отношении F-субстрата, скорость накопления продуктов расщепления DNU-субстрата на начальном участке кинетической кривой совпадала с ферментом дикого типа, а общая эффективность гидролиза была максимальной среди всех вариантов фермента.

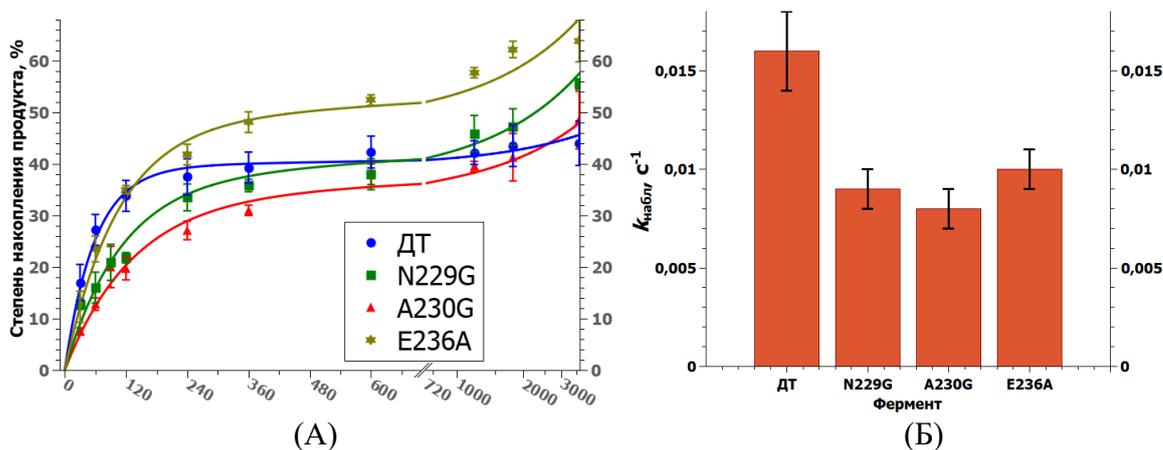


Рисунок 50. (А) Кривые накопления продукта DNU-субстрата ферментами zAPE1 ДТ и мутантных форм. (Б) Наблюдаемые константы скорости k быстрой фазы накопления из уравнения (2). Зависимости построены на основе трёх повторных экспериментов. Все значения на графиках представлены в виде "среднее \pm СКО". $[E] = 0,2$ мкМ, $[S] = 1$ мкМ.

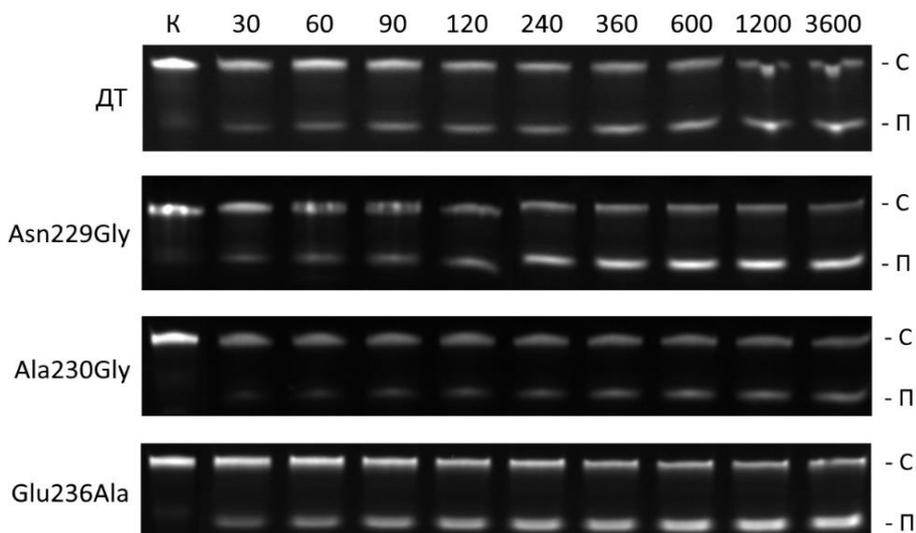


Рисунок 51. ПААГ с продуктами реакции DNU-субстрата для ферментов zAPE1 ДТ и мутантных форм. В каждом столбце представлены полосы с нерасщеплённым субстратом (С) и продуктом (П). В первом левом столбце находится контрольная полоса без фермента (К). Над столбцами указано время в секундах, после которого реакция останавливалась. $[E] = 0,2$ мкМ, $[S] = 1$ мкМ.

Подбор оптимальных условий для ИРН-активности (рисунок 52) позволил выбрать условия для сравнительного анализа ферментов zARE1 в одной временной точке, (таблица 9).

Таблица 9. Условия реакций для проверки активности мутантных форм zARE1 методом электрофореза в ПААГ

| Повреждение | [E] | [S] | Температура | Время реакции |
|-----------------|-------|-------|-------------|---------------|
| DHU | | | | 40 с |
| dU | 2 мкМ | 1 мкМ | 37 °С | 10 мин |
| α A | | | | 60 мин |
| ε A | | | | 30 мин |

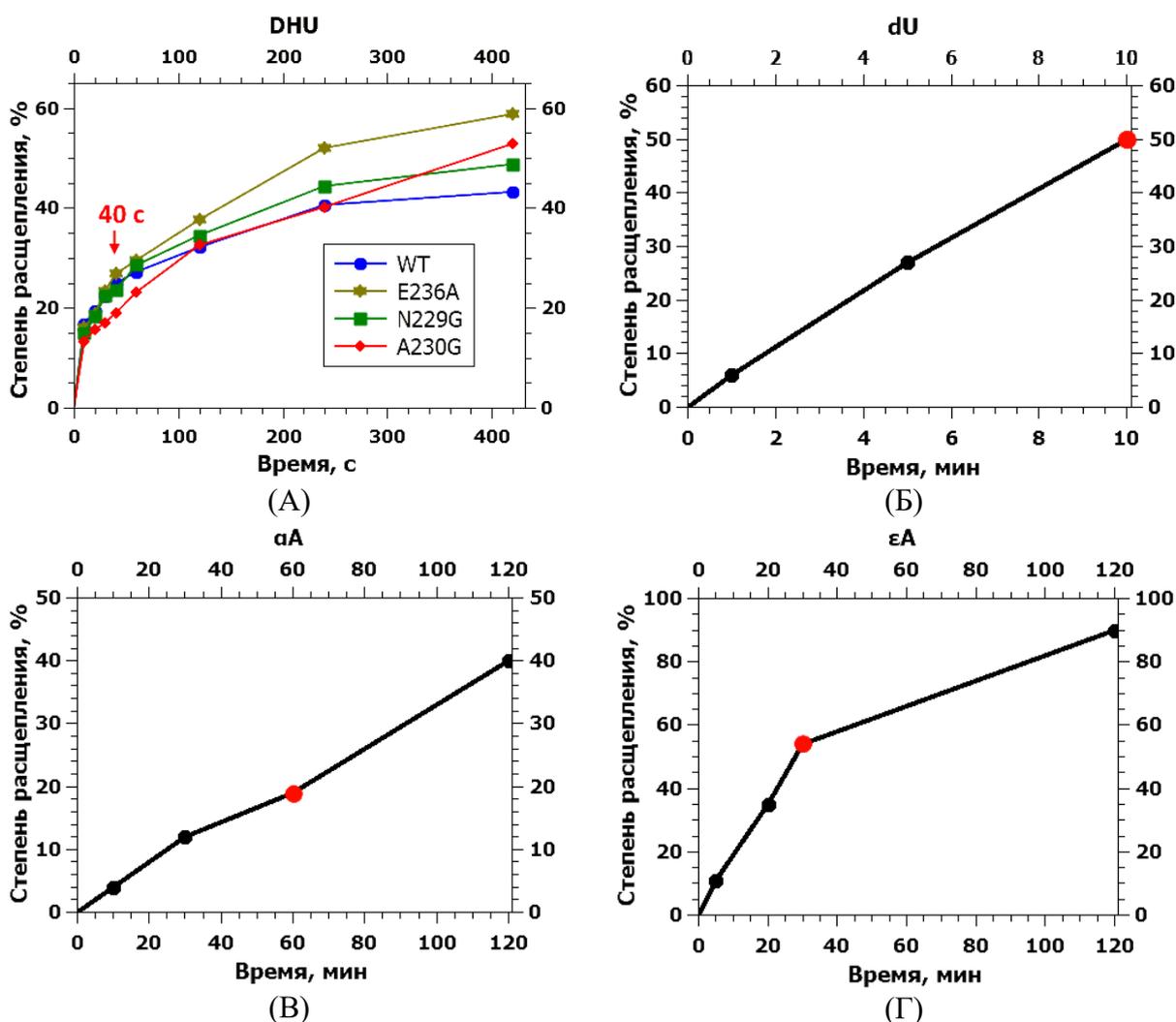


Рисунок 52. Кривые накопления продукта реакции для ИРН-субстратов, при [E] = 2 мкМ, [S] = 1 мкМ. Для DHU-субстрата (А) представлены кривые для всех ферментов, для dU (Б), α A (В), ε A (Г) – только кривые для мутантной формы Glu236Ala. Для дальнейшего сравнения активностей всех ферментов были выбраны временные точки, обозначенные красным. Эти точки располагаются на границе области быстрого накопления продукта, что позволяет грубо сравнить скорости работы ферментов.

Экспериментальный анализ подтвердил повышение ИРН-активности у мутантной формы Glu236Ala в сравнении с остальными вариантами фермента (рисунки 53, 54). zAPE1 Glu236Ala оказался единственным ферментом, способным эффективно расщеплять ϵ A-субстрат, доля расщеплённого субстрата за 30 мин составила около 64% (таблица 10). α A в минимально заметных количествах за отведённое время в 60 мин могли расщеплять ферменты ДТ и Asn229Gly (~ 2%), но эффективность мутантной формы Glu236Ala была заметно выше и составила ~ 17%. Кроме того, мутантная форма Glu236Ala также хорошо расщепляла ещё один «сложный» для ДТ субстрат, а именно dU-субстрат, с максимальной степенью расщепления ~50% за 10 мин. При этом мутантная форма Ala230Gly не проявляла активности на аденин-содержащих ИРН-субстратах, но также оказалась способной расщеплять в среднем до 5% dU-субстрата за 10 мин. Замена Asn229Gly не изменяла способность гидролизовать dU-субстрат и фермент с такой заменой так же, как и фермент ДТ, не проявлял заметной активности на dU-субстрате.

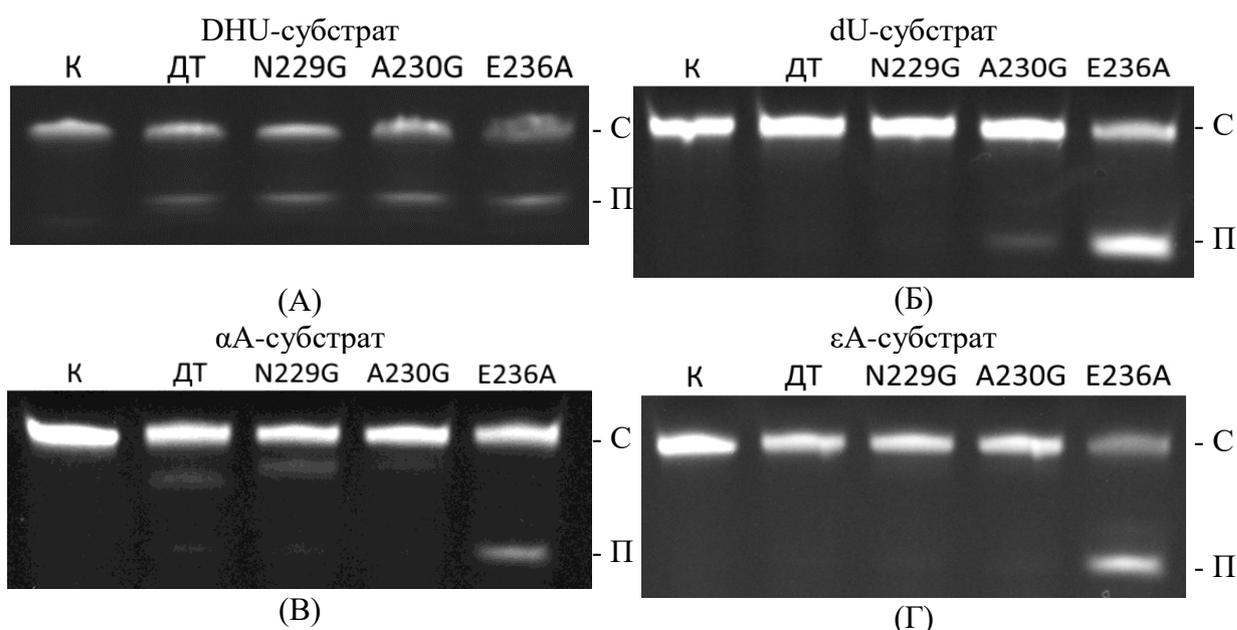


Рисунок 53. ПААГ-анализ накопления продукта ферментами zAPE1 для субстратов DHU (А), dU (Б), α A- (В) и ϵ A (Г). К – контроль (без фермента). [E] = 2 мкМ, [S] = 1 мкМ.

