ЕНДУТКИН АНТОН ВАЛЕНТИНОВИЧ

РОЛЬ СТРУКТУРЫ ДНК-СУБСТРАТОВ И СТРУКТУРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БЕЛКА В ПРОЦЕССАХ УЗНАВАНИЯ И УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ 8-ОКСОГУАНИН-ДНК-*N*-ГЛИКОЗИЛАЗАМИ ЧЕЛОВЕКА И *E. COLI*

03.01.04 — биохимия

Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата химических наук Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины отделения Российской академии Сибирского наук Федеральном образовательном государственном автономном vчреждении образования «Новосибирском национальном исследовательском государственном университете»

Научный руководитель:

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

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

Официальные оппоненты:

Зверева Мария Эмильевна, д.х.н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Химический факультет, заместитель декана по научной работе

Гончар Данила Александрович, к.б.н.

Общество с ограниченной ответственностью «СибЭнзайм», заместитель директора по производству

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Защита состоится «21» декабря 2018 г. в 10^{00}

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

диссертацией ознакомиться библиотеке Федерального онжом В государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины CO PAH и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «20» ноября 2018 г.

John S Учёный секретарь диссертационного совета,

к.х.н., доцент

Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

проблемы. Одно из самых распространенных Актуальность окисленных оснований ДНК — 8-оксогуанин (8-охоGua). Репарация этого повреждения идет по пути эксцизионной репарации оснований (ЭРО) с участием 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаз OGG1 у эукариот или Fpg у бактерий. Несмотря на обилие данных о пространственных структурах ферментов репарации в свободном виде и в комплексе с ДНК-субстратами, анализ таких статичных структур не позволяет судить о динамике фермента в ходе реакции. С другой стороны, хотя множество кинетических исследований в целом дало ответ на вопрос о количестве стадий реакции и их временных рамках, до сих пор возникают вопросы, какие именно структурные изменения происходят на каждой кинетически различимой стадии. Мало данных о том, физико-химические параметры ЛНК И нуклеотидный поврежденного нуклеотида ΜΟΓΥΤ влиять на его узнавание ДНКгликозилазами. Поэтому только комплексный анализ термодинамических и ферментативной параметров реакции, кинетических структурными данными и данными, полученными с использованием сайтнаправленного мутагенеза, позволит более детально рассмотреть механизм действия ДНК-гликозилаз.

Целью настоящей работы стало изучение влияния структуры ДНК-субстратов, ДНК-белковых и внутримолекулярных взаимодействий в молекуле белка на эффективность узнавания и расщепления поврежденной ДНК 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазами человека и *E. coli*. В связи с этим представлялось необходимыми решить следующие задачи:

- 1) определить параметры стационарной кинетики ферментов OGG1 и Fpg в реакции расщепления ДНК-субстратов, отличающихся конформационными параметрами и нуклеотидным контекстом;
- 2) исследовать влияние нуклеотидного окружения на стэкингвзаимодействие 8-охоGua в цепочке ДНК;
- 3) установить вклад отдельных структурных доменов белка Fpg в специфическое фермент-субстратное взаимодействие;
- 4) выявить функционально важные внутримолекулярные взаимодействия в белке Fpg, удаленные от активного центра фермента;
- 5) изучить ответственные за узнавание 8-охоGua ДНК-белковые взаимодействия, предсказанные в ходе компьютерного моделирования процесса выворачивания нуклеотидов из ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазами;
- 6) охарактеризовать влияние целостности сахарофосфатного остова на активность фермента Fpg.

Научная новизна работы. В рамках настоящей работы всесторонне исследован процесс удаления поврежденных оснований 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазами бактерий и человека, и определены факторы, влияющие на

узнавание поврежденной ДНК. Впервые получен набор значений энергий коаксиального стэкинга 8-охоGua для всех возможных контекстов с основанием Суt напротив повреждения. Также впервые систематически исследовано влияние целостности сахарофосфатного остова на активность Fpg. Методом коэволюционного анализа аминокислотных остатков выявлены внутрибелковые взаимодействия, важные для каталитической активности Fpg, но при этом удаленных от активного центра фермента. Показано существование селективных для поврежденного основания конформационных интермедиатов при выворачивании 8-охоGua белками OGG1 и Fpg. Исследовано влияние ряда ранее не изученных аминокислотных замен на активность белка Fpg.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные позволяют рассматривать некоторые ДНК-гликозилазы в качестве скаффолдов для дальнейшего рационального дизайна ферментов, имеющих биоаналитическое или генноинженерное приложение. Полученный в данной работе набор значений энергий стэкинга для 8-охоGua представляет собой основу для дальнейших исследований ферментативных систем процессинга ДНК, позволяющий связать скорость определенных стадий узнавания субстрата с контекстом ДНК. Работа вносит вклад в подтверждение и уточнение механизма многостадийной верификации субстратов, который может быть общим для ДНК-гликозилаз других структурных семейств.

Методология и методы исследования. В работе широко использовались стандартные методы генной инженерии, продукции и выделения рекомбинантных белков, характеристики их биохимических свойств, методы ферментативной кинетики, метод кругового дихроизма, метод термической денатурации с оптическим поглощением. Также применялись компьютерные методы исследования биополимеров.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) На кинетические параметры реакции, катализируемой ферментами Fpg и OGG1, оказывают влияние локальные конформационные параметры ДНК-субстрата и состав нуклеотидного окружения 8-охоGua.
- 2) 8-охоGua в составе ДНК независимо от контекста оказывает дестабилизирующее действие на стэкинг по сравнению с каноническим основанием Gua.
- 3) Отдельный структурный С-концевой домен белка Fpg обладает остаточной AP-лиазной активностью.
- 4) В структуре молекулы Fpg присутствуют удаленные от активного центра кластеры аминокислот, важные для способности фермента связывать и расщеплять ДНК-субстрат.
- 5) В узнавание 8-охоGua как ферментом Fpg, так и ферментом OGG1 большой вклад вносят промежуточные взаимодействия, образуемые

поврежденным нуклеотидом при его выворачивании в активный центр этих ЛНК-гликозилаз.

6) Для эффективного расщепления ДНК, содержащей 8-охоGua, ферментом Fpg необходима ковалентная непрерывность цепей ДНК-дуплекса вблизи от места повреждения.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения работы представлены на 13 международных конференциях, из них 5: «Albany 2011: The 17th Conversation» (Олбани, США, 2011), «22nd IUBMB & 37th FEBS Congress» (Севилья, Испания, 2012), «Albany 2013: The 18th Conversation» (Олбани, США, 2013), «Albany 2015: The 19th Conversation» (Олбани, США, 2015), «42nd FEBS Congress» (Иерусалим, Израиль, 2017), материалы которых индексируются в Web of Science и Scopus.

По материалам диссертации опубликовано 5 научных статей, из них 4 в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, и 1 в российском рецензируемом журнале.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 140 страницах, содержит 55 рисунков и 16 таблиц. Библиография включает 371 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В данной работе в ходе сравнительного анализа активностей ферментов Fpg и OGG1 установлено, что кинетические параметры катализируемой ими реакции удаления 8-охоGua находятся в зависимости от локальных конформационных параметров ДНК-субстрата и состава нуклеотидного окружения повреждения. При этом показано, что независимо от контекста 8охоGua вносит дестабилизацию в ДНК-дуплекс. При анализе вклада отдельных структурных доменов Fpg в специфическое фермент-субстратное взаимодействие у С-концевого домена была обнаружена остаточная АРлиазная активность. Кроме того, в структуре полноразмерного обнаружены мостиковые взаимодействия важные для связывания расщепления ДНК-субстрата, несмотря на их удаленность от активного центра обеих ДНК-гликозилаз фермента. Для Fpg OGG1 обнаружены промежуточные взаимодействия в ходе выворачивания 8-охоGua в их активный центр, важные для узнавания повреждения. На примере белка Грд показано, что для эффективного удаления 8-охоGua необходима ковалентная непрерывность цепей ДНК-дуплекса вблизи от места повреждения.

