

На правах рукописи

КУЗНЕЦОВ НИКИТА АЛЕКСАНДРОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УЗНАВАНИЯ И
УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ПРОЦЕССЕ ЭКСЦИЗИОННОЙ
РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ**

03.01.04 – биохимия



Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Институте химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Официальные оппоненты:

Кочетков Сергей Николаевич, д.х.н., чл.-корр. РАН,
профессор, Институт молекулярной биологии имени
В.А. Энгельгардта РАН, зав. лабораторией

Гогтих Марина Борисовна, д.х.н., профессор,
Научно-исследовательский институт физико-
химической биологии имени А.Н. Белозерского,
главный научный сотрудник

Беликов Сергей Иванович, д.б.н., профессор,
ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, зав.
лабораторией

Ведущая организация:

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН

Защита состоится « 23 » марта 2018 г. в 12⁰⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Института
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:
630090, Новосибирск-90, пр. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
к.х.н., доцент



Коваль В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Способность белков и нуклеиновых кислот существовать в различных конформациях является уникальной особенностью биополимеров. Ферментативные процессы с участием этих макромолекул, включающие стадии связывания субстратов и каталитические реакции, также сопровождаются конформационными перестройками. Существует прямая связь между конформационной динамикой взаимодействующих молекул и функциональной активностью и эффективностью действия ферментов.

В настоящее время понимание механизмов ферментативных реакций в основном базируется на статических структурных данных, получаемых из рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии, данных стационарной кинетики, позволяющих сравнить специфичность фермента к субстратам и скорость их превращения и анализа строения интермедиатов и продуктов превращения субстратов.

Несомненно, структурные методы вносят большой вклад в понимание природы ферментативного катализа, но они могут дать информацию лишь об определенном, фиксированном состоянии фермента и субстрата в определенной точке ферментативного процесса, например, в каталитическом комплексе. Установив структурными методами совокупность процессов, которые должны произойти для образования каталитического комплекса, остается совершенно непонятной последовательность этих событий, природа взаимодействий на начальных стадиях узнавания субстрата, природа стадий, обеспечивающих специфичность фермента и эффективную дискриминацию субстрата и «не субстрата».

Для ответов на эти вопросы и понимание механизмов специфического фермент-субстратного взаимодействия необходимо проводить анализ конформационной динамики в процессе взаимодействия. Существенный вклад в понимание механизмов специфического фермент-субстратного взаимодействия вносят исследования предстационарной кинетики и термодинамики ферментативного процесса с регистрацией конформационных превращений взаимодействующих молекул. Таким образом, анализ конформационной динамики, являющийся связующим звеном всех подходов к изучению механизма действия ферментов, является актуальным направлением в современных исследованиях.

В качестве объектов исследования конформационной динамики в процессах специфического узнавания субстрата в диссертационной работе использовали ферменты системы репарации ДНК, а именно ДНК-гликозилазы и AP-эндонуклеазы. Известно, что клеточная ДНК в процессе своего функционирования постоянно подвергается воздействию различных факторов, которые могут приводить к ее повреждению. Окисление, алкилирование, дезаминирование, гидролиз N-гликозидных связей, образование разрывов рибозо-фосфатного остова и сшивки цепей – это неполный спектр процессов, приводящих к повреждению ДНК. Для противостояния процессу накопления повреждений в ДНК каждый живой организм имеет специализированную систему защиты ДНК от повреждений

– систему репарации ДНК. Ферменты системы репарации играют важную роль в сохранении целостности ДНК и выполняют ответственную функцию в процессе жизнедеятельности любого организма, что делает их актуальными объектами исследований.

Основной целью данной работы являлось определение молекулярно-кинетических механизмов конформационных изменений фермента и ДНК в ходе специфического узнавания повреждений в процессах, катализируемых про- и эукариотическими ДНК-гликозилазами и AP-эндонуклеазами и выявление общих закономерностей образования каталитически активных комплексов ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам.

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

- Разработать комплексную методологию изучения молекулярно-кинетических механизмов в ходе узнавания повреждений про- и эукариотическими ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанную на предстационарном кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе конформационных изменений ферментов и ДНК-субстратов.

- Провести систематическое исследование широкого круга ферментов репарации ДНК человека и *E. coli* – ДНК-гликозилаз, принадлежащих к двум разным структурным семействам HhH-GDP и H2tH, и AP-эндонуклеазы в ходе полного ферментативного цикла взаимодействия с ДНК-субстратами разной степени специфичности. Для этого провести анализ конформационной динамики ферментов по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp белков дикого типа, а также мутантных форм ферментов, содержащих дополнительные остатки Trp, введенные методом сайт-направленного мутагенеза. Использовать для выяснения природы конформационных переходов в молекуле ДНК модельные системы ДНК-субстратов, содержащие флуоресцентные аналоги азотистых оснований, в том числе новые, а также FRET-красители.

- Проанализировать механизмы конформационной подстройки активных центров ферментов, входящих в одно структурное семейство; установить ключевые стадии ферментативных процессов, обеспечивающие высокую субстратную специфичность и ответственные за узнавание поврежденных нуклеотидов в ДНК, определить и детализировать функциональную роль отдельных аминокислотных остатков, входящих в активные центры и участки связывания субстратов.