Таблица 10. Степень расщепления ИРН-субстратов (%) ферментами в условиях, указанных в таблице 9

| Повреждение | ДТ | Asn229Gly | Ala230Gly | Glu236Ala |
|--------------|--------|-----------|-----------|-----------|
| DHU | 23 ± 3 | 21 ± 3 | 18 ± 3 | 26 ± 4 |
| dU | 0 | 0 | 5 ± 1 | 50 ± 8 |
| α A | 2 ± 1 | 2 ± 1 | 0 | 17 ± 2 |
| ϵ A | 0 | 0 | 0 | 64 ± 6 |

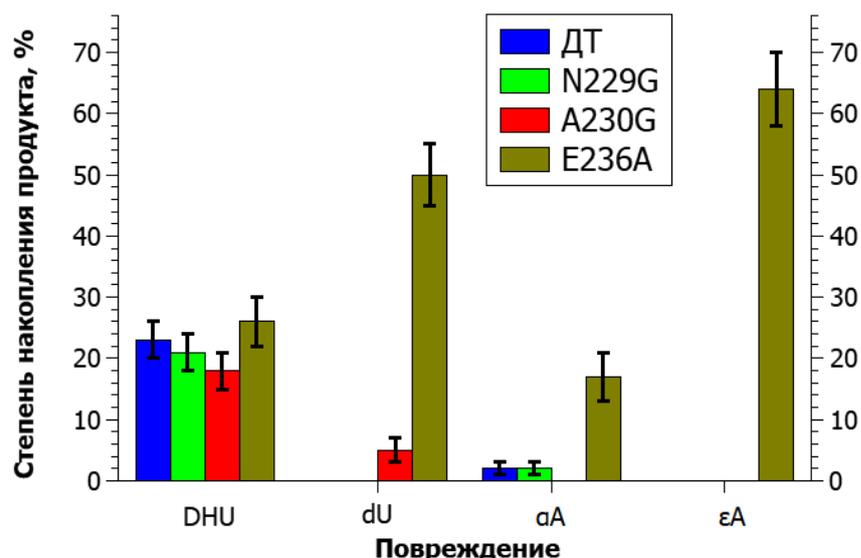


Рисунок 54. Сводная диаграмма эффективности ИРН-активности всех исследуемых форм zAPE1. [E] = 2 мкМ, [S] = 1 мкМ.

Таким образом, эффективность ИРН-активности для мутантной формы Glu236Ala уменьшается в порядке DNU > dU > εA > αA, в то время как для фермента ДТ был установлен другой порядок: DNU >> αA > εA ~ dU (рисунок 54). Рост эффективности при осуществлении ИРН-активности по сравнению с ферментом ДТ именно у мутантной формы Glu236Ala в совокупности с предсказанием структурных изменений, обнаруженных при моделировании выворачивания нуклеотидов, позволяет предположить, что главным ограничением в ИРН-активности АП-эндонуклеаз является гибкость АЦ фермента и его возможность увеличивать свой объём для размещения исследуемых азотистых оснований. Прямые контакты остатков фермента с выворачиваемым основанием, вероятно, тоже вносят вклад, согласно результатам для мутантных форм Asn229Gly и Ala230Gly, но намного меньший.

3.4.2. Конформационные изменения ИРН-субстратов при взаимодействии с ферментами zAPE1

Методом остановленного потока был выполнен сравнительный анализ конформационных изменений ИРН-субстратов в процессе взаимодействия с zAPE1 ДТ и его мутантными формами, содержащими замены Asn229Gly, Ala230Gly или Glu236Ala. Использование неповреждённого ДНК-дуплекса FRET-C/G (dC-субстрат) позволило зарегистрировать изменения интенсивности флуоресценции характеризующие неспецифические взаимодействия фермента с ДНК (рисунок 55). Как видно на полученных кинетических кривых, неповреждённая ДНК претерпевает множественные последовательные конформаци-

онные изменения при взаимодействии с zAPE1. Все теоретические кривые, описывающие изменение сигнала в случае неповреждённой ДНК, содержали по две фазы роста, при этом кривые, соответствующие ДТ и мутантной форме Asn229Gly, имели дополнительно одну промежуточную фазу падения (рисунок 55). Таким образом, полученные данные показывают, что замены Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala приводят к индивидуальным отличиям мутантных форм, подтверждая участие исследуемых остатков в процессе формирования каталитического комплекса.

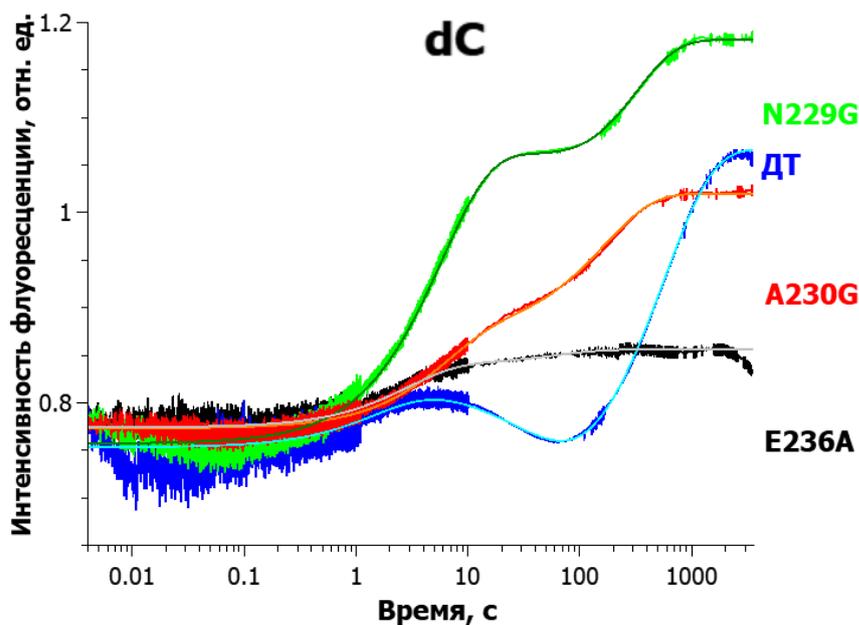


Рисунок 55. Изменения интенсивности FRET-сигнала в ходе взаимодействия ферментов zAPE1 ДТ и трёх мутантных форм с FRET-C/G. [E] = 2 мкМ, [S] = 1 мкМ.

Кинетические кривые, характеризующие взаимодействие ферментов с DHU-субстратом, описывались суммой экспонент с разным числом слагаемых (от 3 до 4) для разных ферментов (рисунок 56А). Все кривые содержали фазу падения интенсивности флуоресценции до 0,01 с, в то время как рост сигнала начинался примерно с 0,1 с. Рост сигнала в случае ДТ и мутантных форм Asn229Gly и Glu236Ala проходил в две фазы, в то время как для мутантной формы Ala230Gly наблюдалась только одна более медленная фаза. Вторая фаза роста (и единственная в случае мутантной формы Ala230Gly) на этих кривых приходится на промежуток от 10 до 200 с, что совпадает с фазой быстрого роста, видимой на кривых накопления продукта, полученных методом регистрации продукта в геле (рисунок 50А). Таким образом, кинетические кривые для DHU и для dC отличаются как наличием дополнительных фаз изменения сигнала, так и временным диапазоном, в

котором эти фазы были зарегистрированы, что говорит о существенных различиях в конформационных преобразованиях для неповреждённого и повреждённого ДНК-дуплекса.

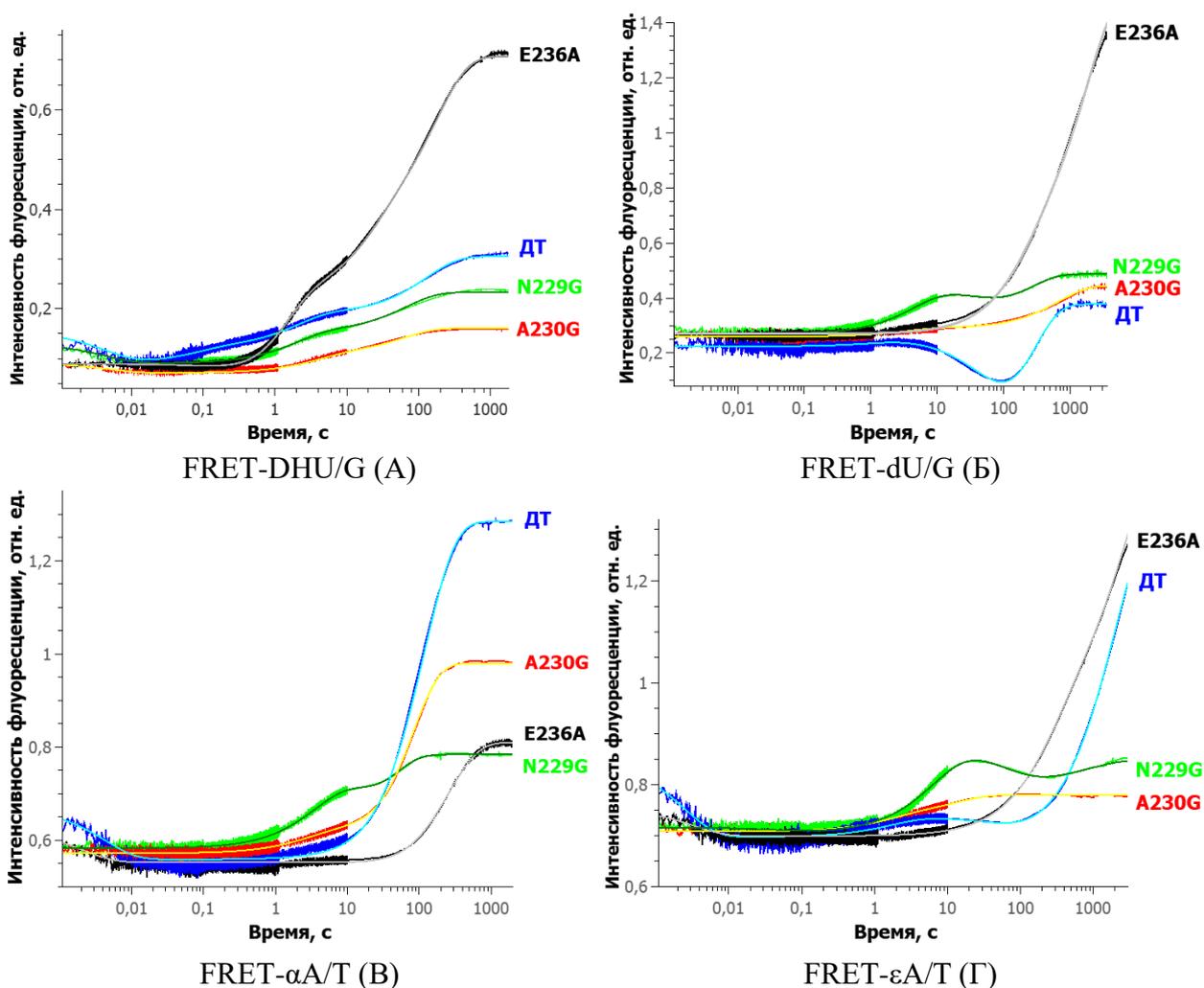


Рисунок 56. Изменения интенсивности FRET-сигнала в ходе взаимодействия четырёх ферментов zAPE1 с FRET-DHU/G (А), FRET-dU/G (Б), FRET-αA/T (В), FRET-εA/T (Г). [E] = 2 мкМ, [S] = 1 мкМ.

Кинетические кривые, характеризующие взаимодействие ферментов с dU-субстратом, имели те же фазы, что и для dC-субстрата, хотя в случаях с мутантной формой Glu236Ala фаза роста интенсивности флуоресценции на dU-субстрате имела намного большую амплитуду изменений, чем та же фаза на dC-субстрате (рисунок 56Б). Здесь также можно предположить, что такая амплитудная фаза роста у мутантной формы Glu236Ala соответствует эффективному накоплению продукта, наблюдавшемуся только у этого фермента путём разделения продуктов реакции в ПААГ (рисунок 52Б, таблица 10). Схожесть форм кривых для фермента ДТ и мутантной формы Asn229Gly в случаях dC- и dU-субстратов говорит о том, что для этих ферментов dU является настолько же «неподходя-

щим» субстратом, как и dC, что и наблюдалось методом регистрации продукта в геле (рисунок 54).

Кривые для α A-субстрата разделились по своим формам на две пары: для ферментов ДТ и Glu236Ala наблюдалось по одной фазе роста, для ферментов Asn229Gly и Ala230Gly – по две (рисунок 56В). Наконец, в случае ϵ A-субстрата только для ферментов ДТ и Asn229Gly кривые имели одинаковое количество фаз - 4 (рисунок 56Г). Как можно заметить, для α A- и ϵ A-субстратов сразу несколько ферментов (ДТ, Ala230Gly, Glu236Ala) имеют заключительную фазу роста большой амплитуды, которая не может соответствовать процессу накопления продуктов реакции, так как методом регистрации продукта в ПААГ показана низкая степень расщепления данных ИРН-субстратов (рисунок 52В, Г). Например, в случае фермента ДТ относительно большой рост наблюдается для обоих аденозиновых субстратов, причём в случае α A-субстрата кривая успевает выйти на плато менее чем за 10 мин. Таким образом, можно предположить, что обозначенные фазы соответствуют не накоплению продукта, а накоплению промежуточной формы фермент-субстратного комплекса, например в одном из состояний, выявленных при моделировании траектории выворачивания повреждения в активный центр.