1. Влияние структуры ДНК на субстратную специфичность фермента OGG1 и Fpg

Конформационная комплементарность между молекулами ДНК и фермента и жесткость молекулы ДНК входят в число главных факторов, определяющих эффективность узнавания субстрата ДНК-зависимыми

ферментами. Для проверки влияния этих факторов на кинетические параметры реакции, катализируемой ДНК-гликозилазами были сконструированы двухцепочечные 23-звенные ОДН-субстраты, которые содержали поврежденное основание 8-охоGua (таблица 1).

Согласно полученным данным Таблица 1, значения $K_{\rm M}$ для реакций расщепления полностью комплементарных дцОДН белком OGG1 были в большинстве случаев в несколько раз меньше, чем для реакций с участием не полностью комплементарных дуплексов, в то время как значения $k_{\rm cat}$ варьировали гораздо меньше. Последнее свидетельствует о том, что гибкость и конформация ОДН-субстратов в свободном состоянии слабо влияют на эффективность реакции после образования фермент-субстратного комплекса. С другой стороны, высокие значения $K_{\rm M}$ говорят о затрудненном образовании фермент-субстратного комплекса, которое может быть вызвано особенностями структуры дуплексов, содержащих неканонические пары.

Неканоническая пара, находящаяся только с одной стороны поврежденного звена, практически не оказывала влияния на величину $K_{\rm M}$ (субстрат XII). Напротив, две фланкирующие пары, полностью неспособные образовывать комплементарные связи (субстрат II), повышали значение $K_{
m M}$ от 5 до 35 раз по сравнению с расщеплением полностью комплементарных субстратов. Аналогичный результат наблюдался и для дуплексов, содержащих по три фланкирующие неканонические пары с каждой стороны (субстраты III и VI). Последовательности субстратов I и IV отличаются только парами, соседними с 8-охоGua (Суt:Gua для субстрата I, Thy:Ade для субстрата IV). При этом значение $K_{\rm M}$ для реакции расщепления субстрата I в 2,6 раза ниже, чем для расщепления субстрата IV, что наталкивает на мысль о влиянии на эту величину нуклеотидного контекста, в котором более гибкое окружение 8-охоGua способствует связыванию фермента OGG1 с ДНК. Кроме того, значение $k_{\rm cat}$ для субстрата I несколько выше, что согласуется с механизмом действия фермента, который после связывания ДНК изгибает ее выворачивает поврежденный dN; эти процессы должны облегчаться для более гибкой ДНК. Субстраты VII и VIII практически симметричны относительно пары 8-охоGua:Суt и имеют разные плечи, одно из которых, dAdo₉₋₁₁:Thd₉₋₁₁, более жесткое и более изогнутое, а другое, состоящее из звеньев dGuo и dCyd, более гибкое и, скорее всего, линейного строения. Значение $K_{
m M}$ для реакции расщепления субстрата VIII повышено в 2,5 раза по сравнению с субстратом VII, однако одновременно в 2,4 раза повышено и значение k_{cat} . Данные различия в кинетических параметрах могут быть связаны с тем, что белок OGG1 взаимодействует с ДНК по большей части с 3'-стороны от поврежденного звена, поэтому разница в строении этой области ОДН может оказывать влияние как на связывание OGG1 с субстратом, что объясняет изменение значения $K_{\rm M}$, так и на конформацию и динамику ферментсубстратного комплекса, что объясняет изменение значения k_{cat} .

Таблица 1. Кинетические параметры реакции удаления 8-охоGua ферментами OGG1 и Fpg (обведены жирной рамкой) и ΔG° образования дуплексов