- Установить кинетические особенности узнавания повреждений ДНК ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам.

- Применить методологию получения термодинамических параметров из кинетических данных к процессам с участием короткоживущих фермент-субстратных комплексов; выявить термодинамические особенности трансформации фермент-субстратных комплексов.

- Разработать и апробировать тест-систему для определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований и провести скрининг потенциальных ингибиторов ферментов.

Научная новизна и практическая ценность работы. В рамках настоящей работы проведено систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов узнавания повреждений и их удаления про- и эукариотическими ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК. Для этого в ходе работы разработана и использована комплексная методология изучения механизмов действия широкого круга ферментов репарации ДНК человека и *E. coli* – ДНК-гликозилаз, принадлежащих к разным структурным семействам, а также AP-эндонуклеазы, которая структурно и каталитически отличается от ДНК-гликозилаз. Данная методология основана на кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе изменений конформации молекул фермента и ДНК в процессе их взаимодействия в режиме реального времени.

Поскольку изменение структуры взаимодействующих молекул происходит в миллисекундном и секундном диапазонах времени, для изучения этих изменений использованы методы предстационарной кинетики: метод прерывания реакции («quench-flow») и метод остановленной струи («stopped-flow»). Конформационные переходы фермента регистрировались по изменению как собственной флуоресценции, обусловленной, преимущественно, присутствием природного набора остатков Trp в молекуле, так и флуоресценции, введенных методом сайт-направленного мутагенеза дополнительных остатков Trp в различные домены молекулы, принимающие участие в специфических белково-нуклеиновых взаимодействиях. Для регистрации конформационных изменений ДНК использовали модельные ДНК-дуплексы, содержащие флуоресцирующие аналоги азотистых оснований, расположенные в непосредственной близости от специфического сайта и имеющие минимальное влияние на структуру и стабильность ДНК-дуплексов. Также использовали более объемные флуоресцентные красители, введенные через линкер с фосфатными группами или азотистыми основаниями и, как правило, формирующие FRET-пару.

В работе использовали подход постадийного усложнения структуры специфического сайта, который позволяет соотнести конформационные изменения фермента и ДНК с взаимодействиями конкретных остатков в процессе образования специфических фермент-субстратных комплексов.

Для построения детальной модели фермент-субстратного взаимодействия был проведен термодинамический анализ быстропротекающих стадий связывания. Для этого процесс взаимодействия ферментов с поврежденной и неповрежденной ДНК был зарегистрирован при разных температурах. Несмотря на общеизвестность самого принципа определения величин ΔH_o и ΔS_o равновесных процессов, в литературе до настоящего времени практически отсутствуют данные о применении такого подхода к многостадийным быстропротекающим процессам. Данный подход позволил определить термодинамические параметры равновесных стадий формирования промежуточных короткоживущих белково-нуклеиновых комплексов и интермедиатов реакции.

Для выяснения функциональной роли аминокислотных остатков, входящих в активный центр ферментов и/или участки связывания с субстратом, в процессах неспецифического связывания ДНК, специфического узнавания повреждения и каталитической реакции использовали мутантные формы ферментов, содержащие замены этих аминокислотных остатков.

Совокупность данных, полученных с использованием всех подходов и характеризующих конформационные изменения как ферментов и их мутантных форм, так и модельных ДНК-дуплексов, содержащих модификации разной степени специфичности и различные флуорофоры, позволила установить детальные молекулярно-кинетические механизмы узнавания специфических сайтов в ДНК, образования каталитически компетентных комплексов и протекания химических стадий реакции.

Проведенное систематическое исследование внесло значительный вклад в понимание механизмов специфического узнавания повреждений в ДНК. Показано, что образование каталитически компетентного состояния сопровождается взаимосвязанными последовательными конформационными перестройками взаимодействующих молекул, которые обеспечивают высокую субстратную специфичность ферментов и отвечают за дискриминацию поврежденных и неповрежденных нуклеотидов.

Впервые проведено детальное сравнение про- и эукариотических ДНК-гликозилаз структурных семейств H2tH и HhH-GPD, а также AP-эндонуклеазы, структурно и каталитически отличной от ДНК-гликозилаз. Показано, что существуют общие процессы характерные для ферментов, принадлежащих к разным структурным семействам. Образование первичного неспецифического комплекса индуцирует локальное разрыхление и/или частичное плавление цепей ДНК-дуплекса. Затем происходит попытка вклинивания аминокислоты-сенсора в дестабилизированный ДНК-дуплекс. В случае поврежденной ДНК происходит выворачивание нуклеотида и встраивание на его место других аминокислотных остатков активного центра фермента, стабилизирующих внеспиральное положение вывернутого поврежденного нуклеотида. Термодинамический анализ быстротекущих стадий образования каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса показал, что изменение структуры фермента и ДНК требует дополнительных затрат энергии, которые компенсируются за счет роста энтропии системы вследствие десольватации полярных групп в области контакта белок-ДНК и удаления молекул воды из области контактов, в том числе «кристаллической» воды, расположенной в бороздках ДНК. Таким образом, разработанная методология и проведенное систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов внесли существенный вклад в понимание общих принципов узнавания специфических сайтов в ДНК.