Следует отметить, что ранее в работах [249,250] было проведено подробное изучение кинетического механизма взаимодействия hAPE1 с DHU- и α A-субстратами. Исследование быстрой кинетики фермента было проведено с использованием двух разных флуорофоров (остатки Trp в белке или 2-аминопурин в ДНК-субстрате) и сочетание полученных результатов позволило установить, что схемы работы фермента на этих субстратах имеют сложный вид и включают 3 и 4 стадии связывания с субстратом и 3 и 1 стадии диссоциации с продуктом реакции для случаев с DHU и α A соответственно. Таким образом, можно предположить, что кинетические кривые, полученные в данной работе и содержащие не более 4 фаз, могут всё ещё не отражать всей сложности взаимодействия APE1-подобных АП-эндонуклеаз с ИРН-субстратами, но тем не менее показывают, что все исследованные ферменты имеют сложные и отличающиеся между собой этапы, характеризующие механизм узнавания повреждения и формирования каталитически компетентного комплекса с ИРН-субстратами.

Все представленные на рисунках 55 и 56 экспериментальные кривые были аппроксимированы экспоненциальной функцией (3). Величины констант, соответствующие полученным теоретическим кривым, представлены в таблицах 11-15. Следует отметить, что рассчитанные наблюдаемые константы скорости, характеризующие фазы роста и падения интенсивности флуоресценции, приведены для качественного сравнения кинетических кривых, полученных для разных ИРН-субстратов и мутантных

форм фермента. В связи со сложностью зарегистрированных изменений интенсивности флуоресценции во времени, для интерпретации изменений сигнала с точки зрения взаимосвязи с молекулярными событиями, происходящими на каждой зарегистрированной фазе изменения сигнала, а также количественное сравнение полученных кинетических характеристик требует дальнейших исследований с применением альтернативных подходов структурно-динамического анализа.

Тем не менее, обобщив полученные данные о конформационной динамике ДНК в процессе взаимодействия с АП-эндонуклеазой, можно видеть, что на всех кривых для ферментов ДТ и мутантной формы Asn229Gly, кроме кривой для ДТ и α A-субстрата, в области 10 с есть фаза падения или замедления роста сигнала. Можно предположить, что именно в этот момент происходит перестройка белковых петель Val172-Arg177 и Asn229-Thr233, их отталкивание и прохождение повреждённого основания между ними, выявленное на основании полученных в работе МД-траекторий выворачивания повреждённых нуклеотидов (раздел 3.2.3). Этот процесс может сопровождаться временным снижением прочности связывания фермента с ДНК-дуплексом, из-за чего и наблюдается сначала рост интенсивности флуоресценции из-за отдаления красителей друг от друга, а затем снижение за счёт обратного процесса. При этом для мутантных форм Ala230Gly и Glu236Ala, для которых с помощью метода МСТ было показано сниженное сродство к субстрату, данные перестройки могут происходить более плавно в силу большей гибкости "распознающих" петель, поэтому для них не наблюдается явно выраженной фазы на кинетических кривых. Кроме того, наличие данной фазы на кривых, полученных для dC-субстрата, может свидетельствовать о том, что определённый вклад на этой стадии может вносить связывание ДНК в конформации, необходимой для осуществления 3'-5'-экзонуклеазной активности, так как выворачивание неповреждённого нуклеотида маловероятно.

Таблица 11. Величины констант скоростей, полученные на основе теоретических кривых для FRET-C/G субстрата

| | ДТ | Asn229Gly | Ala230Gly | Glu236Ala |
|------------------------------|-------|-----------|-----------|-----------|
| k_1, c^{-1} | 0,6 | 0,17 | 0,16 | 0,35 |
| A_1 | 0,06 | 0,31 | 0,1 | 0,07 |
| $k_2, 10^{-2} \text{c}^{-1}$ | 2,4 | 1,2 | - | - |
| A_2 | -0,12 | -0,09 | - | - |
| $k_3, 10^{-3} \text{c}^{-1}$ | 1,8 | 3,2 | 6 | 17 |
| A_3 | 0,37 | 0,21 | 0,15 | 0,02 |

Таблица 12. Величины констант скоростей, полученные на основе теоретических кривых для FRET-DHU/G субстрата

| | ДТ | Asn229Gly | Ala230Gly | Glu236Ala |
|-----------------------|--------|-----------|-----------|-----------|
| k_1, c^{-1} | 180 | 180 | 200 | 2.6 |
| A ₁ | -0,055 | -0,03 | -0,02 | -0,09 |
| k_2, c^{-1} | 12 | - | - | - |
| A ₂ | 0,032 | - | - | - |
| k_3, c^{-1} | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 0,85 |
| A ₃ | 0,068 | 0,063 | 0,033 | 0,22 |
| $k_4, 10^{-2} c^{-1}$ | - | - | - | 5 |
| A ₄ | - | - | - | 0,14 |
| $k_5, 10^{-2} c^{-1}$ | 0,77 | 1,5 | 1,6 | 0,56 |
| A ₅ | 0,13 | 0,08 | 0,047 | 0,35 |

Таблица 13. Величины констант скоростей, полученные на основе теоретических кривых для FRET-dU/G субстрата

| | ДТ | Asn229Gly | Ala230Gly | Glu236Ala |
|-----------------------|-------|-----------|-----------|-----------|
| k_1, c^{-1} | 0,76 | 0,22 | 0,3 | 0,005 |
| A ₁ | 0,03 | 0,16 | 0,03 | 0,3 |
| $k_2, 10^{-2} c^{-1}$ | 1,6 | 2 | - | - |
| A ₂ | -0,46 | -0,09 | - | - |
| $k_3, 10^{-3} c^{-1}$ | 4,3 | 4,3 | 1,5 | 0,6 |
| A ₃ | 0,58 | 0,15 | 0,16 | 0,96 |

Таблица 14. Величины констант скоростей, полученные на основе теоретических кривых для FRET- αA/T субстрата

| | ДТ | Asn229Gly | Ala230Gly | Glu236Ala |
|-----------------------|-------|-----------|-----------|-----------|
| k_1, c^{-1} | 200 | - | - | 450 |
| A ₁ | -0,12 | - | - | -0,07 |
| $k_2, 10^{-2} c^{-1}$ | - | 23 | 38 | - |
| A ₂ | - | 0,2 | 0,05 | - |
| $k_3, 10^{-2} c^{-1}$ | 7,2 | 8 | 3,8 | 2,6 |
| A ₃ | -0,06 | -0,21 | -0,24 | -0,06 |
| $k_4, 10^{-2} c^{-1}$ | 0,86 | 3,2 | 1,6 | 0,4 |
| A ₄ | 0,78 | 0,21 | 0,6 | 0,31 |

Таблица 15. Величины констант скоростей, полученные на основе теоретических кривых для FRET- εA/T субстрата

| | ДТ | Asn229Gly | Ala230Gly | Glu236Ala |
|-----------------------|-------|-----------|-----------|-----------|
| k_1, c^{-1} | 400 | 30 | - | 300 |
| A ₁ | -0,15 | -0,01 | - | -0,06 |
| $k_2, 10^{-2} c^{-1}$ | 25 | 15 | 13 | 0,4 |
| A ₂ | 0,04 | 0,17 | 0,032 | 0,23 |
| $k_3, 10^{-2} c^{-1}$ | 1,6 | 1,4 | - | - |
| A ₃ | -0,05 | -0,07 | - | - |
| $k_4, 10^{-3} c^{-1}$ | 0,5 | 1,1 | 2,2 | 0,36 |
| A ₄ | 0,66 | 0,03 | 0,04 | 0,55 |

Таким образом, 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. Полученные кинетические кривые свидетельствуют о том, что кинетические механизмы взаимодействия исследуемых ферментов на неповреждённом dC-субстрате и ИРН-субстратах зависят как от наличия и структуры повреждённого нуклеотида в субстрате, так и от аминокислотных замен фермента. По-видимому, отличия конформационных перестроек в ДНК и их эффективность связаны с комплексными постадийными этапами формирования каталитического комплекса, в первую очередь сопряжёнными с выворачиванием повреждённого нуклеотида из ДНК-дуплекса и его перемещения в активный центр фермента. На полученных кинетических кривых для разных ИРН-субстратов с повреждениями можно выделить общие черты, которые предположительно соответствуют общему механизму перехода повреждённых азотистых оснований между квазистабильными состояниями, которые были выявлены в ходе МД-моделирования. Данные конформационные изменения могут проявляться в большей или меньшей степени в зависимости от введённых аминокислотных замен, которые также в большей или меньшей степени изменяют подвижность "распознающих" белковых петель Val172-Arg177 и Asn229-Thr233.

Заключение

АП-эндонуклеаза 1 является одним из самых важных ферментов в клетках млекопитающих и многих других организмов. Исследования данного фермента ведутся уже давно, но до сих пор некоторые аспекты его функционирования остаются малоизученными. В том числе оставался вопрос о механизмах узнавания ферментом нуклеотидов с повреждёнными основаниями и способах контроля субстратной специфичности ферментами данного класса. Для ответа на этот вопрос необходимо привлечение как можно большего количества разных методов анализа, позволяющих изучить объект с разных сторон. Исследование взаимодействия ферментов с различными повреждениями ДНК, начиная с самых ранних этапов фермент-субстратного взаимодействия, таких как неспецифичное связывание, позволяет внести существенный вклад в понимание причин субстратной специфичности АП-эндонуклеаз и механизмов тонких конформационных перестроек фермента и субстрата в процессе их взаимодействия. Кроме того, АП-эндонуклеазы сочетают в себе уникальную для ферментов, опознающих малые повреждения ДНК, специфичность, а также возможность расщеплять ДНК с 5'-стороны от повреждения с образованием 3'-ОН напрямую, без промежуточных стадий и продуктов. Такой набор свойств даёт возможность использования этого фермента в новых биотехнологических приложениях при наличии достаточной каталитической эффективности.

В представленной работе было проведено масштабное компьютерное моделирование комплексов гомологичных АП-эндонуклеаз hAPE1 человека, zAPE1 из *Danio rerio*, xAPE1 из *Xenopus laevis* и Rrp1 из *Drosophila melanogaster* с ДНК-субстратами, относящимися как к основной АП-эндонуклеазной активности ферментов, так и к второстепенной ИРН-активности. Моделирование комплексов в каталитически компетентном состоянии проводилось методом молекулярной динамики. Кинетические исследования взаимодействий ферментов zAPE1 с ДНК-субстратами были проведены с привлечением метода «остановленного потока». Данный метод позволяет регистрировать процессы связывания и конформационной подстройки молекул фермента и субстрата в режиме реального времени, начиная с первых миллисекунд взаимодействия. В качестве повреждения, специфически расщепляемого ферментами в ходе АП-эндонуклеазной реакции, был использован синтетический аналог АП-сайта - F-сайт. В качестве ИРН-субстратов для ферментов zAPE1 были использованы ДНК-дуплексы, содержащие такие повреждения как DHU, dU, αA, εA. Для регистрации глобальных конформационных изменений ДНК-субстратов в олигодезоксирибонуклеотиды вводили FRET-пару FAM/BHQ1.

Результаты компьютерного моделирования позволили заключить, что важным фактором субстратной специфичности APE1-подобных АП-эндонуклеаз является подвиж-

ность белковой петли, содержащей аминокислотные остатки с Asn229 по Thr233. Данные остатки ограничивают карман АЦ фермента, в который в точности помещаются АП-сайт и его аналог F-сайт. Согласно моделированию, расположение более объёмных повреждений, таких как нуклеотиды с повреждёнными основаниями, требует большего объёма кармана АЦ. Расширение кармана АЦ достигается конформационными перестройками «распознающей» петли Asn229-Thr233, сопровождающимися разрывом нескольких внутрибелковых водородных связей. Описанные конформационные перестройки присущи всем четырём исследованным ферментам – ДТ и мутантным формам Asn229Gly, Ala230Gly, Glu236Ala. Было замечено, что у всех четырёх ферментов в «распознающей» петле либо в её окрестности есть несколько консервативных аминокислотных остатков, предположительно ответственных за конформационную жёсткость петли – это Ala214, Gly231, Thr233 и Glu236. Эти остатки образуют сеть контактов вокруг «распознающей» петли. Было выдвинуто предположение, что одним из главных остатков, придающих жёсткость петле, является Glu236, имеющий стабильную в случае с F-сайтом, но разрывающуюся при ИРН-субстратах водородную связь с рядом расположенным остатком Thr233. Кроме того, было замечено, что в случае ИРН-субстратов происходит также нарушение контактов между фосфатной группой вывернутого нуклеотида и каталитическими аминокислотными остатками фермента – Tyr171, Asn212, His309. Причём, чем больше азотистое основание повреждённого нуклеотида, тем сильнее отклонение от конфигурации, подобной комплексу с F-сайтом, при котором образуются водородные связи со всеми тремя остатками, что тоже может влиять на эффективность катализа. Для фермента Rgp1, который не проявляет активности на α A-субстрате [222], было выдвинуто предположение о том, что главной причиной отсутствия активности является неправильная конформация α A-нуклеотида в АЦ. Это в свою очередь предположительно вызвано сниженной ДНК-связывающей способностью фермента по отношению к части ДНК-дуплекса, расположенной с 3'-стороны от повреждения, из-за замены Gly225Asn (относительно hAPE1), нарушающей конформацию белковой ДНК-связывающей петли Asn222-Asn229.