18(**	ведены жирнои рамкои) и д G ° ооразов Субстрат ¹	<i>К</i> _м , нМ ²	$k_{\rm cat}$, мин. $^{-1}$	$k_{\rm sp}$, нМ ⁻¹ ×мин. ⁻¹	ΔG°37	
	СубСтрат	A _M , HIVI	K _{cat} , MIH.	х _{sp} , нічі ∧мин.	(ккал/моль)	
I	5'-TTTTTTTTCXCTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAAA-5'	11±3	1,3±0,1	$(1,2\pm0,2)\times10^{-1}$	14,6±1,4	
		13±3	(1,2±0,1) ×10 ⁻¹			
II	5'-TTTTTTTTTCXCTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-5'	390±200	1,3±0,4	$(3,3\pm2,0)\times10^{-3}$	7,6±0,7	
		270±160	$(1,6\pm0,3)\times10^{-1}$	$(6,0\pm3,7)\times10^{-4}$		
III	5'-TTTTTTTTCXCTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAACCCCCCCAAAAAAAAAA-5'	310±110	$0,48\pm0,07$	$(1,5\pm0,6)\times10^{-3}$	2,2±0,2	
		180±100	$(1,0\pm0,1)\times10^{-1}$	$(5,5\pm3,1)\times10^{-4}$		
IV	5'-TTTTTTTTTTXTTTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	29±6	$0,96\pm0,07$	$(3,3\pm0,7)\times10^{-2}$	11,6±1,1	
		270±60	$(4,1\pm0,3)\times10^{-2}$	$(1,5\pm0,4)\times10^{-4}$		
V	5'-TTTTTTTTT X TTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAAAAGCGAAAAAAAAAAA-5'	70±10	1,7±0,05	$(2,4\pm0,4)\times10^{-2}$	8,7±0,9	
V		_3	3	(4,8±0,2) ×10 ⁻⁵		
VI	5'-TTTTTTTTTTXTTTTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAACCCCCCCAAAAAAAAAA-5'	400±54	0,40±0,02	(1,0±0,1) ×10 ⁻³	2.710.4	
		3	3	(4,8±0,2) ×10 ⁻⁵	3,7±0,4	
VII	5'-AAAAAAAAACXCGCCCGCCCGCG-3' 3'-TTTTTTTTTGCGCGGGCGGGCGC-5'	26±5	1,2±0,1	(4,6±1,0) ×10 ⁻²	20.7.2.1	
		3	3	$(3,0\pm0,1)\times10^{-3}$	20,7±2,1	
VIII	5'-CCGCCCGCGCXCAAAAAAAAAAAAAAAAA3' 3'-GGCGGGCGCGCTTTTTTTTTT-5'	64±8	2,9±0,2	(4,5±0,6) ×10 ⁻²	21.1.2.1	
		— ³	3	(2,7±0,1)×10 ⁻³	21,1±2,1	
IX	5'-TTTTTTTGGGXGGGTTTTTTTT-3' 3'-AAAAAAACCCCCCCCAAAAAAAAAA-5'	66±12	1,0±0,1	(1,5±0,3) ×10 ⁻²	16,7±1,7	
		3	3	(5,7±0,2) ×10 ⁻³		
X	5'-GAGCGAGCGCXCGCGAGCGAGCG-3' 3'-CTCGCTCGCGCGCGCGCTCGCTCGC-5'	78±8	2,4±0,1	(3,1±0,3) ×10 ⁻²	19,9±2,0	
		230±40	(8,1±0,8) ×10 ⁻¹	(3,5±0,8) ×10 ⁻³		
XI	5'-CTCTCCCTTC X CTCCTTTCCTCT-3' 3'-GAGAGGGAAGCGAGGAAAGGAGA-5'	22±2	1,0±0,1	(4,5±0,6) ×10 ⁻²	19,6±2,0	
		30±9	$(1,0\pm0,1)\times10^{-1}$	$(3,3\pm1,0)\times10^{-3}$		
XII	5'-CTCTCCCTTC X CTCCTCTCTCT-3'	23 ± 4	1,4±0,1	$(6,1\pm1,1)\times10^{-2}$	18,4±1,8	
All	3'-GAGAGGGAAGCGAGAGAGAGAGA-5' 5'-CTCTCCCCTCXCTCTCTCTCT-3'	23 = 4	1,4±0,1			
XIII	3'-GAGAGGGGAGCGAGGAGAGAGA-5'	21 ± 5	1,1±0,1	$(5,2\pm1,3)\times10^{-2}$	20,7±2,1	
XIV	5'-CTCTCCCCTCXCTCCTTTCCTCT-3'	20 ± 4	0,9±0,1	$(4,5\pm1,0)\times10^{-2}$	21,2±2,1	
211 1	3'-GAGAGGGGAGCGAGGAAAGGAGA-5' 5'-CTCTCCTTTCXCTCCTTTCCTCT-3'	20 = 1	0,7=0,1			
XV	3'-GAGAGGAAAGCGAGGAAAGGAGA-5'	16 ± 4	1,1±0,1	(6,9±1,8) ×10 ⁻²	19,4±1,9	
XVI	5'-CTCTCCCTTC X ATCCTTTCCTCT-3' 3'-GAGAGGGAAGCTAGGAAAGGAGA-5'	41 ± 11	1,2±0,1	(2,9±0,8) ×10 ⁻²	17,9±1,8	
		52±16	$(1,0\pm0,1)\times10^{-1}$	$(1,9\pm0,6)\times10^{-3}$		
XVII	5'-CTCTCCCTTC X CTCCT T TCCTCT-3' 3'-GAGAGGGAAGCGAGAGAGAGA-5'	16 ± 7	0,8±0,1	(5,0±2,3) ×10 ⁻²	16,8±1,7	
AVII		3,8±1,3	$(7,0\pm0,4)\times10^{-2}$	(1,8±0,6) ×10 ⁻²		
XVIII	5'-CTCTCCCTTC X CTCCTTTCCTCT-3' 3'-GAGAGGGGAGCGAGGAGAGA-5'	59 ± 14	1,9±0,1	(3,2±0,8) ×10 ⁻²	14,6±1,5	
XIX	5'-CTCTCCCTTC X CTCCTTTCCTCT-3' 3'-GAGAGGGGAGCGAGGAAAGGAGA-5'	22 ± 6	1,4±0,1	(6,4±1,8) ×10 ⁻²	18,6±1,9	
XX	5'-CTCTCCCTTC X CTCCTTTCCTCT-3' 3'-GAGAGGAAAGCGAGAAAGGAGA-5'	8,0 ± 4	1,4±0,1	(1,8±0,9) ×10 ⁻¹	13,8±1,4	
XXI	5'-CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT-3' 3'-GAGAGGGAAGCTAGGAAAGGAGA-5'	46±11	0,94±0,08	(2,0±0,5) ×10 ⁻²	16,0±1,6	

 $^{^{1}}$ Везде X = 8-oxoGua.

²Приведено среднее и стандартная ошибка от 3 до 5 независимых экспериментов.

³Не удалось определить в качестве отдельного параметра из-за слабого расщепления.

Используя данные таблицы 1, был проведен анализ корреляций кинетических констант с расчетными локальными конформационными параметрами и термодинамическими параметрами плавления ДНК-субстратов. Была обнаружена положительная корреляция между величинами $k_{\rm cat}$ для OGG1 и суммарным углом twist в области [-6,+6] от 8-охоGua $(r^2=0,88,\ p<0,01)$. Поскольку ферменту для осуществления катализа необходимо изогнуть дцДНК и вывернуть поврежденное основание из спирали, то можно предположить, что в более закрученной цепи процесс выворачивания облегчен за счет существования механического напряжения, облегчающего расплетание дуплекса при взаимодействии с ферментом.

При анализе зависимости $K_{\rm M}$ от свободной энергии плавления дуплексов все субстраты разделились на две группы. Большая часть ДНК-субстратов характеризуется значениями $K_{\rm M}$ менее 100 нМ и достаточно высокой термической стабильностью, а субстраты с несколькими или двумя соседними с повреждением неканоническим парами ожидаемо попали в группу со значениями $K_{\rm M}$ выше 300 нМ и низким абсолютным значением свободной энергии. Можно предположить, чем больше величина ΔG° , вызванная более низкой температурой плавления дуплекса, тем большая часть дцДНК-субстрата существует в частично одноцепочечном состоянии, что ведет к повышению величины $K_{\rm M}$.

Для белка Fpg, как и в случае фермента OGG1, значения $K_{\rm M}$ для дуплексов, содержащих фланкирующие неканонические пары (субстраты II, III, V), были значительно выше, чем для полностью комплементарных дуплексов (Таблица 1 жирные рамки). Эта группа субстратов также характеризуется самыми низкими значениями $k_{\rm sp}$. Таким образом, можно предположить, что дестабилизация дуплекса, вызванная присутствием фланкирующих поврежденное основание пар, неспособных к образованию комплементарных связей, заметно препятствует образованию каталитически компетентного фермент—субстратного комплекса.

Наличие одной неканонической пары, не соседствующей непосредственно с поврежденным звеном (субстрат XVII), не приводило к значительной дестабилизации дуплекса и не препятствовало взаимодействию фермента с ДНК-субстратом. Эти закономерности были общими для ферментов Fpg и OGG1. Таким образом, влияние природы ДНК-субстрата на каталитическую эффективность ферментов во многом совпадает для Fpg и OGG1.

2. Анализ термодинамических параметров коаксиального стэкинга 8охоGua

Ближайшее нуклеотидное окружение поврежденного нуклеотида в дцДНК может описываться шестнадцатью различными вариантами, без учета модификаций оснований ДНК. Логично предположить, что суммарная энергия стэкинг-взаимодействий повреждения будет варьироваться в зависимости от

его окружения, что в случае ДНК-гликозилаз может отразиться как на эффективности выворачивания такого нуклеотида из спирали ДНК, так и на активность ферментов в целом. Достаточно небольшое число работ, посвященных исследованию влияния контекста ДНК на активность ДНК-гликозилаз, подтверждают это предположение. Поэтому в рамках более систематического исследования в сотрудничестве с ЛБМХ ИХБФМ СО РАН методом термической денатурации в растворе был определен полный набор термодинамических параметров стэкинг-взаимодействия 8-охоGua и Gua во

всех 16 возможных нуклеотидных окружениях (рисунок 1).

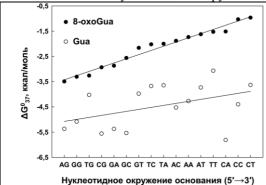


Рисунок 1. Суммарная энергия стэкинга 8-охоGua и Gua для соответствующих нуклеотидных контекстов. По оси абсцисс представлены пары нуклеотидов, находящихся соответственно с 5'- и 3'-стороны относительно целевого нуклеотида.