Детальное понимание механизмов функционирования ферментов репарации ДНК, полученное в ходе выполнения работы, позволило разработать и апробировать высокочувствительный метод определения активности одного из

ключевых ферментов репарации ДНК – AP-эндонуклеазы человека APE1. Метод основан на использовании флуоресцентного ДНК-зонда, содержащего определенный тип повреждения, который обеспечивает специфичность к конкретному ферменту, в данном случае AP-эндонуклеазе. Модельные ДНК-зонды включают поврежденный нуклеотид, определяющий специфичность ДНК-зонда, FRET-пару красителей, обладающих достаточной чувствительностью для регистрации ферментов, проявляющих специфическую активность, и защитные модификации, повышающие устойчивость к неспецифическим эндо- и экзонуклеазам. Разработанный подход к созданию специфических ДНК-зондов может быть расширен для определения активности других ферментов репарации ДНК с целью диагностирования уровня репарационно-защитного статуса конкретного организма. Кроме того, такие ДНК-зонды могут быть использованы для быстрого, поточного поиска низкомолекулярных соединений, оказывающих селективное влияние на активность ферментов репарации ДНК. В ходе выполнения работы было найдено низкомолекулярное соединение, являющееся первым и единственным в мире ингибитором важнейшего фермента репарации человека hOGG1.

Публикации и апробация работы. Материалы диссертационной работы опубликованы в 25 статьях и 2 патентах. Результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, Россия, 2008); Russian-European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability (Санкт-Петербург, Россия, 2008); Международная конференция «Физико-химическая биология», посвященная 85-летию акад. Д.Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2011); 36th FEBS congress (Torino, Italy, 2011); Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society (Barcelona, Spain, 2011); VIII International Voevodsky Conference Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes (Новосибирск, Россия, 2012); Regional Interdisciplinary Conference – Humboldt Kolleg «Magnetic resonance as a tool for interdisciplinary research» (Новосибирск, Россия, 2013); 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 2013); Объединенный конгресс FEBS-EMBO (Paris, France, 2014); Международный научный форум молодых ученых (Севастополь, Россия, 2015); Международная конференция «Физико-химическая биология», посвященная 90-летию акад. Д.Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2016); V Съезд биохимиков России (Сочи, Россия, 2016); Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, Россия, 2017).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 286 страницах, содержит 110 рисунков, 29 схем и 31 таблицу. Библиография включает 508 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Общие принципы исследования конформационной динамики в режиме реального времени

Анализ конформационной подвижности структуры фермента и субстрата при их взаимодействии представляет собой трудную и нетривиальную задачу, требующую применения широкого спектра методов исследования и использования различных подходов.

Флуоресцентная спектроскопия широко применяется для изучения фермент-субстратных взаимодействий (Lakowicz, 2006). Конформационные превращения белков регистрировали по изменению их собственной флуоресценции, возникающей за счет остатков триптофана. Триптофан является наиболее интенсивно флуоресцирующей аминокислотой, и примерно 90% всей флуоресценции белков обычно обусловлено его присутствием. Еще одна флуоресцирующая аминокислота, тирозин, дает вклад в спектр испускания только тогда, когда он находится в белке в большом избытке по отношению к триптофану. Флуоресценция триптофана очень чувствительна к полярности окружающей среды, а также тушится различными молекулами, включая ДНК. Максимумы испускания флуоресценции белков зависят от локального окружения остатков триптофана в молекуле полипептида. Например, сдвиг в коротковолновую область интерпретируют как результат экранирования триптофановых остатков от водной фазы. В то же время процесс денатурации приводит к длинноволновому сдвигу в спектре испускания флуоресценции и, приблизительно, к одной и той же величине максимума в спектре испускания всех белков. Положение максимума в спектре флуоресценции изменяется, если остатки триптофана вовлечены во взаимодействие, что позволяет следить за процессом связывания белком ДНК (Wong *et al.*, 2002; Dunlap *et al.*, 2002). Однако необходимо иметь в виду, что большинство белков содержит несколько остатков Trp, находящихся в различном окружении, поэтому спектральные свойства каждого из них могут различаться. Таким образом, данные, полученные при регистрации изменений интенсивности остатков Trp, в общем случае, позволяют сделать заключение об общей конформационной динамике фермента.