Вторым важным фактором субстратной специфичности, согласно моделированию траекторий выворачивания нуклеотидов, является белковая петля Val172-Arg177, располагающаяся на пути выворачивания. Остатки этой петли расположены так, что мимо неё может эффективно проходить только АП-сайт или F-сайт. При выворачивании нуклеотидов с основаниями возникают стерические конфликты. Для DHU эти затруднения невелики благодаря относительной гибкости основания, в то время как для дезоксиуридина и адениновых нуклеотидов жёсткость основания сказывается отрицательно. Для выворачивания таких нуклеотидов требуются конформационные перестройки петли Val172-Arg177, заклю-

чающиеся в увеличении расстояния между ней и петлёй Asn229-Thr233. В ферменте дикого типа эти петли тесно взаимодействуют, поэтому спонтанная потеря контактов между ними затруднительна. В то же время замена Glu236Ala снижает количество контактов между петлями и, согласно моделированию, облегчает их отдаление друг от друга, что в свою очередь облегчает и выворачивание нуклеотида.

Для проверки высказанных предположений о субстратной специфичности были получены мутантные формы zAPE1, содержащие замены Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala. Кинетика накопления продуктов реакции ферментов zAPE1 дикого типа и трёх мутантных форм была исследована методами регистрации продукта в геле и остановленного потока с различными ДНК-субстратами. Полученные данные свидетельствуют о том, что все ферменты сохранили АП-эндонуклеазную активность, хотя активность ферментов с заменами Ala230Gly и Glu236Ala была ниже в несколько раз относительно фермента ДТ. Для всех полученных мутантных форм методом остановленного потока был проведён кинетический анализ, позволивший определить кинетическую схему взаимодействия фермента с субстратом и рассчитать величины констант скоростей реакции. Результаты показали, что все ферменты имеют единый трёхстадийный механизм реакции взаимодействия с ДНК, содержащей F-сайт, в то время как величины констант реакций имеют значительный разброс значений для разных мутантных форм. По результатам проведённого анализа активности по отношению к ИРН-субстратам можно сделать заключение, что внесённые замены не снизили ИРН-активности ферментов ни на одном исследованном субстрате. Более того, мутантная форма Ala230Gly показала повышенную активность по отношению к ДНК-субстрату, содержащему dU, а мутантная форма Glu236Ala проявляла намного большую, чем у фермента ДТ, активность на широком спектре ДНК-субстратов, содержащих dU, αA и εA. Эти результаты в совокупности подтверждают результаты компьютерного моделирования, предсказавшие повышение эффективности ИРН-активности благодаря заменам, увеличивающим гибкость и подвижность белковой петли Asn229-Thr233.

Таким образом, в работе изучен механизм выворачивания и распознавания повреждённых нуклеотидов APE1-подобными АП-эндонуклеазами и установлены структурные особенности, обеспечивающие субстратную специфичность АП-эндонуклеаз hAPE1, zAPE1, xAPE1 и Rrp1, в том числе показано, что важный вклад в специфичность вносит положение и подвижность белковой петли Asn229-Thr233; получены и охарактеризованы мутантные формы Asn229Gly, Ala230Gly и Glu236Ala фермента zAPE1, обладающие изменённой субстратной специфичностью, а также показано, что мутантная форма Glu236Ala имеет значительно более эффективную ИРН-активность; и установлено, что формирование фермент-субстратных комплексов с ИРН-субстратами сопровождается

множественными конформационными изменениями ДНК, по-видимому, характеризующими квазистабильные состояния в процессе выворачивания повреждённых нуклеотидов в активный центр фермента.

Выводы

В данной работе исследован механизм выворачивания и распознавания повреждённых нуклеотидов АП-эндонуклеазами, подобными АРЕ1 человека, и на основе полученных данных созданы АП-эндонуклеазы zARE1 с изменённой субстратной специфичностью.

1) Методом молекулярной динамики показано, что размещение повреждённых оснований модельных олигонуклеотидных ДНК-субстратов инцизионной репарации нуклеотидов в активном центре АРЕ1-подобных АП-эндонуклеаз (hARE1, zARE1 из *D. rerio*, xARE1 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 АРЕ1-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 zARE1 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 zARE1 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.

Список литературы

- 1 . Lindahl T., Barnes D.E. Repair of Endogenous DNA Damage // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* - 2000. - Vol. 65. - № 0. - P. 127–134.
- 2 . Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis: DNA Damage and Repair // *Environ. Mol. Mutagen.* - 2017. - Vol. 58. - № 5. - P. 235–263.
- 3 . Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* - 1993. - Vol. 362. - № 6422. - P. 709–715.
- 4 . Freudenthal B.D. Base excision repair of oxidative DNA damage from mechanism to disease // *Front. Biosci.* - 2017. - Vol. 22. - № 9. - P. 1493–1522.
- 5 . Li M., Wilson D.M. Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 // *Antioxid. Redox Signal.* - 2014. - Vol. 20. - № 4. - P. 678–707.
- 6 . Gros L., Ishchenko A.A., Ide H., Elder R.H., Saparbaev M.K. The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - Vol. 32. - № 1. - P. 73–81.
- 7 . Gelin A., Redrejo-Rodríguez M., Laval J., Fedorova O.S., Saparbaev M., Ishchenko A.A. Genetic and biochemical characterization of human AP endonuclease 1 mutants deficient in nucleotide incision repair activity // *PLoS ONE.* - 2010. - Vol. 5. - № 8.
- 8 . Kuznetsova A.A., Matveeva A.G., Milov A.D., Vorobjev Y.N., Dzuba S.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Substrate specificity of human apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 in the nucleotide incision repair pathway // *Nucleic Acids Res.* - 2018. - Vol. 46. - № 21. - P. 11454–11465.
- 9 . Redrejo-Rodríguez M., Vigouroux A., Mursalimov A., Grin I., Alili D., Koshenov Z., Akishev Z., Maksimenko A., Bissenbaev A.K., Matkarimov B.T., Saparbaev M., Ishchenko A.A., Moréra S. Structural comparison of AP endonucleases from the exonuclease III family reveals new amino acid residues in human AP endonuclease 1 that are involved in incision of damaged DNA // *Biochimie.* - 2016. - Vol. 128–129. - P. 20–33.
- 10 . Retailleau P., Ishchenko A.A., Kuznetsov N.A., Saparbaev M., Moréra S. Crystallization and preliminary X-ray analysis of human endonuclease 1 (APE1) in complex with an oligonucleotide containing a 5,6-dihydrouracil (DHU) or an α -anomeric 2'-deoxyadenosine (α dA) modified base // *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* - 2010. - Vol. 66. - № 7. - P. 798–800.
- 11 . Hollingsworth S.A., Dror R.O. Molecular Dynamics Simulation for All // *Neuron.* - 2018. - Vol. 99. - № 6. - P. 1129–1143.

- 12 . Bornscheuer U.T., Huisman G.W., Kazlauskas R.J., Lutz S., Moore J.C., Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis // *Nature*. - 2012. - Vol. 485. - № 7397. - P. 185–194.
- 13 . Arnold F.H. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2018. - Vol. 57. - № 16. - P. 4143–4148.
- 14 . Barrozo A., Borstnar R., Marloie G., Kamerlin S.C.L. Computational Protein Engineering: Bridging the Gap between Rational Design and Laboratory Evolution // *Int. J. Mol. Sci.* - 2012. - Vol. 13. - № 12. - P. 12428–12460.
- 15 . Huang P.-S., Boyken S.E., Baker D. The coming of age of de novo protein design // *Nature*. - 2016. - Vol. 537. - № 7620. - P. 320–327.
- 16 . Wu L., Qin L., Nie Y., Xu Y., Zhao Y.-L. Computer-aided understanding and engineering of enzymatic selectivity // *Biotechnol. Adv.* - 2022. - Vol. 54. - P. 107793.
- 17 . Reetz M.T., Soni P., Acevedo J.P., Sanchis J. Creation of an Amino Acid Network of Structurally Coupled Residues in the Directed Evolution of a Thermostable Enzyme // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2009. - Vol. 48. - № 44. - P. 8268–8272.
- 18 . Zumárraga M., Bulter T., Shleev S., Polaina J., Martínez-Arias A., Plou F.J., Ballesteros A., Alcalde M. In Vitro Evolution of a Fungal Laccase in High Concentrations of Organic Cosolvents // *Chem. Biol.* - 2007. - Vol. 14. - № 9. - P. 1052–1064.
- 19 . Karanicolas J., Corn J.E., Chen I., Joachimiak L.A., Dym O., Peck S.H., Albeck S., Unger T., Hu W., Liu G., Delbecq S., T. Montelione G., P. Spiegel C., Liu D.R., Baker D. A De Novo Protein Binding Pair By Computational Design and Directed Evolution // *Mol. Cell.* - 2011. - Vol. 42. - № 2. - P. 250–260.
- 20 . Williams G.J., Zhang C., Thorson J.S. Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution // *Nat. Chem. Biol.* - 2007. - Vol. 3. - № 10. - P. 657–662.
- 21 . Bloom J., Meyer M., Meinhold P., Otey C., Macmillan D., Arnold F. Evolving strategies for enzyme engineering // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2005. - Vol. 15. - № 4. - P. 447–452.
- 22 . Kiss G., Çelebi-Ölçüm N., Moretti R., Baker D., Houk K.N. Computational Enzyme Design // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2013. - Vol. 52. - № 22. - P. 5700–5725.
- 23 . Peimbert M., Segovia L. Evolutionary engineering of a β -Lactamase activity on a D-Ala D-Ala transpeptidase fold // *Protein Eng. Des. Sel.* - 2003. - Vol. 16. - № 1. - P. 27–35.
- 24 . Siegel J.B., Zanghellini A., Lovick H.M., Kiss G., Lambert A.R., St.Clair J.L., Gallaher J.L., Hilvert D., Gelb M.H., Stoddard B.L., Houk K.N., Michael F.E., Baker D. Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction // *Science*. - 2010. - Vol. 329. - № 5989. - P. 309–313.

- 25 . Adolf-Bryfogle J., Teets F.D., Bahl C.D. Toward complete rational control over protein structure and function through computational design // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2021. - Vol. 66. - P. 170–177.
- 26 . Senior A.W. ... Hassabis D. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning // *Nature.* - 2020. - Vol. 577. - № 7792. - P. 706–710.
- 27 . Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions // *Proteins Struct. Funct. Genet.* - 2002. - Vol. 47. - № 4. - P. 409–443.
- 28 . Rydzewski J., Nowak W. Ligand diffusion in proteins via enhanced sampling in molecular dynamics // *Phys. Life Rev.* - 2017. - Vol. 22–23. - P. 58–74.
- 29 . Da L.-T., Yu J. Base-flipping dynamics from an intrahelical to an extrahelical state exerted by thymine DNA glycosylase during DNA repair process // *Nucleic Acids Res.* - 2018. - Vol. 46. - № 11. - P. 5410–5425.
- 30 . Aboelnga M.M., Wetmore S.D. Unveiling a Single-Metal-Mediated Phosphodiester Bond Cleavage Mechanism for Nucleic Acids: A Multiscale Computational Investigation of a Human DNA Repair Enzyme: research-article // *J. Am. Chem. Soc.* - American Chemical Society, 2019. - Vol. 141. - № 21. - P. 8646–8656.
- 31 . Nakai H., Kobayashi M., Yoshikawa T., Seino J., Ikabata Y., Nishimura Y. Divide-and-Conquer Linear-Scaling Quantum Chemical Computations // *J. Phys. Chem. A.* - 2023. - P. acs.jpca.2c06965.
- 32 . Ryde U. QM/MM Calculations on Proteins // *Methods in Enzymology.* - Elsevier, 2016. - Vol. 577. - P. 119–158.
- 33 . Go M.K., Zhao L.N., Xue B., Supekar S., Robinson R.C., Fan H., Yew W.S. Directed Computational Evolution of Quorum-Quenching Lactonases from the Amidohydrolase Superfamily // *Structure.* - 2020. - Vol. 28. - № 6. - P. 635-642.e3.
- 34 . Cui H., Cao H., Cai H., Jaeger K., Davari M.D., Schwaneberg U. Computer-Assisted Recombination (CompassR) Teaches us How to Recombine Beneficial Substitutions from Directed Evolution Campaigns // *Chem. – Eur. J.* - 2020. - Vol. 26. - № 3. - P. 643–649.
- 35 . Wittmann B.J., Johnston K.E., Wu Z., Arnold F.H. Advances in machine learning for directed evolution // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2021. - Vol. 69. - P. 11–18.
- 36 . Smith B. Dynamics of Proteins and Nucleic Acids // *Biochem. Educ.* - 1989. - Vol. 17. - № 4. - P. 220.
- 37 . Rapaport D.C. *The Art of Molecular Dynamics Simulation.* 2nd ed. - Cambridge University Press, 2004.