Образование 8-охоGua в составе ДНК независимо от контекста оказывало дестабилизирующее действие. Диапазон различий в параметре $\Delta G^{\circ}_{\Sigma}$ между Gua и 8-охоGua составлял от 0,7 до 4,3 ккал/моль и был сопоставим с суммарной энергией стэкинга для обоих оснований. Это хорошо согласуется с литературными данными, подтверждая, что пары Gua:Cyt и 8-охоGua:Cyt могут существенно различаться по физико-химическим параметрам, например по степени гидратации большой бороздки вблизи пары, оказывая влияние на стабильность ДНК и ее конформационную динамику.

Наибольшая энергия стэкинг-взаимодействия повреждения наблюдается в пуриновом окружении. В особенности 8-охоGua сильно стабилизирован соседними основаниями Gua, поскольку все контексты с наибольшими энергиями стэкинга содержат хотя бы одно основание Gua (рисунок 1). Пиримидиновые основания, находящиеся в контакте с повреждением, стабилизируют структуру ДНК значительно слабее. Хуже всего повреждение стабилизировано основанием Сут в 5'-области, в отличие от неповрежденного Gua, для которого взаимодействие хотя бы с одним Thy характеризуется низкой суммарной энергией стэкинга.

3. Анализ свойств отдельных доменов белка Fpg

Согласно литературным данным, разные функции белка Fpg локализованы в разных его доменах. N-концевой домен начинается длинной спиралью, на N-конце которой располагается каталитический дипептид Pro-

Glu, а в С-концевом домене расположены ДНК-связывающие мотивы «спираль — два поворота — спираль» (H2TH) и цинковый палец типа Cys₄. У ряда актинобактерий (*Mycobacterium tuberculosis* и др.), существуют белки с неизвестными функциями, гомологичные исключительно С-концевому домену Fpg. Поэтому представлялось необходимым изучить вклад отдельных N- и С-концевого доменов белка Fpg в специфическое фермент-субстратное взаимодействие.

Белки N-Fpg и C-Fpg, соответствующие N- и C-концевым доменам Fpg, получали экспрессией в *E. coli* кодирующих их участков гена *fpg*. Поскольку все известные ДНК-гликозилазы специфически связывают ДНК, содержащую AP-сайты, а все бифункциональные ДНК-гликозилазы расщепляют такую ДНК, была исследована способность рекомбинантных белков N-Fpg и C-Fpg связывать и расщеплять дцОДН, содержащие альдегидный AP-сайт и ряд поврежденных оснований. Как и ожидалось, отдельный N-концевой домен не проявлял ни каталитических, ни ДНК-связывающих активностей. Белок C-Fpg не был способен расщеплять дцОДН-субстраты, содержащие поврежденные основания (8-оксогуанин, урацил, 5,6-дигидроурацил, гипоксантин), что, скорее всего, связано с невозможностью индуцировать излом ДНК, необходимый для выворачивания поврежденного нуклеозида из двойной спирали ДНК. Однако при анализе активности фракций в ходе выделения С-Fpg выявлялась активность по отношению к субстрату с альдегидным AP-сайтом

Для количественной характеристики сродства C-Fpg к поврежденному ДНК-субстрату было получено значение константы диссоциации $K_{\rm d}$ (рисунок 2). Значение $K_{\rm d}$ для связывания C-Fpg с F-лигандом составило 380 нМ, что в ~25 раз меньше, чем сродство к нему полноразмерного фермента Fpg (15 нМ). Граница между доменами полноразмерного белка Fpg образует положительно заряженную бороздку, и такая пространственная организация белка способствует связыванию с ДНК. При наличии одного С-концевого домена такая структурная комплементарность не реализуется.

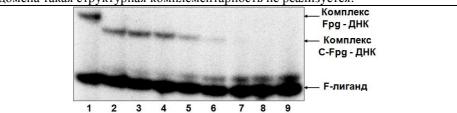


Рисунок 2. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения несвязанного F-лиганда (ОДН, содержащий тетрагидрофуран) и комплекса C-Fpg с F-лигандом. 1 – контроль с Fpg; концентрация C-Fpg: $2-2000~\mathrm{hM};\ 3-1000~\mathrm{hM};\ 4-400~\mathrm{hM};\ 5-200~\mathrm{hM};\ 6-100~\mathrm{hM};\ 7-40~\mathrm{hM};\ 9$ - контроль без фермента.

Из-за низкого сродства C-Fpg к AP-ДНК не представлялось возможным получить кинетические параметры ($K_{\rm M}$, $k_{\rm cat}$) в стационарных условиях, поскольку насыщение фермента субстратом требует очень высоких концентраций субстрата. Однако, используя метод кинетики одного оборота, удалось определить значение каталитической константы $k_{\rm cat}$ (рисунок 3).

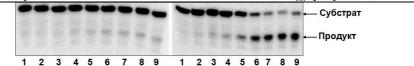


Рисунок 3. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления АР-субстрата (23нт) белком С-Fpg в условиях одного оборота (справа) и самопроизвольной деградации АР-ОДН в отсутствии фермента (слева). Время реакции: 1-1 мин.; 2-5 мин.; 3-15 мин.; 4-30 мин.; 5-60 мин.; 6-120 мин.; 7-150 мин.; 8-180 мин.; 9-240 мин.

Как и ожидалось, значение $k_{\rm cat}$ для C-Fpg $(8,4\times10^{-3}~{\rm Muh}^{-1})$ было на несколько порядков ниже соответствующего значения для полноразмерного фермента Fpg $(1,7~{\rm Muh}^{-1})$. Можно заключить, что C-Fpg характеризуется низким сродством к ДНК-субстрату и малое число оборотов. В отсутствие второго домена белок потерял способность не только узнавать поврежденные основания, что привело к потере гликозилазной активности, но и эффективно связываться с поврежденной ДНК.

исследования было обнаружено, ходе что C-Fpg образует с АР-субстратом, NaBH₄ ковалентный комплекс восстанавливаемый свидетельствуя АР-лиазном механизме протекающей реакции, элиминированием 3'-фосфата при поврежденном dN. Для подтверждения этого механизма была проанализирована подвижность продуктов расщепления АРсубстрата белком С-Грд (рисунок 4).

Белок Fpg ожидаемо эффективно расщеплял субстрат, содержащий AP-сайт (дорожка 3), по механизмам β-элиминирования (верхняя полоса продукта) и δ-элиминирования (нижняя полоса продукта). APEX1 эффективно расщеплял субстрат при добавлении MgCl₂ (дорожки 5, 6). Продукт расщепления ферментом APEX1 по подвижности занимает промежуточное место, между продуктами β- и δ-элиминирования. Продукт расщепления AP-сайта белком C-Fpg имел такую же подвижность (дорожка 4), что и продукт β-элиминирования. Таким образом, несмотря на отсутствие каталитических остатков, присущих полноразмерному ферменту Fpg, белок C-Fpg способен с некоторой эффективностью катализировать расщепление AP-ДНК, которое, как и в случае полноразмерного Fpg, протекает по механизму β-элиминирования с образованием основания Шиффа. Оптимальные условия реакции расщепления ферментом C-Fpg по AP-лиазный механизму были при pH 6,6 и концентрации NaCl от 0 до 50 мМ.