В нуклеиновых кислотах конформационные переходы можно регистрировать с помощью флуоресцентных аналогов гетероциклических оснований (Wilhelmsson, 2010). Флуоресценция большинства из этих аналогов тушится соседними основаниями, причем эффективность тушения зависит от природы соседних оснований и конформации ДНК. Для исследования фермент-субстратных взаимодействий наиболее широкое применение нашел 2-аминопурин (aPu) (Purohit *et al.*, 2003). По сравнению со свободным нуклеотидом интенсивность флуоресценции aPu в составе ДНК снижается из-за стэкинга с соседними основаниями. Помимо aPu достаточно широко используются аналоги цитозина, например пирролоцитозин (C^{Py}) (Zang *et al.*, 2005) и 1,3-диаза-2-оксофеноксазин (tC^O) (Sandin *et al.*, 2008). Флуоресценция пирролоцитозина тушится в составе

двухцепочечной ДНК по сравнению с одноцепочечной структурой. Необходимо отметить, что для кинетического анализа белково-нуклеиновых взаимодействий C^{Py} (Kuznetsov *et al.*, 2012) и tC^O (Kuznetsova *et al.*, 2014 и Kuznetsov *et al.*, 2015) были использованы впервые. Также в наших работах были использованы и апробированы новые флуорофоры: нафто[1,2,3-cd]индол-6(2H)-он (Vasilyeva *et al.*, 2017) и 3-гидроксихромон (Dziuba *et al.*, 2012). Таким образом,

Таблица 1. ДНК-субстраты и ДНК-лиганды, использованные в работе

Сокращенное название	Последовательность
X/N_{12} $X = \text{oxoG, DHU, U, AP, F, G}$ $N = \text{C, G, A, aPu, C}^{Py}, \text{ЗHC, } tC^O$	5'-CTCTC X CCTTCC-3' 3'-GAGAG N GGAAGG-5'
X^{aPu}/N_{12} $X = \text{oxoG, AP, F, G}$ $N = \text{C, G}$	5'-CTCTC X (aPu) CTTCC-3' 3'-GAGAG N C GAAGG-5'
$aPuX/C_{12}$ $X = \text{oxoG, G}$	5'-CTCT (aPu) X CCTTCC-3' 3'-GAGA C CGGAAGG -5'
X^{DHU}/G_{12} $X = \text{aPu, ЗHC; Z = C}$ $X = \text{C}^{Py}; Z = \text{G}$	5'-CTCT X (DH) CCTTCC-3' 3'-GAGAZ G GGAAGG-5'
$X^{FAM/Dab}/C_{12}$ $X = \text{F, G}$	5'-FAM-CTCTC X CCTTCC-3' 3'-Dab-GAGAG CGGAAGG -5'
X^{FAM}/N_{12} $X = \text{oxoG, G, F}$ $N = \text{A, G, C}$	5'-FAM-CTCTC X CCTTCC-3' 3'-GAGAG NGGAAGG -5'
$\text{oxoG}^{Cy3/Cy5}/C_{12}$	5'-Cy3-CTCTC (oxoG) CCTTCC-3' 3'-Cy5-GAGAG C GGAAGG -5'
X/N_{13} $X = \text{DHU, AP, F, G}$ $N = \text{A, G, C, T, } tC^O$	5'-TCTCTC X CCTTCC-3' 3'-AGAGAG N GGAAGG-5'
X^{aPu}/N_{13} $X = \text{DHU, AP, F, G}$ $N = \text{A, G, C, T}$	5'-TCTCTC X (aPu) CTTCC-3' 3'-AGAGAG N C GAAGG-5'
U/G_{17}	5'-GCTCA U GTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGT G CATGTCTCGAC-5'
U^{aPu}/G_{17}	5'-GCTCA U (aPu) TACAGAGCTG-3' 3'-CGAGT G C ATGCTCTCGAC-5'
$X^{FAM/BHQ1}/G_{17}$ $X = \text{DHU, U, AP, F, C}$	5'-FAM-GCTCA X GTACAGAGCTG-3' 3'-CGAGT G CATGTCTCGAC-BHQ1-5'
X/C^{Py}_{17} $X = \text{oxoG, G, F}$	5'-TCTCTCTC X CCTTCCCT-3' 3'-AGAGAGAG (C}^{Py}) GGAAGGAA-5'
F/G_{17}	5'-TCTCTCTC F CCTTCCCT-3' 3'-AGAGAGAG G GGAAGGAA-5'
U/G_{28}	5'-GTGTCA CC ACTGCTCA U GTACAGAGCTG-3' 3'-CACAGTGGT G ACGAGT G CATGTCTCGAC-5'

использование субстратов, содержащих флуоресцирующие аналоги азотистых оснований, позволяет регистрировать конформационные изменения ДНК-субстратов в процессе образования фермент-субстратного комплекса.

Неотъемлемой частью выполнения работы являлся выбор наиболее чувствительной модельной системы ДНК-субстратов, в которой флуоресцентная группа может быть расположена с 5'-, 3'-стороны от повреждения либо в комплементарной цепи напротив повреждения. Для каждого фермента проводили сравнительный анализ таких модельных субстратов, позволяющий выбрать вариант, обладающий максимальной чувствительностью к конформационным изменениям в ДНК.

Еще одним способом изучения конформационных переходов в ДНК, использованным в работе, является метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), позволяющий регистрировать изменение расстояния между остатками донора и акцептора флуоресценции, расположенными в разных

частях молекулы. При этом пары флуоресцентных красителей могут быть расположены как на разных концах, так и с одной стороны ДНК-субстратов, что позволяет эффективно регистрировать процессы, приводящие к изменению расстояния между красителями. При этом первый вариант позволяет эффективно регистрировать изгибание ДНК при образовании комплекса с ферментом, в то время как второй вариант расположения красителей более чувствителен к каталитической стадии и последующей диссоциации комплекса фермент-продукт, приводящей к удалению донора и акцептора флуоресценции.