- 38 . Alder B.J., Wainwright T.E. Phase Transition for a Hard Sphere System // *J. Chem. Phys.* - 1957. - Vol. 27. - № 5. - P. 1208–1209.
- 39 . McCammon J.A., Gelin B.R., Karplus M. Dynamics of folded proteins // *Nature*. - 1977. - Vol. 267. - № 5612. - P. 585–590.
- 40 . Fernandez-Leiro R., Scheres S.H.W. Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy // *Nature*. - 2016. - Vol. 537. - № 7620. - P. 339–346.
- 41 . Salomon-Ferrer R., Götz A.W., Poole D., Le Grand S., Walker R.C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald // *J. Chem. Theory Comput.* - 2013. - Vol. 9. - № 9. - P. 3878–3888.
- 42 . Adcock S.A., McCammon J.A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins // *Chem. Rev.* - 2006. - Vol. 106. - № 5. - P. 1589–1615.
- 43 . Case D.A., Cheatham T.E., Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J. The Amber biomolecular simulation programs // *J. Comput. Chem.* - 2005. - Vol. 26. - № 16. - P. 1668–1688.
- 44 . Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindah E. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // *SoftwareX*. - 2015. - Vol. 1–2. - P. 19–25.
- 45 . Pearlman D.A., Case D.A., Caldwell J.W., Ross W.S., Cheatham T.E., DeBolt S., Ferguson D., Seibel G., Kollman P. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules // *Comput. Phys. Commun.* - 1995. - Vol. 91. - № 1–3. - P. 1–41.
- 46 . Berendsen H.J.C., Van Der Spoel D., Van Drunen R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation // *Comput. Phys. Commun.* - 1995. - Vol. 91. - № 1–3. - P. 43–56.
- 47 . Ponder J.W., Case D.A. Force Fields for Protein Simulations // *Advances in Protein Chemistry*. - Elsevier, 2003. - Vol. 66. - P. 27–85.
- 48 . Christen M., Hünenberger P.H., Bakowies D., Baron R., Bürgi R., Geerke D.P., Heinz T.N., Kastenholz M.A., Kräutler V., Oostenbrink C., Peter C., Trzesniak D., Van Gunsteren W.F. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05 // *J. Comput. Chem.* - 2005. - Vol. 26. - № 16. - P. 1719–1751.
- 49 . Bayly C.I., Cieplak P., Cornell W., Kollman P.A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model // *J. Phys. Chem.* - 1993. - Vol. 97. - № 40. - P. 10269–10280.

- 50 . Robustelli P., Piana S., Shaw D.E. Developing a molecular dynamics force field for both folded and disordered protein states // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2018. - Vol. 115. - № 21.
- 51 . Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations // *J. Comput. Chem.* - 1983. - Vol. 4. - № 2. - P. 187–217.
- 52 . Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. Development and testing of a general amber force field // *J. Comput. Chem.* - 2004. - Vol. 25. - № 9. - P. 1157–1174.
- 53 . Vanommeslaeghe K., MacKerell A.D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing // *J. Chem. Inf. Model.* - 2012. - Vol. 52. - № 12. - P. 3144–3154.
- 54 . van Duin A.C.T., Dasgupta S., Lorant F., Goddard W.A. ReaxFF: A Reactive Force Field for Hydrocarbons // *J. Phys. Chem. A.* - 2001. - Vol. 105. - № 41. - P. 9396–9409.
- 55 . Gautam B. Energy Minimization // *Homology Molecular Modeling - Perspectives and Applications* / ed. Trindade Maia R., Maciel De Moraes Filho R., Campos M. - IntechOpen, 2021.
- 56 . Wassenaar T.A., Mark A.E. The effect of box shape on the dynamic properties of proteins simulated under periodic boundary conditions // *J. Comput. Chem.* - 2006. - Vol. 27. - № 3. - P. 316–325.
- 57 . Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., Van Gunsteren W.F., Hermans J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration // *Intermolecular Forces* / ed. Pullman B. - Dordrecht: Springer Netherlands, 1981. - Vol. 14. - P. 331–342.
- 58 . Van Maaren P.J., Van Der Spoel D. Molecular Dynamics Simulations of Water with Novel Shell-Model Potentials // *J. Phys. Chem. B.* - 2001. - Vol. 105. - № 13. - P. 2618–2626.
- 59 . Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations // *J. Comput. Chem.* - 1997. - Vol. 18. - № 12. - P. 1463–1472.
- 60 . Praprotnik M., Janežič D., Mavri J. Temperature Dependence of Water Vibrational Spectrum: A Molecular Dynamics Simulation Study // *J. Phys. Chem. A.* - 2004. - Vol. 108. - № 50. - P. 11056–11062.
- 61 . Marsh D. Polarity and permeation profiles in lipid membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2001. - Vol. 98. - № 14. - P. 7777–7782.
- 62 . Sharp K.A., Nicholls A., Fine R.F., Honig B. Reconciling the Magnitude of the Microscopic and Macroscopic Hydrophobic Effects // *Science.* - 1991. - Vol. 252. - № 5002. - P. 106–109.
- 63 . Darden T., York D., Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems // *J. Chem. Phys.* - 1993. - Vol. 98. - № 12. - P. 10089–10092.

- 64 . Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., Van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.* - 1984. - Vol. 81. - № 8. - P. 3684–3690.
- 65 . Posch H.A., Hoover W.G., Vesely F.J. Canonical dynamics of the Nosé oscillator: Stability, order, and chaos // *Phys. Rev. A.* - 1986. - Vol. 33. - № 6. - P. 4253–4265.
- 66 . Jarzynski C. Equilibrium free-energy differences from nonequilibrium measurements: A master-equation approach // *Phys. Rev. E.* - 1997. - Vol. 56. - № 5. - P. 5018–5035.
- 67 . Izrailev S., Stepaniants S., Isralewitz B., Kosztin D., Lu H., Molnar F., Wriggers W., Schulten K. Steered Molecular Dynamics // *Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas* / ed. Deuffhard P. ... Skeel R.D. - Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. - Vol. 4. - P. 39–65.
- 68 . Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch. Atomic Force Microscope // *Phys. Rev. Lett.* - 1986. - Vol. 56. - № 9. - P. 930–933.
- 69 . Svoboda K., Block S.M. Biological Applications of Optical Forces // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* - 1994. - Vol. 23. - № 1. - P. 247–285.
- 70 . Evans E., Ritchie K., Merkel R. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces // *Biophys. J.* - 1995. - Vol. 68. - № 6. - P. 2580–2587.
- 71 . Israelachvili J., Min Y., Akbulut M., Alig A., Carver G., Greene W., Kristiansen K., Meyer E., Pesika N., Rosenberg K., Zeng H. Recent advances in the surface forces apparatus (SFA) technique // *Rep. Prog. Phys.* - 2010. - Vol. 73. - № 3. - P. 036601.
- 72 . Alston J.J., Soranno A., Holehouse A.S. Integrating single-molecule spectroscopy and simulations for the study of intrinsically disordered proteins // *Methods.* - 2021. - Vol. 193. - P. 116–135.
- 73 . Li Y., Arghittu S.M., Dietz M.S., Hella G.J., Haße D., Ferraris D.M., Freund P., Barth H.-D., Iamele L., De Jonge H., Niemann H.H., Covino R., Heilemann M. Single-molecule imaging and molecular dynamics simulations reveal early activation of the MET receptor in cells // *Nat. Commun.* - 2024. - Vol. 15. - № 1. - P. 9486.
- 74 . Yang L., Zhang Z., Zhao C., Huo Y., Zhang E., He S., Jia C., Guo X. Monitoring Molecular Dynamics with Single-Molecule Electronic Devices and Fluorescence Techniques[†] // *Chin. J. Chem.* - 2023. - Vol. 41. - № 21. - P. 2889–2907.
- 75 . А. В. Попов. Молекулярно-динамический анализ субстратной специфичности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз бактерий и человека. - Новосибирск, 2017.

- 76 . Schlitter J., Engels M., Krüger P. Targeted molecular dynamics: A new approach for searching pathways of conformational transitions // *J. Mol. Graph.* - 1994. - Vol. 12. - № 2. - P. 84–89.
- 77 . Torrie G.M., Valleau J.P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling // *J. Comput. Phys.* - 1977. - Vol. 23. - № 2. - P. 187–199.
- 78 . Lemkul J.A., Bevan D.R. Assessing the Stability of Alzheimer’s Amyloid Protofibrils Using Molecular Dynamics // *J. Phys. Chem. B.* - 2010. - Vol. 114. - № 4. - P. 1652–1660.
- 79 . Hagan M.F., Dinner A.R., Chandler D., Chakraborty A.K. Atomistic understanding of kinetic pathways for single base-pair binding and unbinding in DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2003. - Vol. 100. - № 24. - P. 13922–13927.
- 80 . Keepers J., Kollman P.A., James T.L. Molecular mechanical studies of base-pair opening in d(CGCGC):d(GCGCG), dG5·dC5, d(TATAT):d(ATATA), and dA5·dT5 in the B and Z forms of DNA // *Biopolymers.* - 1984. - Vol. 23. - № 11. - P. 2499–2511.
- 81 . Law S.M., Feig M. Base-Flipping Mechanism in Postmismatch Recognition by MutS // *Biophys. J.* - 2011. - Vol. 101. - № 9. - P. 2223–2231.
- 82 . Tubbs A., Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer // *Cell.* - 2017. - Vol. 168. - № 4. - P. 644–656.
- 83 . Beard W.A., Horton J.K., Prasad R., Wilson S.H. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism // *Annu. Rev. Biochem.* - 2019. - Vol. 88. - № 1. - P. 137–162.
- 84 . Moor N.A., Lavrik O.I. Protein–Protein Interactions in DNA Base Excision Repair // *Biochem. Mosc.* - 2018. - Vol. 83. - № 4. - P. 411–422.
- 85 . Ayyildiz D., Antoniali G., D’Ambrosio C., Mangiapane G., Dalla E., Scaloni A., Tell G., Piazza S. Architecture of The Human Ape1 Interactome Defines Novel Cancers Signatures // *Sci. Rep.* - 2020. - Vol. 10. - № 1. - P. 28.
- 86 . Boiteux S., Jinks-Robertson S. DNA Repair Mechanisms and the Bypass of DNA Damage in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* - 2013. - Vol. 193. - № 4. - P. 1025–1064.
- 87 . Ljungquist S., Andersson A., Lindahl T. A mammalian endonuclease specific for apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. II. Further studies on the substrate specificity // *J. Biol. Chem.* - 1974. - Vol. 249. - № 5. - P. 1536–1540.
- 88 . Muench K.F., Misra R.P., Humayun M.Z. Sequence specificity in aflatoxin B1--DNA interactions. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1983. - Vol. 80. - № 1. - P. 6–10.
- 89 . Sobol R.W., Prasad R., Evenski A., Baker A., Yang X.-P., Horton J.K., Wilson S.H. The lyase activity of the DNA repair protein β -polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity // *Nature.* - 2000. - Vol. 405. - № 6788. - P. 807–810.

- 90 . Drohat A.C., Coey C.T. Role of Base Excision “Repair” Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA // *Chem. Rev.* - 2016. - Vol. 116. - № 20. - P. 12711–12729.
- 91 . Mitra S., Izumi T., Boldogh I., Bhakat K.K., Hill J.W., Hazra T.K. Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes^{1,2} ¹Guest Editor: Miral Dizdaroglu ²This article is part of a series of reviews on “Oxidative DNA Damage and Repair.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. // *Free Radic. Biol. Med.* - 2002. - Vol. 33. - № 1. - P. 15–28.
- 92 . Demple B., Harrison L. REPAIR OF OXIDATIVE DAMAGE TO DNA: Enzymology and Biology // *Annu. Rev. Biochem.* - 1994. - Vol. 63. - № 1. - P. 915–948.
- 93 . Wilde J.A., Bolton P.H., Mazumder A., Manoharan M., Gerlt J.A. Characterization of the equilibrating forms of the aldehydic abasic site in duplex DNA by oxygen-17 NMR // *J. Am. Chem. Soc.* - 1989. - Vol. 111. - № 5. - P. 1894–1896.
- 94 . Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways // *DNA Repair.* - 2007. - Vol. 6. - № 4. - P. 398–409.
- 95 . Beard W.A. DNA polymerase β : Closing the gap between structure and function // *DNA Repair.* - 2020. - Vol. 93. - P. 102910.
- 96 . Xia L., Zheng L., Lee H.-W., Bates S.E., Federico L., Shen B., O’Connor T.R. Human 3-Methyladenine-DNA Glycosylase: Effect of Sequence Context on Excision, Association with PCNA, and Stimulation by AP Endonuclease // *J. Mol. Biol.* - 2005. - Vol. 346. - № 5. - P. 1259–1274.
- 97 . Liu Y., Beard W.A., Shock D.D., Prasad R., Hou E.W., Wilson S.H. DNA Polymerase β and Flap Endonuclease 1 Enzymatic Specificities Sustain DNA Synthesis for Long Patch Base Excision Repair // *J. Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 280. - № 5. - P. 3665–3674.
- 98 . Lucas-Lledo J.I., Maddamsetti R., Lynch M. Phylogenomic Analysis of the Uracil-DNA Glycosylase Superfamily // *Mol. Biol. Evol.* - 2011. - Vol. 28. - № 3. - P. 1307–1317.
- 99 . Elsakrmy N., Zhang-Akiyama Q.-M., Ramotar D. The Base Excision Repair Pathway in the Nematode *Caenorhabditis elegans* // *Front. Cell Dev. Biol.* - 2020. - Vol. 8.
- 100 . Muha V., Horváth A., Békési A., Pukáncsik M., Hodoscsek B., Merényi G., Róna G., Batki J., Kiss I., Jankovics F., Vilmos P., Erdélyi M., Vértessy B.G. Uracil-Containing DNA in *Drosophila*: Stability, Stage-Specific Accumulation, and Developmental Involvement // *PLoS Genet.* / ed. Hawley R.S. - 2012. - Vol. 8. - № 6. - P. e1002738.
- 101 . Jacobs A.L., Schär P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond // *Chromosoma.* - 2012. - Vol. 121. - № 1. - P. 1–20.