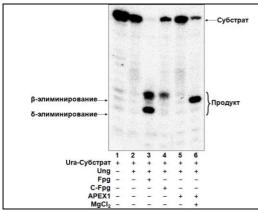


Рисунок 4. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления АР-субстрата (23 нт) ферментами Fpg, C-Fpg и АРЕХ1. 1 — дуплекс "Ura-субстрат (23 нт) без добавления Ung; 2 — дуплекс "Ura-субстрат с добавлением Ung. Остальные смеси содержали субстрат "Ura-субстрат после обработки Ung, и соответствующий фермент: 3 — Fpg; 4 — C-Fpg; 5 — АРЕХ1; 6 — АРЕХ1 и Mg²⁺.

4. Определение внутримолекулярных взаимодействий в белке Fpg, важных для его функционирования

В ферментативном катализе хорошо известны эффекты «дальнего действия», которые практически невозможно предсказать по структурным данным. Кроме того, хорошо известно, что пары остатков, участвующие в функционально важных взаимодействиях внутри белковой глобулы склонны к коэволюции, препятствуя тем самым разрушению этих взаимодействий. Поэтому представляло интерес исследовать функционально важные взаимодействия в Fpg, удаленные от активного центра фермента.

В сотрудничестве с Д. А. Афонниковым (ИЦиГ СО РАН) на основании анализа коэволюции аминокислотных остатков в ферменте Грд были предсказаны функционально важные внутримолекулярные взаимодействия между Gln234 и Arg244, Arg54 и Glu131, Tyr170 и Ser209 (нумерация Fpg E. coli). Эти пары образовывали не просто «мостиковое» взаимодействие, но были частями более протяженных структурных кластеров. Остатки мостика Arg54-Glu131 — часть структуры, также содержащей Arg53, Ala55, Leu128 и Gly129, которая соединяет N- и C-концевой домены путем множественных взаимодействий в обход междоменного линкера (рисунок 5 А). Остатки Туг170 взаимодействуют исключительно через водородные гидроксильных групп боковых радикалов (рисунок 5 Б). При этом Туг170 выступает также в качестве донора связи на карбоксил Glu5, одного из ключевых остатков активного центра Fpg. Пару Gln234-Arg244 можно отнести к кластеру цинкового пальца, в состав которого входит Arg244 (рисунок 5 В).

Принимая во внимание принадлежность рассматриваемых остатков к различным структурным мотивам, которые участвуют как в связывании ДНК, так и в катализе, представлялось необходимым проанализировать не только их структурную, но и функциональную значимость. С этой целью в белке Fpg *E. coli* с помощью сайт-направленного мутагенеза остатки в каждой из исследуемых позиций подвергалась замене. Дополнительно были получены

двойные замены Q234R/R244E и R54E/E131R для оценки возможности восстановления мостикового взаимодействия.

Для проверки влияния элиминирования эволюционно консервативных мостиков на стабильность структуры белка методом кругового дихроизма (КД) были исследованы кривые плавления для Fpg дикого типа и его мутантных форм. Температура плавления ($T_{\rm пл.}$) фермента дикого типа составляла 51,2 °C. Нарушение мостика R54–E131 имело слабый эффект на термическую стабильность ($T_{\rm пл.}$ около 54 °C). Обратная картина наблюдалась для пары Gln234–Arg244, мутации в которой очень сильно влияли на стабильность, снижая $T_{\rm пл.}$ до 39 °C. Двойная мутация Q234R/R244E частично восстанавливала стабильность ($T_{\rm пл.}$ = 46,5 °C). Мутации, затрагивающие мостик Y170–S208, имели противоположные последствия: S208A замена умеренно стабилизировала белок ($T_{\rm пл.}$ = 58,2°C), в то время как замена Y170F дестабилизировала его ($T_{\rm пл.}$ = 44,9°C).

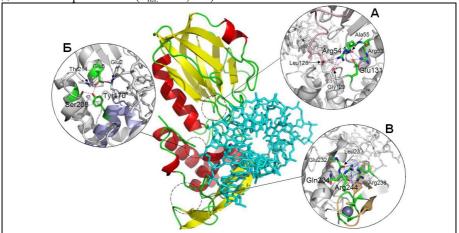


Рисунок 5. Структура Fpg *E. coli*, ковалентно связанного с ДНК (1К82). Область взаимодействия Arg54 и Glu131 (A); Область взаимодействия Tyr170 и Ser209 (Б); Область взаимодействия Gln234 и Arg244 (В).

Каталитическая активность форм белка Fpg была исследована при 30 °C для минимизации эффекта денатурации некоторых мутантов. Любые мутации в паре R54—E131 делали фермент неактивным (таблица 2). Мутации в мостике Gln234—Arg244, напротив, слабо влияли на активность, снижая $k_{\rm sp}$ максимум в 2,1 раза, главным образом из-за влияния на $k_{\rm cat}$. Замена S208A практически не имела эффекта, в то время как Y170F снижала активность в 1750 раз.

Мутации одинаково влияли на способность использовать как AP-, так и 8-охоGua-субстраты (рисунок 6 A; рисунок 7 A). Мутантные формы Q234R, R244E, Q234R R244E и S208A расщепляли AP-субстраты, в то время как для форм R54E, E131R, R54E E131R, и Y170F не наблюдалось расщепления больше, чем при неспецифическом гидролизе AP-сайта.

Таблица 2. Кинетические параметры расщепления 8-охоGua-субстратов, параметры связывания F-лиганда и содержание шинка для дикого типа и мутантных форм белка Fpg *E. coli*.

Замена в Грд Км, нМ		$k_{\rm cat}$, мин $^{-1}$	$k_{\rm sp}$, н ${\rm M}^{\text{-}1}$ ×мин $^{\text{-}1}$	$K_{\rm d}$, нМ	моль Zn/моль Fpg
Дикий тип	8,1±2,3	1,7±0,1	0,21±0,03	15±3	1,1±0,1
Q234R	6,0±2,9	$0,92\pm0,10$	0,15±0,05	15±4	0,83±0,19
R244E	3,9±1,7	$0,39\pm0,03$	$0,10\pm0,03$	460±140	0,59±0,12
Q234R/R244E	8,8±2,8	$0,89\pm0,08$	$0,10\pm0,03$	140±30	0,75±0,13
R54E	_1	—¹	_1	—¹	0,57±0,19
E131R	_1	—¹	_1	—¹	$0,30\pm0,03$
R54E/E131R	_1	—¹	_1	—¹	0.82 ± 0.22
Y170F	2	2	$(1,2\pm0,1)\times10^{-4}$	510±200	1,1±0,1
S208A	4,7±2,0	$0,80\pm0,10$	$0,17\pm0,08$	32±11	0.86 ± 0.45

¹Не обнаружено активности.

В соответствии с предыдущими экспериментами по анализу активности мутантных форм фермент дикого типа, все мутанты для пары Q234R–R244E и S208A эффективно образовывали ковалентно сшитые коньюгаты с 8-охоGua-и AP-субстратами, а мутанты по мостику R54–E131 не проявляли такой способности. Примечательно, что для мутанта Y170F наблюдались следовые количества образования комплекса (рисунок 6 Б; рисунок 7 Б).

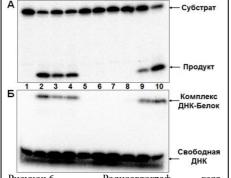
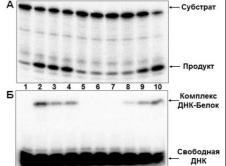


Рисунок 6. Радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления 8-охоGuaсубстрата мутантными формами белка Грд (А) и продуктов сшивки мутантных форм Fpg и 8-охоGua-субстрата под действием NaBH₄ (Б). Нумерация дорожек для А и Б общая. Каждая реакционная смесь содержала субстрат (только субстрат в случае 1) и соответствующую форму белка: 2 — Q234R, 3 — R244E, 4 — Q234R/R244E, 5 — R54E, 6 — E131R, 7 — R54E/E131R, 8 — Y170F, 9 — S208A, 10 — Дикий тип.



Радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления субстрата мутантными формами белка Грд (А) и продуктов сшивки мутантных форм Fpg и АР-субстрата под действием NaBH₄ (Б). Нумерация дорожек для А и Б общая. Каждая реакционная смесь содержала субстрат (только субстрат В случае 1) соответствующую форму белка: 2 — Q234R, 3 — R244E, 4 — Q234R/R244E, 5 — R54E, 6 — E131R, 7 — R54E/E131R, 8 — Y170F, 9 — S208A. 10 — Дикий тип.

Анализируя сродство форм Fpg к F содержащему субстрату, было установлено, что мутации, затрагивающие мостик R54–E131, делали фермент

²Не удалось определить в качестве отдельного параметра из-за слабого расщепления.

неспособным связывать ДНК, что, вероятно, лежит в основе отсутствия активности данных форм (таблица 2). Остальные мутанты проявляли сродство от одинакового с белком дикого типа до сниженного в 35 раз.

Поскольку некоторые мутации затрагивают позиции, близкие к цинковому пальцу или находящиеся непосредственно в нем, было исследовано молярное соотношение цинка к белку в полученные препаратах. Fpg дикого типа содержал ожидаемое эквимолярное количество Zn. Содержание металла в мутантных формах варьировалось в диапазоне от 0,3 до 1,1 атома Zn на молекулу белка. При этом наименьшее содержание Zn наблюдалось в мутантах пары R54–E131. Мутации мостика Q234–R244, несмотря на близость к цинковому пальцу, слабо влияли на содержание Zn. Наблюдаемые различия в уровне содержания Zn между вариантами Fpg, достигали максимум ~3 раза и не объясняли таких больших различий в сродстве к ДНК или активности между формами фермента.

Для объяснения некоторых наблюдаемых эффектов была исследована молекулярная динамика Fpg-ДНК, комплексов имеюших соответствующие модификации. Неожиданно выяснилось, $O\gamma[Ser208]...O\eta[Tyr170]$, имеющая длину $2,60\pm0,03~{\rm \AA}$ и практически идеальную геометрию согласно РСА (Рисунок 5 Б), существовала лишь в 2 % траектории Грд дикого типа и не более 20 % в других моделях. Вместо этого боковой радикал Ser208 быстро переориентировался для образования стабильной водородной связи с кислородом основной цепи Val204. Неподеленная пара электронов Оп[Туг170] при этом участвовала в образовании водородной связи с Oy1[Thr214], в то время как водородное взаимодействие с Glu5 сохранялось. В структурах мутантов по другим мостикам также наблюдалось образование альтернативных водородных связей. В траекториях не наблюдалось никаких явных признаков пониженной стабильности ни локально, ни в целом.

Таким образом, впервые были выявлены функционально важные взаимодействия, удаленные от активного центра фермента, на основании коэволюционного анализа.

5. Роль выворачивания поврежденного нуклеотида в узнавании 8оксогуанина ферментами Fpg и OGG1

На сегодняшний день остается неясным, каким образом OGG1 человека и его бактериальный аналог Fpg способны быстро и специфично различать достаточно редкое повреждение в ДНК. Было сделано предположение, что выворачивание нуклеотида может быть ключевым моментом в узнавании 8-охоGua, причем по крайней мере один или несколько актов узнавания происходит на ранних стадиях выворачивания, поскольку чрезвычайно быстрое скольжение гликозилаз по ДНК практически полностью исключает возможность полного извлечения инспектируемого основания из цепочки и перемещение в активный центр фермента. В сотрудничестве с группой

профессора К. Симмерлингом (Университет штата Нью-Йорк, США) были энергетически и структурно охарактеризованы процессы выворачивая нуклеотидов, содержащих 8-охобиа и Gua, для OGG1 человека и Fpg Geobacillus stearothermophilus с использованием направленной молекулярной динамики. Анализ профилей свободной энергии, рассчитанных для выворачивания нуклеотидов с 8-охобиа и Gua обоими ферментами, выявил значительную разницу в энергии конечных состояний (рисунок 8). Так, более энергетически выгодным для Gua оказалось внутриспиральное расположение, в то время как для 8-охобиа — внеспиральное вывернутое расположение. Профили свободной энергии для обоих ферментов содержат главным образом четыре явных области, соответствующих, вероятно, стадиям энергетической и структурной верификации повреждения (рисунок 8).

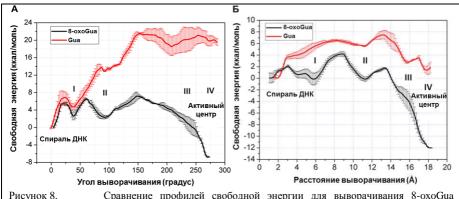


Рисунок 8. Сравнение профилей свободной энергии для выворачивания 8-охоGua (черный график) и Gua (красный график) белком Fpg (A) или OGG1 (Б). Римскими цифрами I– IV обозначены четыре потенциальных стадии узнавании повреждения.

На стадии I, где впервые неповрежденный Gua может быть распознан, как непригодный для катализа, происходит разрыв комплементарного и стэкинг взаимодействий 8-охоGua или Gua и их частичное выворачивание из стопки оснований. В отсутствие N7 атома водорода Gua не стабилизирован в структуре OGG1, а его ориентация в Fpg не благоприятствует дальнейшему каталитических процессов. протеканию В то же время стабилизируется 5'-фосфатом (p¹) в обоих ферментах. На стадии II 8-охоGua, помимо р¹, дополнительно стабилизируется His270 в случае OGG1 или Asn173 в случае Fpg. Аналогичные взаимодействия с Gua оказываются невозможными по причине отсутствия атома O^8 . На стадии III оба фермента начинали взаимодействовать с О⁸ повреждения своими каталитическими остатками: Pro1 в случае Fpg или Lys249 в случае OGG1. В отсутствие O⁸ Gua образует водородную связь с остатком Pro1 через N7, принимая неблагоприятную на стадии III основание конформацию. В OGG1 стабилизировано. Для дальнейшего попадания Gua в активный центр любой из

гликозилаз требуется преодолеть небольшой энергетический барьер, в то время как видимого барьера в случае 8-охоGua не наблюдалось. Конечная точка выворачивая нуклеотида — активный центр фермента. Согласно профилям свободной энергии, стадия IV— это стабильное состояние только для 8-охоGua.

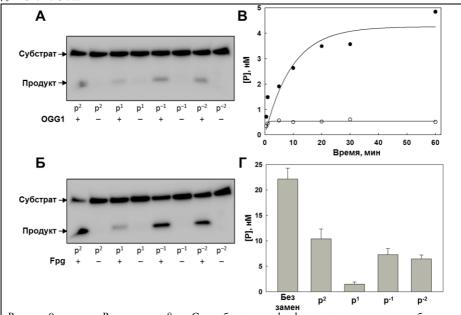


Рисунок 9. Расщепление 8-охоGua-субстратов с фосфоротиоатными заменами белками OGG1 (A) и Fpg (Б) в условиях стационарной кинетики. Расщепление 8-охоGua-субстрата без фосфатных замен (черные символы) и с фосфоротиоатной заменой (белые символы) в р¹-позиции белком OGG1 (В) в условиях кинетики одного оборота. Сравнение активности OGG1 на 8-охоGua-субстратах, содержащих фосфоротиоатную замену в различных положениях или без нее, в условиях стационарной кинетики (Г).