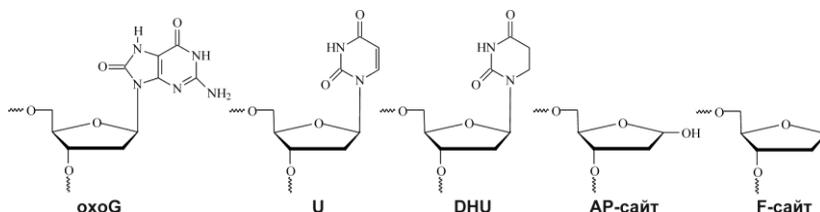
ДНК-субстраты и ДНК-лиганды, использованные в работе, представляли собой дуплексы, состоящие из олигонуклеотидов (табл. 1). ДНК-субстратом называется ДНК-дуплекс, который после связывания в активном центре фермента претерпевает химические превращения. ДНК-лигандом называется ДНК-дуплекс, который может связаться в активном центре фермента, но не претерпевает химических превращений. Структуры всех модифицированных нуклеотидов приведены на рис. 1.

Для исследования различных стадий ферментативного процесса использован подход постадийного усложнения субстрата (Nevinsky, 2011). В качестве специфического субстрата использовали дуплекс, содержащий в одной из цепей поврежденный нуклеотид, обеспечивающий формирование всех возможных контактов и специфических связей между ферментом и поврежденной ДНК. В случае ДНК-гликозилаз специфическими субстратами служили олигонуклеотиды, несущие поврежденное основание, например 8-оксогуанин, 5,6-дигидроурацил, гипоксантин, 1,N6-этноаденин, урацил и др. Для AP-эндонуклеаз такими субстратами являются дуплексы, несущие AP-сайт или его аналоги. Для ДНК-гликозилаз дуплексы, содержащие AP-сайт, который является промежуточным продуктом реакции, использовали как упрощенную модель взаимодействия с субстратом, в которой отсутствуют стадии специфического узнавания поврежденного основания. Использование нереакционноспособного аналога AP-сайта, содержащего вместо 2'-дезоксирибозы остаток 2-оксиметил-3-окситетрагидрофурана (F-сайт), позволяет охарактеризовать только стадии связывания ДНК-гликозилаз с поврежденной ДНК. Дуплекс, несущий F-сайт, имеет все особенности AP-сайта, но не способен расщепляться под действием ДНК-гликозилаз, поскольку не содержит в 1'-положении гидроксильную группу. В качестве неспецифического субстрата использовали дуплексы олигонуклеотидов, не содержащих модифицированных нуклеотидов.

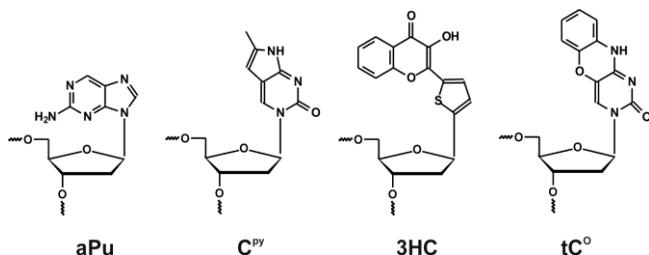
Переход от неспецифического дуплекса ДНК (наиболее простые неспецифические взаимодействия) к дуплексу, содержащему F-сайт (специфическое связывание, аналог продукта для ДНК-гликозилаз, субстрат для AP-эндонуклеаз) или AP-сайт (специфическое связывание, реакция β -элиминирования, катализируемая некоторыми ДНК-гликозилазами или гидролиз фосфодифирной связи, катализируемый AP-эндонуклеазами), а затем специфическому ДНК-субстрату, содержащему поврежденное основание (полный

ферментативный цикл реакций, катализируемый ДНК-гликозилазами), приводит к дополнительным взаимодействиям между реагирующими молекулами и, как следствие этого, к дополнительным конформационным изменениям как в молекуле фермента, так и в молекуле субстрата. Этот подход позволяет соотнести конформационные изменения в биополимерах с взаимодействиями конкретных остатков в процессе образования специфического фермент-субстратного комплекса.

a



б



в

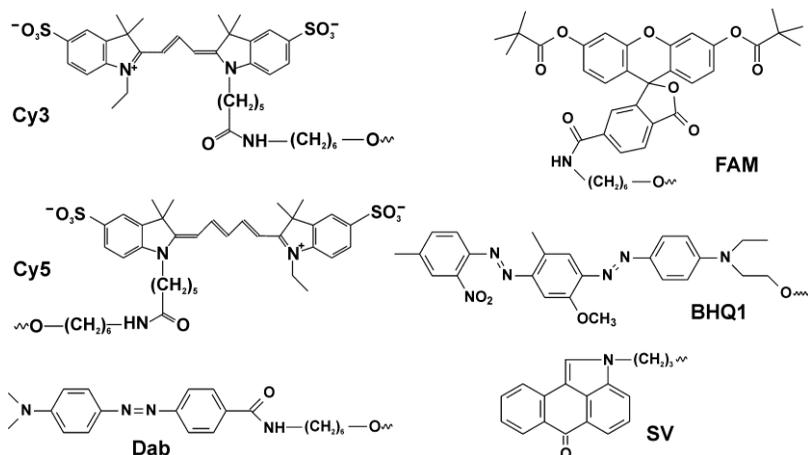


Рис. 1. Структуры использованных в работе нуклеотидов. (а) Поврежденные нуклеотиды и уридин, (б) флуоресцирующие аналоги азотистых оснований и (в) объемные красители, использованные для образования FRET-пар.