- 102 . Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H., Mitra S., Hazra T.K. AP Endonuclease-Independent DNA Base Excision Repair in Human Cells // *Mol. Cell.* - 2004. - Vol. 15. - № 2. - P. 209–220.
- 103 . Maher R.L., Wallace S.S., Pederson D.S. The lyase activity of bifunctional DNA glycosylases and the 3'-diesterase activity of APE1 contribute to the repair of oxidized bases in nucleosomes // *Nucleic Acids Res.* - 2019. - Vol. 47. - № 6. - P. 2922–2931.
- 104 . Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Kinetic features of 30-50 exonuclease activity of human AP-endonuclease ape1 // *Molecules.* - 2018. - Vol. 23. - № 9. - P. 1–14.
- 105 . Woodrick J., Gupta S., Camacho S., Parvathaneni S., Choudhury S., Cheema A., Bai Y., Khatkar P., Erkizan H.V., Sami F., Su Y., Schärer O.D., Sharma S., Roy R. A new sub-pathway of long-patch base excision repair involving 5' gap formation // *EMBO J.* - 2017. - Vol. 36. - № 11. - P. 1605–1622.
- 106 . Sallmyr A., Rashid I., Bhandari S.K., Naila T., Tomkinson A.E. Human DNA ligases in replication and repair // *DNA Repair.* - 2020. - Vol. 93. - P. 102908.
- 107 . Çağlayan M., Wilson S.H. Oxidant and environmental toxicant-induced effects compromise DNA ligation during base excision DNA repair // *DNA Repair.* - 2015. - Vol. 35. - P. 85–89.
- 108 . Reynolds P., Cooper S., Lomax M., O'Neill P. Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions // *Nucleic Acids Res.* - 2015. - Vol. 43. - № 8. - P. 4028–4038.
- 109 . Lavrik O.I. PARPs' impact on base excision DNA repair // *DNA Repair.* - 2020. - Vol. 93. - P. 102911.
- 110 . Prasad R., Shock D.D., Beard W.A., Wilson S.H. Substrate Channeling in Mammalian Base Excision Repair Pathways: Passing the Baton // *J. Biol. Chem.* - 2010. - Vol. 285. - № 52. - P. 40479–40488.
- 111 . Malfatti M.C., Antoniali G., Codrich M., Burra S., Mangiapane G., Dalla E., Tell G. New perspectives in cancer biology from a study of canonical and non-canonical functions of base excision repair proteins with a focus on early steps // *Mutagenesis.* - 2020. - Vol. 35. - № 1. - P. 129–149.
- 112 . Czarny P., Kwiatkowski D., Galecki P., Talarowska M., Orzechowska A., Bobinska K., Bielecka-Kowalska A., Szemraj J., Maes M., Su K.-P., Sliwinski T. Association between single nucleotide polymorphisms of MUTYH, hOGG1 and NEIL1 genes, and depression // *J. Affect. Disord.* - 2015. - Vol. 184. - P. 90–96.

- 113 . Jiang S., Gai X., Mao T., Yu H., Cheng Z. Associations of APE1 and OGG1 polymorphisms with onset and prognosis of bladder cancer // *Panminerva Med.* - 2022. - Vol. 64. - № 4.
- 114 . Kwiatkowski D., Czarny P., Galecki P., Bachurska A., Talarowska M., Orzechowska A., Bobińska K., Bielecka-Kowalska A., Pietras T., Szemraj J., Maes M., Sliwinski T. Variants of Base Excision Repair Genes MUTYH, PARP1 and XRCC1 in Alzheimer's Disease Risk // *Neuropsychobiology.* - 2015. - Vol. 71. - № 3. - P. 176–186.
- 115 . Mohamed R.H., El-Shal A.S., El-Shahawy E.E., Abdel Galil S.M. Association of XRCC1 and OGG1 DNA repair gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian patients // *Gene.* - 2016. - Vol. 578. - № 1. - P. 112–116.
- 116 . Wright G., Gassman N.R. Transcriptional dysregulation of base excision repair proteins in breast cancer // *DNA Repair.* - 2020. - Vol. 93. - P. 102922.
- 117 . Ke, Wang, Zhang, Zhong, Wang, Zeng, Ba. The Role of PARPs in Inflammation—and Metabolic—Related Diseases: Molecular Mechanisms and Beyond // *Cells.* - 2019. - Vol. 8. - № 9. - P. 1047.
- 118 . Londero A.P., Orsaria M., Tell G., Marzinotto S., Capodicasa V., Poletto M., Vascotto C., Sacco C., Mariuzzi L. Expression and Prognostic Significance of APE1/Ref-1 and NPM1 Proteins in High-Grade Ovarian Serous Cancer // *Am. J. Clin. Pathol.* - 2014. - Vol. 141. - № 3. - P. 404–414.
- 119 . Nikoomanzar A., Chim N., Yik E.J., Chaput J.C. Engineering polymerases for applications in synthetic biology // *Q. Rev. Biophys.* - 2020. - Vol. 53. - P. e8.
- 120 . Carvajal-Maldonado D., Drogalis Beckham L., Wood R.D., Doublé S. When DNA Polymerases Multitask: Functions Beyond Nucleotidyl Transfer // *Front. Mol. Biosci.* - 2022. - Vol. 8.
- 121 . Johnson S.S., Hebsgaard M.B., Christensen T.R., Mastepanov M., Nielsen R., Munch K., Brand T., Gilbert M.T.P., Zuber M.T., Bunce M., Rønn R., Gilichinsky D., Froese D., Willerslev E. Ancient bacteria show evidence of DNA repair // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2007. - Vol. 104. - № 36. - P. 14401–14405.
- 122 . Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions // *Gene.* - 1990. - Vol. 93. - № 1. - P. 125–128.
- 123 . Rashtchian A., Buchman G.W., Schuster D.M., Berninger M.S. Uracil DNA glycosylase-mediated cloning of polymerase chain reaction-amplified DNA: Application to genomic and cDNA cloning // *Anal. Biochem.* - 1992. - Vol. 206. - № 1. - P. 91–97.

- 124 . Whitaker A.M., Freudenthal B.D. APE1: A skilled nucleic acid surgeon // DNA Repair. - 2018. - Vol. 71. - P. 93–100.
- 125 . Schormann N., Ricciardi R., Chattopadhyay D. Uracil-DNA glycosylases-Structural and functional perspectives on an essential family of DNA repair enzymes: Uracil-DNA Glycosylases // Protein Sci. - 2014. - Vol. 23. - № 12. - P. 1667–1685.
- 126 . Mol C.D., Arvai A.S., Slupphaug G., Kavli B., Alseth I., Krokan H.E., Tainer J.A. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: Structural basis for specificity and catalysis // Cell. - 1995. - Vol. 80. - № 6. - P. 869–878.
- 127 . Kavli B., Slupphaug G., Mol C.D., Arvai A.S., Peterson S.B., Tainer J.A., Krokan H.E. Excision of cytosine and thymine from DNA by mutants of human uracil-DNA glycosylase. // EMBO J. - 1996. - Vol. 15. - № 13. - P. 3442–3447.
- 128 . Kimber S.T., Brown T., Fox K.R. A Mutant of Uracil DNA Glycosylase That Distinguishes between Cytosine and 5-Methylcytosine // PLoS ONE. - 2014. - Vol. 9. - № 4. - P. e95394.
- 129 . Jiang Y.L., Kwon K., Stivers J.T. Turning On Uracil-DNA Glycosylase Using a Pyrene Nucleotide Switch // J. Biol. Chem. - 2001. - Vol. 276. - № 45. - P. 42347–42354.
- 130 . Acharya N. Substitutions at tyrosine 66 of Escherichia coli uracil DNA glycosylase lead to characterization of an efficient enzyme that is recalcitrant to product inhibition // Nucleic Acids Res. - 2003. - Vol. 31. - № 24. - P. 7216–7226.
- 131 . Lee D.-H., Liu Y., Lee H.-W., Xia B., Brice A.R., Park S.-H., Balduf H., Dominy B.N., Cao W. A structural determinant in the uracil DNA glycosylase superfamily for the removal of uracil from adenine/uracil base pairs // Nucleic Acids Res. - 2015. - Vol. 43. - № 2. - P. 1081–1089.
- 132 . Kwon K., Jiang Y.L., Stivers J.T. Rational Engineering of a DNA Glycosylase Specific for an Unnatural Cytosine:Pyrene Base Pair // Chem. Biol. - 2003. - Vol. 10. - № 4. - P. 351–359.
- 133 . Jiang Y.L., Stivers J.T., Song F. Base-Flipping Mutations of Uracil DNA Glycosylase: Substrate Rescue Using a Pyrene Nucleotide Wedge // Biochemistry. - 2002. - Vol. 41. - № 37. - P. 11248–11254.
- 134 . Maiti A., Noon M.S., MacKerell A.D., Pozharski E., Drohat A.C. Lesion processing by a repair enzyme is severely curtailed by residues needed to prevent aberrant activity on undamaged DNA // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2012. - Vol. 109. - № 21. - P. 8091–8096.
- 135 . Hashimoto H., Zhang X., Cheng X. Selective Excision of 5-Carboxylcytosine by a Thymine DNA Glycosylase Mutant // J. Mol. Biol. - 2013. - Vol. 425. - № 6. - P. 971–976.

- 136 . Asaeda A., Ide H., Asagoshi K., Matsuyama S., Tano K., Murakami A., Takamori Y., Kubo K. Substrate Specificity of Human Methylpurine DNA *N*-Glycosylase // *Biochemistry*. - 2000. - Vol. 39. - № 8. - P. 1959–1965.
- 137 . Connor E.E., Wyatt M.D. Active-Site Clashes Prevent the Human 3-Methyladenine DNA Glycosylase from Improperly Removing Bases // *Chem. Biol.* - 2002. - Vol. 9. - № 9. - P. 1033–1041.
- 138 . Yeo J., Goodman R.A., Schirle N.T., David S.S., Beal P.A. RNA editing changes the lesion specificity for the DNA repair enzyme NEIL1 // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2010. - Vol. 107. - № 48. - P. 20715–20719.
- 139 . Minko I.G., Vartanian V.L., Tozaki N.N., Coskun E., Coskun S.H., Jaruga P., Yeo J., David S.S., Stone M.P., Egli M., Dizdaroglu M., McCullough A.K., Lloyd R.S. Recognition of DNA adducts by edited and unedited forms of DNA glycosylase NEIL1 // *DNA Repair*. - 2020. - Vol. 85. - P. 102741.
- 140 . Im E.K., Han Y.S., Chung J.H. Functional changes in a novel uracil-DNA glycosylase determined by mutational analyses // *Microbiology*. - 2008. - Vol. 77. - № 5. - P. 572–578.
- 141 . Williams S.D., David S.S. A Single Engineered Point Mutation in the Adenine Glycosylase MutY Confers Bifunctional Glycosylase/AP Lyase Activity // *Biochemistry*. - 2000. - Vol. 39. - № 33. - P. 10098–10109.
- 142 . Dalhus B., Forsbring M., Helle I.H., Vik E.S., Forstrøm R.J., Backe P.H., Alseth I., Bjørås M. Separation-of-Function Mutants Unravel the Dual-Reaction Mode of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase // *Structure*. - 2011. - Vol. 19. - № 1. - P. 117–127.
- 143 . Erzberger J.P., Wilson D.M. The role of Mg²⁺ and specific amino acid residues in the catalytic reaction of the major human abasic endonuclease: New insights from EDTA-resistant incision of acyclic abasic site analogs and site-directed mutagenesis // *J. Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 290. - № 2. - P. 447–457.
- 144 . Wilson D.M. Ape1 abasic endonuclease activity is regulated by magnesium and potassium concentrations and is robust on alternative DNA structures // *J. Mol. Biol.* - 2005. - Vol. 345. - № 5. - P. 1003–1014.
- 145 . Grafstrom R.H., Shaper N.L., Grossman L. Human placental apurinic/aprimidinic endonuclease. Mechanism of action // *J. Biol. Chem.* - 1982. - Vol. 257. - № 22. - P. 13459–13464.
- 146 . Chou K., Cheng Y. The Exonuclease Activity of Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (APE1) // *J. Biol. Chem.* - 2003. - Vol. 278. - № 20. - P. 18289–18296.
- 147 . Schermerhorn K.M., Delaney S. Transient-State Kinetics of Apurinic/Apyrimidinic (AP) Endonuclease 1 Acting on an Authentic AP Site and Commonly Used Substrate Analogs:

- The Effect of Diverse Metal Ions and Base Mismatches // *Biochemistry*. - 2013. - Vol. 52. - № 43. - P. 7669–7677.
- 148 . Freudenthal B.D., Beard W.A., Cuneo M.J., Dyrkheeva N.S., Wilson S.H. Capturing snapshots of APE1 processing DNA damage // *Nat. Struct. Mol. Biol.* - 2015. - Vol. 22. - № 11. - P. 924–931.
- 149 . Beloglazova N.G. Thermodynamic, kinetic and structural basis for recognition and repair of abasic sites in DNA by apurinic/apyrimidinic endonuclease from human placenta // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - Vol. 32. - № 17. - P. 5134–5146.
- 150 . Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson D.M., Rupp B. Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/apyrimidinic endonuclease, ape1: implications for the catalytic mechanism 1 1Edited by I. A. Wilson // *J. Mol. Biol.* - 2001. - Vol. 307. - № 4. - P. 1023–1034.
- 151 . Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination // *Nature*. - 2000. - Vol. 403. - № 6768. - P. 451–456.
- 152 . Mundle S.T., Delaney J.C., Essigmann J.M., Strauss P.R. Enzymatic Mechanism of Human Apurinic / Apyrimidinic Endonuclease against a THF AP Site Model Substrate // *Biochemistry*. - 2009. - № 24. - P. 19–26.
- 153 . Oezguen N., Schein C.H., Peddi S.R., Power T.D., Izumi T., Braun W. A “moving metal mechanism” for substrate cleavage by the DNA repair endonuclease APE-1 // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* - 2007. - Vol. 68. - № 1. - P. 313–323.
- 154 . Oezguen N., Mantha A.K., Izumi T., Schein C.H., Mitra S., Braun W. MD simulation and experimental evidence for Mg²⁺ binding at the b site in human AP endonuclease 1 // *Bioinformation*. - 2011. - Vol. 7. - № 4. - P. 184–198.
- 155 . Tsutakawa S.E., Shin D.S., Mol C.D., Izumi T., Arvai A.S., Mantha A.K., Szczesny B., Ivanov I.N., Hosfield D.J., Maiti B., Pique M.E., Frankel K.A., Hitomi K., Cunningham R.P., Mitra S., Tainer J.A. Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes // *J. Biol. Chem.* - 2013. - Vol. 288. - № 12. - P. 8445–8455.
- 156 . Batebi H., Dragelj J., Imhof P. Role of AP-endonuclease (Ape1) active site residues in stabilization of the reactant enzyme-DNA complex // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* - 2018. - Vol. 86. - № 4. - P. 439–453.
- 157 . Seki S., Ikeda S., Watanabe S., Hatsushika M., Tsutsui K., Akiyama K., Zhang B. A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/apyrimidinic

- endonuclease activities: purification and characterization // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* - 1991. - Vol. 1079. - № 1. - P. 57–64.
- 158 . Dyrkheeva N.S., Khodyreva S.N., Sukhanova M.V., Safronov I.V., Dezhurov S.V., Lavrik O.I. 3'–5' exonuclease activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 towards DNAs containing dNMP and their modified analogs at the 3' end of single strand DNA break // *Biochem. Mosc.* - 2006. - Vol. 71. - № 2. - P. 200–210.
- 159 . Hadi M.Z., Ginalski K., Nguyen L.H., Wilson D.M. Determinants in nuclease specificity of *ape1* and *ape2*, human homologues of *Escherichia coli* exonuclease III // *J. Mol. Biol.* - 2002. - Vol. 316. - № 3. - P. 853–866.
- 160 . Chou K.-M., Cheng Y.-C. An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA // *Nature.* - 2002. - Vol. 415. - № 6872. - P. 655–659.
- 161 . Lebedeva N.A., Khodyreva S.N., Favre A., Lavrik O.I. AP endonuclease 1 has no biologically significant 3'→5'-exonuclease activity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2003. - Vol. 300. - № 1. - P. 182–187.
- 162 . Parsons J.L., Dianova I.I., Dianov G.L. APE1-dependent repair of DNA single-strand breaks containing 3'-end 8-oxoguanine // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - Vol. 33. - № 7. - P. 2204–2209.
- 163 . Wallace B.D., Berman Z., Mueller G.A., Lin Y., Chang T., Andres S.N., Wojtaszek J.L., DeRose E.F., Appel C.D., London R.E., Yan S., Williams R.S. APE2 Zf-GRF facilitates 3'-5' resection of DNA damage following oxidative stress // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2017. - Vol. 114. - № 2. - P. 304–309.
- 164 . Wilson D.M. Properties of and Substrate Determinants for the Exonuclease Activity of Human Apurinic Endonuclease *Ape1* // *J. Mol. Biol.* - 2003. - Vol. 330. - № 5. - P. 1027–1037.
- 165 . Wong D., DeMott M.S., Demple B. Modulation of the 3'→5'-Exonuclease Activity of Human Apurinic Endonuclease (*Ape1*) by Its 5'-incised Abasic DNA Product // *J. Biol. Chem.* - 2003. - Vol. 278. - № 38. - P. 36242–36249.
- 166 . Chen D.S., Herman T., Demple B. Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA // *Nucleic Acids Res.* - 1991. - Vol. 19. - № 21. - P. 5907–5914.
- 167 . Izumi T., Hazra T.K., Boldogh I., Tomkinson A.E., Park M.S., Ikeda S., Mitra S. Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species // *Carcinogenesis.* - 2000. - Vol. 21. - № 7. - P. 1329–1334.

- 168 . Doetsch P.W., Cunningham R.P. The enzymology of apurinic/aprimidinic endonucleases // *Mutat. Res. Repair*. - 1990. - Vol. 236. - № 2–3. - P. 173–201.
- 169 . Hegde M.L., Izumi T., Mitra S. Oxidized Base Damage and Single-Strand Break Repair in Mammalian Genomes // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. - Elsevier, 2012. - Vol. 110. - P. 123–153.
- 170 . Suh D., Wilson D.M., Povirk L.F. 3'-Phosphodiesterase activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease at DNA double-strand break ends // *Nucleic Acids Res.* - 1997. - Vol. 25. - № 12. - P. 2495–2500.
- 171 . Ischenko A.A., Saparbaev M.K. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage // *Nature*. - 2002. - Vol. 415. - № 6868. - P. 183–187.
- 172 . Guliaev A.B., Hang B., Singer B. Structural insights by molecular dynamics simulations into specificity of the major human AP endonuclease toward the benzene-derived DNA adduct, pBQ-C // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - Vol. 32. - № 9. - P. 2844–2852.
- 173 . Ishchenko A.A., Ide H., Ramotar D., Nevinsky G., Saparbaev M. Alpha-anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases. // *Biochemistry*. - 2004. - Vol. 43. - № 48. - P. 15210–15216.
- 174 . Daviet S., Couvé-Privat S., Gros L., Shinozuka K., Ide H., Saparbaev M., Ishchenko A.A. Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway // *DNA Repair*. - 2007. - Vol. 6. - № 1. - P. 8–18.
- 175 . Prorok P., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Fedorova O.S., Ishchenko A.A., Leh H., Buckle M., Tudek B., Saparbaev M. Highly Mutagenic Exocyclic DNA Adducts Are Substrates for the Human Nucleotide Incision Repair Pathway // *PLoS ONE*. - 2012. - Vol. 7. - № 12. - P. e51776.
- 176 . Prorok P., Alili D., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Tudek B., Saparbaev M.K. Uracil in duplex DNA is a substrate for the nucleotide incision repair pathway in human cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2013. - Vol. 110. - № 39. - P. E3695–E3703.
- 177 . Ishchenko A.A., Deprez E., Maksimenko A., Brochon J.-C., Tauc P., Saparbaev M.K. Uncoupling of the base excision and nucleotide incision repair pathways reveals their respective biological roles // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2006. - Vol. 103. - № 8. - P. 2564–2569.
- 178 . Barzilay G., Walker L.J., Robson C.N., Hickson I.D. Site-directed mutagenesis of the human DNA repair enzyme HAP1: identification of residues important for AP

- endonuclease and RNase H activity // *Nucleic Acids Res.* - 1995. - Vol. 23. - № 9. - P. 1544–1550.
- 179 . Berquist B.R., McNeill D.R., Wilson D.M. Characterization of Abasic Endonuclease Activity of Human Ape1 on Alternative Substrates, as Well as Effects of ATP and Sequence Context on AP Site Incision // *J. Mol. Biol.* - 2008. - Vol. 379. - № 1. - P. 17–27.
- 180 . Kim W.-C., King D., Lee C.H. RNA-cleaving properties of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* - 2010. - Vol. 1. - № 1. - P. 12–25.
- 181 . Esadze A., Rodriguez G., Cravens S.L., Stivers J.T. AP-Endonuclease 1 Accelerates Turnover of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase by Preventing Retrograde Binding to the Abasic-Site Product // *Biochemistry.* - 2017. - Vol. 56. - № 14. - P. 1974–1986.
- 182 . Waters T.R., Gallinari P., Jiricny J., Swann P.F. Human Thymine DNA Glycosylase Binds to Apurinic Sites in DNA but Is Displaced by Human Apurinic Endonuclease 1 // *J. Biol. Chem.* - 1999. - Vol. 274. - № 1. - P. 67–74.
- 183 . Parikh S.S. Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA // *EMBO J.* - 1998. - Vol. 17. - № 17. - P. 5214–5226.
- 184 . Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Sapparbaev M.K., Fedorova O.S. Pre-steady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glycosylases to AP endonuclease APE1 // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* - 2014. - Vol. 1840. - № 10. - P. 3042–3051.
- 185 . Hill J.W. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - Vol. 29. - № 2. - P. 430–438.
- 186 . Vidal A.E. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step // *Nucleic Acids Res.* - 2001. - Vol. 29. - № 6. - P. 1285–1292.
- 187 . Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I. Quantitative characterization of protein–protein complexes involved in base excision DNA repair // *Nucleic Acids Res.* - 2015. - Vol. 43. - № 12. - P. 6009–6022.
- 188 . Kladova O.A., Alekseeva I.V., Sapparbaev M., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Modulation of the Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Activity of Human APE1 and of Its Natural Polymorphic Variants by Base Excision Repair Proteins // *Int. J. Mol. Sci.* - 2020. - Vol. 21. - № 19. - P. 7147.
- 189 . Bakman A.S., Boichenko S.S., Kuznetsova A.A., Ishchenko A.A., Sapparbaev M., Kuznetsov N.A. Coordination between human DNA polymerase β and

- apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in the course of DNA repair // *Biochimie.* - 2024. - Vol. 216. - P. 126–136.
- 190 . Moor N., Vasil'eva I., Lavrik O. Functional Role of N-Terminal Extension of Human AP Endonuclease 1 In Coordination of Base Excision DNA Repair via Protein–Protein Interactions // *Int. J. Mol. Sci.* - 2020. - Vol. 21. - № 9. - P. 3122.
- 191 . Sukhanova M.V. Human base excision repair enzymes apurinic/aprimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - Vol. 33. - № 4. - P. 1222–1229.
- 192 . Liu Y., Prasad R., Beard W.A., Kedar P.S., Hou E.W., Shock D.D., Wilson S.H. Coordination of Steps in Single-nucleotide Base Excision Repair Mediated by Apurinic/Aprimidinic Endonuclease 1 and DNA Polymerase β // *J. Biol. Chem.* - 2007. - Vol. 282. - № 18. - P. 13532–13541.
- 193 . Tell G., Fantini D., Quadrifoglio F. Understanding different functions of mammalian AP endonuclease (APE1) as a promising tool for cancer treatment // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2010. - Vol. 67. - № 21. - P. 3589–3608.
- 194 . Kabziński J., Walczak A., Mik M., Majsterek I. Sirt3 regulates the level of mitochondrial DNA repair activity through deacetylation of NEIL1, NEIL2, OGG1, MUTYH, APE1 and LIG3 in colorectal cancer // *Pol. J. Surg.* - 2019. - Vol. 92. - № 1. - P. 1–5.
- 195 . Nassour H., Wang Z., Saad A., Papaluca A., Brosseau N., Affar E.B., Alaoui-Jamali M.A., Ramotar D. Peroxiredoxin 1 interacts with and blocks the redox factor APE1 from activating interleukin-8 expression // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6. - № 1. - P. 29389.
- 196 . Zhou J., Chan J., Lambelé M., Yusufzai T., Stumpff J., Opresko P.L., Thali M., Wallace S.S. NEIL3 Repairs Telomere Damage during S Phase to Secure Chromosome Segregation at Mitosis // *Cell Rep.* - 2017. - Vol. 20. - № 9. - P. 2044–2056.
- 197 . Shatilla A., Leduc A., Yang X., Ramotar D. Identification of two apurinic/aprimidinic endonucleases from *Caenorhabditis elegans* by cross-species complementation // *DNA Repair.* - 2005. - Vol. 4. - № 6. - P. 655–670.
- 198 . Papaluca A., Wagner J.R., Saragovi H.U., Ramotar D. UNG-1 and APN-1 are the major enzymes to efficiently repair 5-hydroxymethyluracil DNA lesions in *C. elegans* // *Sci. Rep.* - 2018. - Vol. 8. - № 1. - P. 6860.
- 199 . Ramotar D., Popoff S.C., Gralla E.B., Demple B. Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation // *Mol. Cell. Biol.* - 1991. - Vol. 11. - № 9. - P. 4537–4544.