Поскольку в ходе моделирования выворачивания было выявлено важное промежуточное взаимодействие между 8-охоGua и p^1 , представлялось необходимым изучить влияние изменений в этом фосфате на активность фермента. Были сконструированы ДНК-субстраты, содержащие 8-охоGua в одной цепи и фосфоротиоаты в позициях p^2 , p^1 , p^{-1} или p^{-2} комплементарной цепи. Отсутствие субстрата с заменой в p^0 позиции связано с недоступностью подходящего фосфорамидита для синтеза. В результате замена в p^1 позиции значительно снижала активность обоих ферментов (рисунок 9 А и Б). Причем для OGG1 это справедливо как в условиях стационарной кинетики, так и в условиях кинетики одного оборота (рисунок 9 В и Г). Примечательно, что p^1 не образует прямого контакта с белком и не участвует в химических этапах реакции, катализируемой ДНК-гликозилазами. Таким образом, ингибирование

OGG1 и Fpg фосфоротиоатной группой, наиболее вероятно, имеет конформационную природу, предсказанную компьютерным моделированием.

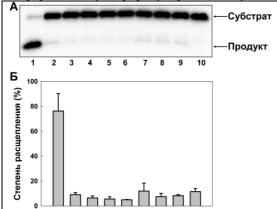


Рисунок 10. Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления 8-охо Gua-субстрата мутантными формами белка Fpg(A), сравнение эффективности расщепления 8-охо Gua-субстрата мутантными формами белка Грд в одинаковых условиях (Б).В обоих случаях Α И Б нумерация соответствует следующему: 1 — WT (дикий тип), 2 — R108K, 3 — R108L, 4 — R108Q, 5 — N168D, 6 — N168Q, 7 — R258A, 8 — R258Q, 9 — R258K, 10 — реакционная смесь без фермента (только для А).

ходе компьютерного моделирования выворачивания нуклеотидов белком Fpg был предсказан ряд ключевых аминокислотных остатков для стабилизации основных конформеров на траектории выворачивания. С целью экспериментальной проверки предсказанной важности этих остатков в узнавании повреждения был получен набор мутаций в Fpg: Arg108 был заменен на Lys, Gln и Leu, Asn168 — на Asp или Gln, Arg258 — на Lys, Gln или Ala. В результате было установлено, что все мутации делали Fpg практически неспособным к расщеплению 8-охоGua-субстрата (рисунок 10), в то время как существенного влияния на АР-лиазную активность обнаружено не было. Это свидетельствует о том, что вносимые мутации не нарушают основную структуру белка, не затрагивают его способность связывать ДНКсубстрат или надлежащим образом ориентировать каталитические остатки Pro1 и Glu2, а влияние на активность, может объясняться нарушением процесса выворачивания поврежденного нуклеотида. Таким образом, несмотря на отсутствие структурной гомологии между OGG1 и Fpg оба белка эффективно используют схожие энергетические и структурные механизмы верификации многостадийной повреждений, что, существенно облегчает быстрое распознавание поврежденного основания, необходимое при сканировании ДНК в масштабах целого Обнаруженное сходство механизмов для двух разных структурных классов ферментов позволяет предположить, что такой способ узнавания повреждений может быть общим в репарации ДНК.

6. Влияние целостности сахарофосфатного остова ДНК на механизм Fpg

Согласно анализу кристаллических структур ДНК в комплексе с Fpg из различных видов, белок главным образом образует контакты с фосфатами

вблизи от повреждения. Поэтому для оценки важности целостности сахарофосфатного остова для расщепления ДНК-субстрата белком Fpg были сконструированы субстраты, в которых отсутствовала одна из шести ближайших фосфоэфирных связей поврежденной цепи с каждой из сторон от 8-охоGua.

Ковалентные связи 5' и 3' гидроксильных групп 8-охоGua, связь между C^{-1} и его фосфатом и T^{-2} и его фосфатом оказались абсолютно необходимыми для активности Fpg (рисунок 11). В структуре Fpg *E. coli* в комплексе с ДНК только фосфаты p^0 , p^{-1} , и p^{-2} поврежденной цепи образуют плотную сеть взаимодействий с аминокислотными остатками белка, поэтому важность целостности связей при этих остатках вполне ожидаема.

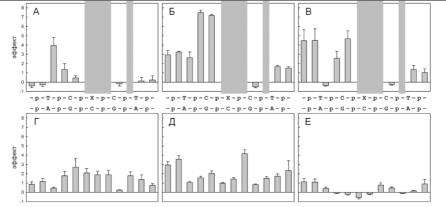


Рисунок 11. Влияние разрыва на кинетику расшепления 8-охоGua содержащего субстрата белком Fpg (X=8-охоGua). А–В — субстраты с разрывом в поврежденной цепи; Γ –Е — субстраты с разрывом в неповрежденной цепи. Поврежденная цепь представлена в направлении $5'\to 3'$. А и Γ — $K_{\rm M}$ для всех положений разрыва в обеих цепях субстрата; Б и Д — $k_{\rm cat}$ для всех положений разрыва в обеих цепях субстрата; В и Е — $k_{\rm spt}$ для всех положений разрыва в обеих цепях субстрата. «Эффект» — разность между константами субстратов в присутствии разрыва и без него, нормированная на меньшее из этих значений. Заштрихованные области обозначают положение разрывов, делающих субстрат устойчивым к расщеплению белком Fpg.

Удаление связей между C^{-1} и его 3'-фосфатом или T^{+2} и его 3'-фосфатом оказывало незначительный негативный эффект на $k_{\rm sp}$ (~25%), в то время как нарушение других связей увеличивало активность от 2 до 5 раз. В большинстве случаев увеличение активности было вызвано возросшим $k_{\rm cat}$, при этом $K_{\rm M}$ значительно не менялось (рисунок 11 А и Б). Это свидетельствует о том, что разрывы в определенных положениях могут снимать конформационное напряжение в предкаталитическом комплексе или лучше стабилизировать переходное состояние, практически не влияя на сродство Fpg к соответствующему субстрату.

Чтобы оценить необходимость целостности неповрежденной цепи для активности Fpg разрывы аналогичным образом вносились в область шести нуклеотидов вокруг 8-охоGua, но уже в комплементарной цепи. Несмотря на то, что Fpg покрывает более протяженную область комплементарной цепи, контакты с фосфатами здесь значительно скуднее, главным образом с $p^{(0)}$, $p^{(+1)}$ и $p^{(+2)}$. В согласии со слабыми взаимодействиями фосфатов с Fpg, разрыв фосфоэфирных связей в комплементарной цепи слабо влиял на активность фермента при рассмотрении $k_{\rm sp}$. Отсутствие отрицательного влияния разрывов во всех положениях неповрежденной цепи было довольно неожиданным, особенно в свете данных о том, что бреши ДНК без остатка фосфата снижали активность Fpg. Из структуры комплекса Fpg достаточно очевидно сжатие сахарофосфатного остова вокруг $C^{(0)}$. Однако сеть контактов белка с фосфатами неповрежденной цепи намного менее плотная, а поверхность контакта меньше, чем в случае поврежденной цепи. Вполне вероятно, что конформационные изменения неповрежденной цепи следуют за изменениями поврежденной, а не вызываются белком напрямую.