Поскольку узнавание и превращение субстратов в ферментативных реакциях протекает в миллисекундном и секундном диапазонах, то для регистрации этих процессов использовали метод остановленной струи, который позволяет смешивать фермент и субстрат в течение 1 мс с последующей непрерывной регистрацией интенсивности флуоресценции различных флуоресцентных маркеров, характеристики которых приведены внизу. Зарегистрированные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции отражали конформационные превращения в ходе фермент-субстратного взаимодействия.

Анализ кинетических данных

$F = f_0 [E] + f_1 [ES_1] + f_2 [ES_2] + \dots + f_n [ES_n] + F_{фон}$ (1) проводили по уравнению (1).

$\frac{d[ES]_1}{dt} = k_1[S][E] + k_2[ES]_2 - (k_{-1} + k_2)[ES]_1$ (2) Общая интенсивность флуоресценции была равна сумме произведений

$\frac{d[ES]_i}{dt} = k_i[ES]_{i-1} + k_{-(i+1)}[ES]_{(i+1)} - (k_{-i} + k_{i+1})[ES]_i$ (3) коэффициентов удельной флуоресценции f на

\vdots
 $\frac{d[ES]_n}{dt} = k_n[ES]_{n-1} - (k_{-n} + k_{n+1})[ES]_n$ (4) концентрацию соответствующих флуоресцирующих форм и фоновой флуоресценции.

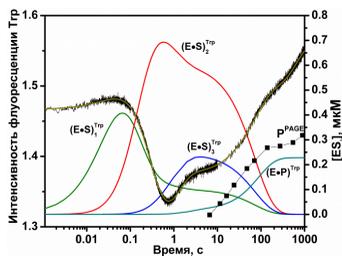
$\frac{d[P]}{dt} = k_{n+1}[ES]_n$ (5) Концентрация всех форм фермента, соответствующих

$E_0 = [E] + \sum_{i=1}^n [ES]_i$ (6) анализируемой кинетической

$S_0 = [S] + [P] + \sum_{i=1}^n [ES]_i$ (7) схеме, находилась из решения системы дифференциальных

уравнений и уравнений материального баланса (2)-(7). Численное решение этой системы уравнений с помощью программы DynaFit позволяет получить зависимость концентрации всех интермедиатов реакции от времени, констант скорости и начальных концентраций взаимодействующих веществ. В процессе численного интегрирования происходит оптимизация значений констант скорости и коэффициентов удельной флуоресценции всех форм таким образом, чтобы теоретическая кривая, соответствующая данному механизму, описывала экспериментальную кривую. Используя пошаговый подход усложнения модели взаимодействия, можно дискриминировать различные схемы фермент-субстратного взаимодействия и определить минимальное число стадий в схеме, которая будет удовлетворительно описывать экспериментальные данные, на основании соответствия теоретической и экспериментальной кривой, которое оценивается по отклонению разности этих кривых (residuals) от нулевой линии. На рис. 2а приведен пример анализа кинетической кривой, включающий зависимость концентрации всех флуоресцентно зарегистрированных интермедиатов реакции от времени. При этом стадия накопления продуктов реакции дополнительно подтверждена прямым анализом накопления продуктов реакции методом геле-электрофореза. Соответствие предложенной кинетической схемы экспериментальным данным показано на рис. 2б.

а



б

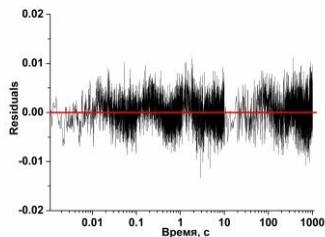


Рис. 2. (а) зависимость концентрации интермедиатов реакции от времени, (б) отклонение разности теоретической и экспериментальной кривой (residuals) от нулевой линии.

2. Конформационные изменения ДНК-гликозилаз структурного семейства HhN-GPD и ДНК в процессе их взаимодействия

2.1. 8-Оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека hOGG1

8-Оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека hOGG1 обладает очень высокой специфичностью по отношению к 8-оксогуанину, несмотря на то, что он отличается от гуанина лишь двумя атомами. В случае окисленного основания фермент катализирует реакцию гидролиза N-гликозидной связи и реакцию β -элиминирования фосфатной группы (рис. 3).

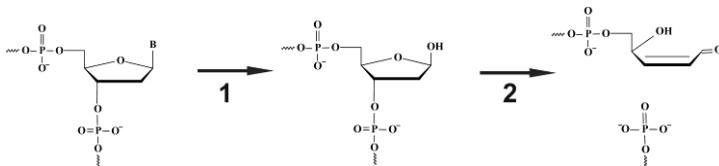


Рис. 3. Химические стадии процесса катализа hOGG1 (стадия 1: гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием AP-сайта; стадия 2: β -элиминирование 3'-фосфатной группы).