- 200 . Johnson R.E., Torres-Ramos C.A., Izumi T., Mitra S., Prakash S., Prakash L. Identification of *APN2*, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the major human AP endonuclease *HAP1*, and its role in the repair of abasic sites // *Genes Dev.* - 1998. - Vol. 12. - № 19. - P. 3137–3143.
- 201 . Sander M., Lowenhaupt K., Rich A. *Drosophila* Rrp1 protein: an apurinic endonuclease with homologous recombination activities. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1991. - Vol. 88. - № 15. - P. 6780–6784.
- 202 . Burkovics P., Szukacsov V., Unk I., Haracska L. Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - Vol. 34. - № 9. - P. 2508–2515.
- 203 . Ide Y., Tsuchimoto D., Tominaga Y., Nakashima M., Watanabe T., Sakumi K., Ohno M., Nakabeppu Y. Growth retardation and dyslymphopoiesis accompanied by G2/M arrest in APEX2-null mice // *Blood.* - 2004. - Vol. 104. - № 13. - P. 4097–4103.
- 204 . Masani S., Han L., Yu K. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Is the Essential Nuclease during Immunoglobulin Class Switch Recombination // *Mol. Cell. Biol.* - 2013. - Vol. 33. - № 7. - P. 1468–1473.
- 205 . Carey D.C., Strauss P.R. Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Is Processive // *Biochemistry.* - 1999. - Vol. 38. - № 50. - P. 16553–16560.
- 206 . He H., Chen Q., Georgiadis M.M. High-resolution crystal structures reveal plasticity in the metal binding site of apurinic/apyrimidinic endonuclease i // *Biochemistry.* - 2014. - Vol. 53. - № 41. - P. 6520–6529.
- 207 . Manvilla B.A., Pozharski E., Toth E.A., Drohat A.C. Structure of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 with the essential Mg²⁺ cofactor // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* - 2013. - Vol. 69. - № 12. - P. 2555–2562.
- 208 . Mundle S.T., Fattal M.H., Melo L.F., Coriolan J.D., O'Regan N.E., Strauss P.R. Novel role of tyrosine in catalysis by human AP endonuclease 1 // *DNA Repair.* - 2004. - Vol. 3. - № 11. - P. 1447–1455.
- 209 . Maher R.L., Bloom L.B. Pre-steady-state Kinetic Characterization of the AP Endonuclease Activity of Human AP Endonuclease 1 // *J. Biol. Chem.* - 2007. - Vol. 282. - № 42. - P. 30577–30585.
- 210 . Rothwell D.G. Substitution of Asp-210 in HAP1 (APE/Ref-1) eliminates endonuclease activity but stabilises substrate binding // *Nucleic Acids Res.* - 2000. - Vol. 28. - № 11. - P. 2207–2213.

- 211 . Barzilay G., Mol C.D., Robson C.N., Walker L.J., Cunningham R.P., Tainer J.A., Hickson I.D. Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1 // *Nat. Struct. Biol.* - 1995. - Vol. 2. - № 7. - P. 561–568.
- 212 . Timofeyeva N.A., Koval V.V., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Lys98 Substitution in Human AP Endonuclease 1 Affects the Kinetic Mechanism of Enzyme Action in Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways // *PLoS ONE* / ed. Uversky V.N. - 2011. - Vol. 6. - № 9. - P. e24063.
- 213 . Mol C.D., Kuo C.-F., Thayer M.M., Cunningham R.P., Tainer J.A. Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III // *Nature.* - 1995. - Vol. 374. - № 6520. - P. 381–386.
- 214 . Gupta M., Fujimori A., Pommier Y. Eukaryotic DNA topoisomerases I // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* - 1995. - Vol. 1262. - № 1. - P. 1–14.
- 215 . Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Lomzov A.A., Fedorova O.S. The role of Asn-212 in the catalytic mechanism of human endonuclease APE1: Stopped-flow kinetic study of incision activity on a natural AP site and a tetrahydrofuran analogue // *DNA Repair.* - Elsevier B.V., 2014. - Vol. 21. - P. 43–54.
- 216 . Lipton A.S., Heck R.W., Primak S., McNeill D.R., Wilson D.M., Ellis P.D. Characterization of Mg²⁺ Binding to the DNA Repair Protein Apurinic/Apyrimidic Endonuclease 1 via Solid-State ²⁵Mg NMR Spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - Vol. 130. - № 29. - P. 9332–9341.
- 217 . Lowry D.F., Hoyt D.W., Khazi F.A., Bagu J., Lindsey A.G., Wilson D.M. Investigation of the Role of the Histidine–Aspartate Pair in the Human Exonuclease III-like Abasic Endonuclease, Ape1 // *J. Mol. Biol.* - 2003. - Vol. 329. - № 2. - P. 311–322.
- 218 . Kaneda K., Sekiguchi J., Shida T. Role of the tryptophan residue in the vicinity of the catalytic center of exonuclease III family AP endonucleases: AP site recognition mechanism // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - Vol. 34. - № 5. - P. 1552–1563.
- 219 . Whitaker A.M., Flynn T.S., Freudenthal B.D. Molecular snapshots of APE1 proofreading mismatches and removing DNA damage // *Nat. Commun.* - Springer US, 2018. - Vol. 9. - № 1.
- 220 . Alekseeva I.V., Kuznetsova A.A., Bakman A.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The role of active-site amino acid residues in the cleavage of DNA and RNA substrates by human apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* - 2020. - Vol. 1864. - № 12. - P. 129718.

- 221 . Georgiadis M.M., Luo M., Gaur R.K., Delaplane S., Li X., Kelley M.R. Evolution of the redox function in mammalian apurinic/aprimidinic endonuclease // *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* - 2008. - Vol. 643. - № 1–2. - P. 54–63.
- 222 . Davletgildeeva A.T., Ishchenko A.A., Saparbaev M., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The Enigma of Substrate Recognition and Catalytic Efficiency of APE1-Like Enzymes // *Front. Cell Dev. Biol.* - 2021. - Vol. 9. - P. 617161.
- 223 . Wang Y., Shupenko C.C., Melo L.F., Strauss P.R. DNA Repair Protein Involved in Heart and Blood Development // *Mol. Cell. Biol.* - 2006. - Vol. 26. - № 23. - P. 9083–9093.
- 224 . Matsumoto Y., Kim K., Bogenhagen D.F. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. // *Mol. Cell. Biol.* - 1994. - Vol. 14. - № 9. - P. 6187–6197.
- 225 . Session A.M. ... Rokhsar D.S. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis* // *Nature.* - 2016. - Vol. 538. - № 7625. - P. 336–343.
- 226 . Takeuchi R., Ruike T., Nakamura R., Shimanouchi K., Kanai Y., Abe Y., Ihara A., Sakaguchi K. *Drosophila* DNA polymerase zeta interacts with recombination repair protein 1, the *Drosophila* homologue of human abasic endonuclease 1 // *J. Biol. Chem.* - 2006. - Vol. 281. - № 17. - P. 11577–11585.
- 227 . Reardon B.J., Lombarde C.R., Sander M. *Drosophila* Rrp1 domain structure as defined by limited proteolysis and biophysical analyses // *J. Biol. Chem.* - 1998. - Vol. 273. - № 51. - P. 33991–33999.
- 228 . Ochkasova A.S., Kabilov M.R., Karpova G.G., Graifer D.M. Exploring the Interaction of Human Ribosomal Protein uS3 with Single-Stranded DNAs Having Different Sequences // *Russ. J. Bioorganic Chem.* - 2019. - Vol. 45. - № 6. - P. 619–624.
- 229 . Kuznetsova A.A., Gavrilova A.A., Novopashina D.S., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Mutational and Kinetic Analysis of APE1 Endoribonuclease Activity // *Mol. Biol.* - 2021. - Vol. 55. - № 2. - P. 211–224.
- 230 . Li M., Völker J., Breslauer K.J., Wilson D.M. APE1 incision activity at abasic sites in tandem repeat sequences // *J. Mol. Biol.* - Elsevier B.V., 2014. - Vol. 426. - № 11. - P. 2183–2198.
- 231 . Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Cassarino T.G., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information // *Nucleic Acids Res.* - 2014. - Vol. 42. - № W1. - P. W252–W258.

- 232 . Aduri R., Psciuk B.T., Saro P., Taniga H., Schlegel H.B., SantaLucia J. AMBER force field parameters for the naturally occurring modified nucleosides in RNA // *J. Chem. Theory Comput.* - 2007. - Vol. 3. - № 4. - P. 1464–1475.
- 233 . Ivani I. ... Orozco M. Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations // *Nat. Methods.* - 2016. - Vol. 13. - № 1. - P. 55–58.
- 234 . Alekseeva I.V., Bakman A.S., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Role of Ionizing Amino Acid Residues in the Process of DNA Binding by Human AP Endonuclease 1 and in Its Catalysis // *J. Phys. Chem. B.* - 2019. - Vol. 123. - № 45. - P. 9546–9556.
- 235 . Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* - 1983. - Vol. 79. - № 2. - P. 926–935.
- 236 . The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book. 4th ed. / ed. Gold V. - Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2019.
- 237 . Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* - 1976. - Vol. 72. - № 1–2. - P. 248–254.
- 238 . Kuzmič P. Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase // *Anal. Biochem.* - 1996. - Vol. 237. - № 2. - P. 260–273.
- 239 . Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Fedorova O.S. Conformational dynamics of the interaction of Escherichia coli endonuclease VIII with DNA substrates // *DNA Repair.* - 2012. - Vol. 11. - № 11. - P. 884–891.
- 240 . Kuznetsov N.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. Thermodynamics of the DNA Damage Repair Steps of Human 8-Oxoguanine DNA Glycosylase // *PLoS ONE* / ed. Leng F. - 2014. - Vol. 9. - № 6. - P. e98495.
- 241 . Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. Thermodynamics of the multi-stage DNA lesion recognition and repair by formamidopyrimidine-DNA glycosylase using pyrrolocytosine fluorescence—stopped-flow pre-steady-state kinetics // *Nucleic Acids Res.* - 2012. - Vol. 40. - № 15. - P. 7384–7392.
- 242 . Chattopadhyay R. Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* - 2006. - Vol. 34. - № 7. - P. 2067–2076.
- 243 . Izumi T. Deletion analysis of human AP-endonuclease: minimum sequence required for the endonuclease activity // *Carcinogenesis.* - 1998. - Vol. 19. - № 3. - P. 525–527.

- 244 . Yudkina A.V., Bulgakov N.A., Kim D.V., Baranova S.V., Ishchenko A.A., Sapparbaev M.K., Koval V.V., Zharkov D.O. Abasic site–peptide cross-links are blocking lesions repaired by AP endonucleases // *Nucleic Acids Res.* - 2023. - Vol. 51. - № 12. - P. 6321–6336.
- 245 . Izumi T., Schein C.H., Oezguen N., Feng Y., Braun W. Effects of Backbone Contacts 3' to the Abasic Site on the Cleavage and the Product Binding by Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (APE1) // *Biochemistry.* - 2004. - Vol. 43. - № 3. - P. 684–689.
- 246 . Kladova O.A., Iakovlev D.A., Groisman R., Ishchenko A.A., Sapparbaev M.K., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. An Assay for the Activity of Base Excision Repair Enzymes in Cellular Extracts Using Fluorescent DNA Probes // *Biochem. Mosc.* - 2020. - Vol. 85. - № 4. - P. 480–489.
- 247 . Kanazhevskaya L.Yu., Koval V.V., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S. Conformational Dynamics of Abasic DNA upon Interactions with AP Endonuclease 1 Revealed by Stopped-Flow Fluorescence Analysis // *Biochemistry.* - 2012. - Vol. 51. - № 6. - P. 1306–1321.
- 248 . Kanazhevskaya L.Y., Koval V.V., Zharkov D.O., Strauss P.R., Fedorova O.S. Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair // *Biochemistry.* - 2010. - Vol. 49. - № 30. - P. 6451–6461.
- 249 . Timofeyeva N.A., Koval V.V., Ishchenko A.A., Sapparbaev M.K., Fedorova O.S. Kinetic mechanism of human apurinic/aprimidinic endonuclease action in nucleotide incision repair // *Biochem. Mosc.* - 2011. - Vol. 76. - № 2. - P. 273–281.
- 250 . Timofeyeva N.A., Fedorova O.S. A kinetic mechanism of repair of DNA containing α -anomeric deoxyadenosine by human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 // *Mol. Biosyst.* - 2016. - Vol. 12. - № 11. - P. 3435–3446.