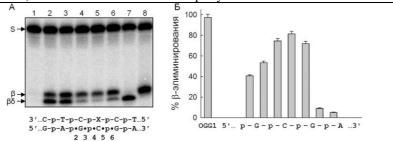


Рисунок 12. Образование продукта β -элиминирования в зависимости от положения одноцепочечного разрыва. А — радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов реакции расщепления поврежденного субстрата белком Fpg. X — 8-охоGua. Стрелками указаны подвижности продуктов β - и β / δ -элиминирования и нерасщепленного субстрата (S). 1 — контроль без фермента, 2-6 — субстраты с соответствующим положением разрыва, 7 — контроль подвижности β / δ -элиминирования (контрольный субстрат без разрыва, обработанный Fpg), 8 — контроль подвижности β -элиминирования (контрольный субстрат без разрыва, обработанный OGG1); δ — зависимость доли продукта, расщепленного по механизму β -элиминирования от положения одноцепочечного разрыва.

В ходе исследования влияния разрывов в неповрежденной цепи на активность Fpg с некоторых случаях была замечена нетипичная миграция полос относительно маркера подвижности β/δ -элиминирования (рисунок 12). Систематический анализ подвижности продуктов выявил, что разрывы цепи вблизи Cyt, комплементарного повреждению, и двух соседних нуклеотидов провоцировали преждевременную остановку реакции, катализируемой Fpg, при этом начинал накапливаться продукт β -элиминирования (рисунок 12). Обычно процессы β/δ -элиминирования в Fpg протекают согласовано, однако наличие разрыва в противоположной цепочке, вероятно, может разъединить эти два шага реакции.

Полученные результаты хорошо укладываются в представление о функционировании ДНК-гликозилазы, при котором механическая связь в ДНК-субстрате критична для конформационных преобразований, инициированных ферментом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы с привлечением различных физикохимических подходов охарактеризован процесс удаления поврежденных оснований 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазами из разных организмов и определены факторы, влияющие на узнавание поврежденной ДНК. Ключевые предсказания вычислительных методов были подтверждены биохимически. Исследование было сфокусировано не только на определении структурных детерминант белка, определяющих молекулярные основы узнавания повреждённого основания, но и на структурных аспектах самого ДНКсубстрата, влияющих на этот процесс.

области исследований механизма действия ДНК-гликозилаз в последние годы сложилось представление о многостадийном узнавании поврежденных оснований, который позволяет надежно отличать их на фоне огромного избытка нормальной ДНК. В соответствии с ним, после первичного претерпевает связывания фермента c ЛНК комплекс конформационных изменений, и в промежуточных кинетически стабильных конформерах возникают специфичные для повреждения контакты, которые не могут быть образованы с нормальными основаниями. Настоящее исследование развивает и углубляет эту модель. В нем впервые показано, что несколько таких селективных конформеров возникают на стадии выворачивания поврежденного основания, которая ранее рассматривалась как один этап в процессе узнавания. Кроме того, представленные данные свидетельствуют о важности механического напряжения, передающегося по ковалентному контуру ДНК, для ее конформационных преобразований, инициированных ферментом. Представляется интересной возможность связать измеренную в работе энергию стэкинга с константами скорости конформационных переходов для окончательной привязки стадий реакции, наблюдаемых методом остановленной струи с детекцией флуоресценции, к внедрению интеркалирующей группы фермента выворачиванию основания, И сопровождающимся разрушением стэкинга.

выводы

- 1. Показано, что присутствие неканонических пар с двух сторон от поврежденного звена приводит к значительному увеличению $K_{\rm M}$ для ферментов OGG1 и Fpg, в то время как значения k_{cat} меняются в гораздо диапазоне. Значения k_{cat} для OGG1 коррелируют конформационным параметром twist в окружении повреждения. Влияние стабильности нуклеотилного окружения места повреждения каталитическую активность обоих ферментов во многом совпадает, несмотря на существенные отличия в их структурах.
- 2. Определены термодинамические параметры стэкинга 8-охоGua и Gua в составе ДНК. Независимо от контекста 8-охоGua оказывает дестабилизирующее действие (от 0,7 до 4,3 ккал/моль) на стэкинг оснований. Зависимость энергии стэкинг-взаимодействий от нуклеотидного контекста для 8-охоGua и неповрежденного Gua существенно различаются.
- 3. Установлено, что изолированный С-концевой домен Fpg способен связывать ДНК и обладает остаточной AP-лиазной активностью, в то время как изолированный N-концевой домен Fpg не проявляет ни ДНК-связывающей, ни каталитической активности.
- 4. Впервые приведен биохимический анализ эволюционно консервативных взаимодействий в молекуле белка Fpg. Показано, что мостик Arg54—Glu131, удаленный от активного центра необходим для эффективного связывания ДНК-субстрата. Эволюционно консервативный мостик Gln234—Arg244 придает белку термическую стабильность, но практически не влияет на его ферментативную активность. Взаимодействие Tyr170—Ser208 в динамике неустойчиво, однако Tyr170 образует связь с Thr214 в центре связывания 8-охоGua.
- 5. Показано, что замены аминокислотных остатков Arg108, Asn168 и Arg258 в Fpg, участвующих по данным компьютерного моделирования в динамическом узнавании 8-охоGua, инактивируют фермент по отношению к 8-охоGua-содержащие субстратам, однако практически не влияют на AP-лиазную активность. Установлена критическая роль фосфатной группы через один нуклеотид с 5'-стороны от 8-охоGua на ранних стадиях узнавания 8-охоGua ферментами OGG1 и Fpg.
- 6. Установлено, что одноцепочечные разрывы в поврежденной цепи в нескольких ближайших положениях к 8-охоGua приводят к полной потере активности Fpg. При этом одноцепочечные разрывы в комплементарной цепи не снижают эффективность расщепления, однако по мере приближения разрыва к месту напротив повреждения приводят к повышению доли продуктов β-элиминирования.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

- 1. **Ендуткин А.В.** Узнавание поврежденной ДНК С-концевым доменом 8-оксогуанин-ДНК-N-гликозилазы из *Escherichia coli* // Вестник НГУ: Биология, клинич. мед. 2010. Т. 8. № 2. С. 18–24.
- 2. Kirpota O.O., **Endutkin A.V.**, Ponomarenko M.P., Ponomarenko P.M., Zharkov D.O., Nevinsky G.A. Thermodynamic and kinetic basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase // Nucleic Acids Res. − 2011. − V. 39. − № 11. − P. 4836-4850.
- 3. Li H., **Endutkin A.V.**, Bergonzo C., Campbell A.J., de los Santos C., Grollman A., Zharkov D.O., Simmerling C. A dynamic checkpoint in oxidative lesion discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 2. P. 683-694.
- 4. Li H., **Endutkin A.V.**, Bergonzo C., Fu L., Grollman A., Zharkov D.O., Simmerling C. DNA Deformation-Coupled Recognition of 8-Oxoguanine: Conformational Kinetic Gating in Human DNA Glycosylase // J Am Chem Soc. 2017. V. 139. № 7. P. 2682-2692.
- Endutkin A.V., Koptelov S.S., Popov A.V., Torgasheva N.A., Lomzov A.A., Tsygankova A.R., Skiba T.V., Afonnikov D.A., Zharkov D.O. Residue coevolution reveals functionally important intramolecular interactions in formamidopyrimidine-DNA glycosylase // DNA Repair – 2018. – V. 69. – P. 24-33.