Анализ кристаллических структур фермента и его комплекса с ДНК показал, что и белок и ДНК изменяют свою конформацию в каталитическом комплексе. ДНК изогнута в месте повреждения, поврежденный нуклеотид вывернут из дуплекса и располагается в активном центре фермента (Bruner *et al.*, 2000; Crenshaw *et al.*, 2012). При этом аминокислотные остатки Arg154, Arg204, Asn149 и Tyr203 встроены в полость, образовавшуюся в ДНК после выворачивания основания (рис. 4).

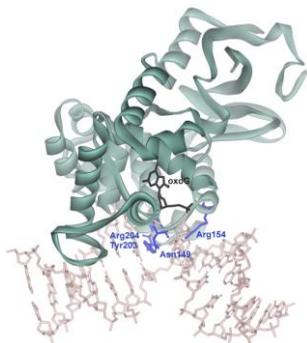


Рис. 4. Структура комплекса фермента hOGG1 с дуплексом ДНК, содержащим oxoG (PDB ID 1EVM).

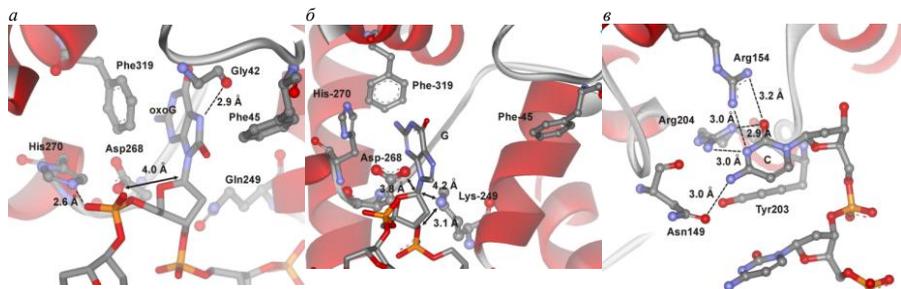


Рис. 5. Специфические контакты, обеспечивающие узнавание поврежденного основания в активном центре hOGG1. (а) Комплекс hOGG1 с ДНК-дуплексом, содержащим oxoGua, основание oxoGua расположено в активном центре, показано расположение аминокислотных остатков Gly42, Phe45, His270, Phe319, формирующих карман активного центра, и каталитических остатков Asp-268 и Gln-249 (Lys-249) (PDB ID: 1YQR). (б) Комплекс hOGG1 с неповрежденным ДНК-дуплексом, основание Gua расположено в экзосайте, показано расположение аминокислотных остатков Phe45, His270, Phe319 и каталитических остатков Asp-268 и Lys-249 (PDB ID: 1YQK). (в) Комплекс hOGG1 с ДНК-дуплексом, содержащим oxoGua, показаны аминокислотные остатки Asn149, Arg154, Tyr203 и Arg204 (PDB ID: 1EBM).

Для выяснения функциональной роли некоторых аминокислотных остатков фермента в процессах связывания ДНК, узнавания повреждения и каталитической реакции использовали мутантные формы фермента, которые содержали замены аминокислотных остатков Tyr203, Arg154, Arg204 (встраивание в дуплекс), Phe45, Phe319 и His270 (границы кармана, в котором располагается вывернутое основание) и Lys249, Asp268 (каталитические аминокислоты) (рис. 5). Методом сайт-направленного мутагенеза эти остатки были заменены и получены мутантные формы фермента. Часть мутантных форм содержит замену на остаток триптофана, который служил флуоресцентным маркером в определенном месте фермент-субстратного комплекса и позволял зарегистрировать процессы, которые происходят с участием данного аминокислотного остатка.

Относительная каталитическая активность мутантных форм фермента при взаимодействии с oxoG/C₁₂-субстратом была определена прямым анализом накопления продуктов реакции методом гель-электрофореза (рис. 6). Замена каталитических аминокислотных остатков Lys249 и Asp268 приводит к полной потере N-гликозилазной и AP-лиазной активности. Кроме того, замены аминокислотных остатков, встраивающихся в ДНК-дуплекс (Tyr203Ala, Arg154Ala и Arg204Ala), а также His270Trp приводят к значительному снижению каталитической активности.

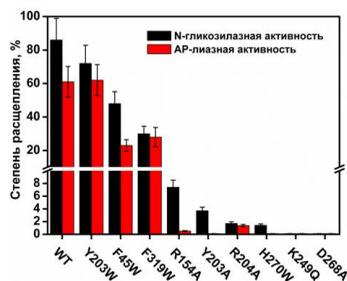


Рис. 6. Относительная активность hOGG1 WT и мутантных форм фермента. Анализ продуктов N-гликозилазной реакции и реакции β-элиминирования через 15 мин при взаимодействии hOGG1 WT и мутантных форм фермента с oxoG/C₁₂-субстратом.

Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp в процессе связывания фермента hOGG1 дикого типа и мутантных форм с неповрежденным ДНК-дуплексом G/C₁₂ даже в случаях введения новых остатков триптофана были слишком слабыми для их корректного количественного анализа (рис. 7а). Это свидетельствует о том, что молекула фермента не претерпевает значительных конформационных перегруппировок при образовании первичного неспецифического комплекса с G/C₁₂. В то же время, значительный рост интенсивности флуоресценции aPu, зарегистрированный при использовании G^{aPu}/C₁₂ дуплекса, однозначно указывает на нарушение Уотсон-Криковских связей и/или стэкинга при образовании неспецифического комплекса фермент-ДНК (рис. 7б).

Кроме того, согласно данным (Kuznetsov *et al.*, 2007), в этот момент времени может происходить частичное выворачивание основания Gua из двойной спирали и его встраивание в экзо-сайт фермента. Различия в амплитуде и времени изменения сигнала отражают различие мутантных форм в способности связывать неповрежденную ДНК и различную степень разрыхления дуплекса этими мутантными формами.

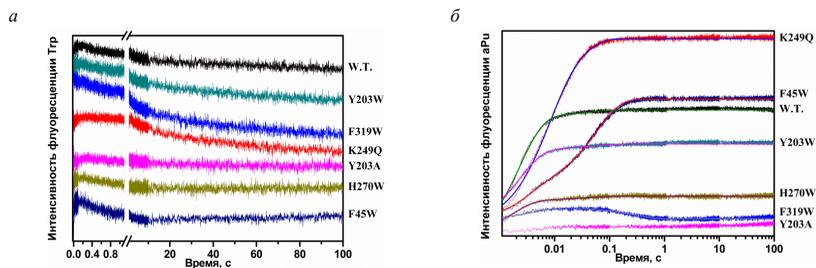


Рис. 7. Конформационные изменения фермента и ДНК при образовании первичного неспецифического комплекса. Изменения интенсивности флуоресценции Trp (а) и aPu (б) в процессе взаимодействия hOGG1 дикого типа и мутантных форм с неповрежденными ДНК дуплексами G/C₁₂ и G^{aPu}/C₁₂. Концентрации hOGG1 и ДНК-лигандов составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

При взаимодействии с AP/C₁₂-субстратом интенсивность флуоресценции Trp мутантных форм hOGG1 медленно уменьшалась в течение 10 с (рис. 8а). Поскольку hOGG1 катализирует реакцию β-элиминирования (AP-лиазная активность) с очень низкой эффективностью, то такое уменьшение флуоресценции Trp должно отражать только этап связывания ДНК. Связывание AP^{aPu}/C₁₂-субстрата и встраивание аминокислотных остатков hOGG1 в ДНК-дуплекс приводит к хорошо выраженным изменениям флуоресценции aPu, характеризующим конформационные переходы ДНК (рис. 8б). Небольшое увеличение интенсивности флуоресценции aPu (до 100 мс) для hOGG1 WT и всех мутантных форм должно быть связано с увеличением гидрофильности среды в области остатка aPu. Этот рост, скорее всего, связан с частичным плавлением дуплекса и/или взаимодействием с гидрофильными аминокислотами Arg154,

Arg204 и Asn149. Кроме того эти данные показывают, что замена Tyr203Trp приводит к замедлению фазы падения, а замена Tyr203Ala и вовсе к ее потере. То есть процесс, индуцирующий уменьшение интенсивности флуоресценции, связан с встраиванием Tyr203 в ДНК.

Для расчета наблюдаемых констант скорости, характеризующих изменение интенсивности флуоресценции при взаимодействии с неповрежденным ДНК-дуплексом **G/C**₁₂ и **AP/C**₁₂-субстратом, использовали уравнение (8):

$$F_c = F_b + \sum_{i=0}^N A_i \times \exp(-k_i \times t) \quad (8)$$

i – номер стадии, A_i – амплитуда изменения сигнала, k_i – наблюдаемая константа скорости.

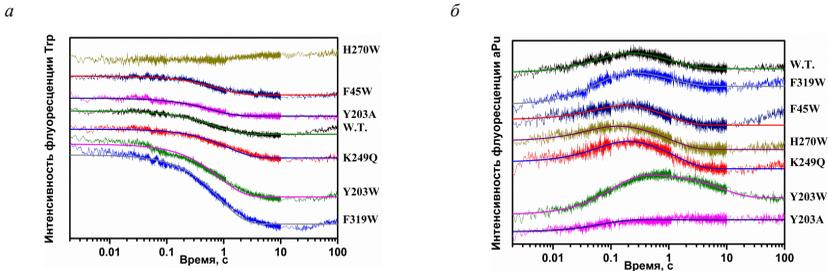
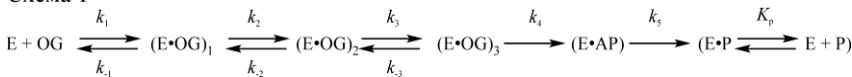


Рис. 8. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (а) и ДНК-субстрата (б) в процессе взаимодействия hOGG1 дикого типа и мутантных форм с ДНК дуплексами **AP/C**₁₂ и **AP^{aPu}/C**₁₂, содержащими AP-сайт. Концентрации hOGG1 и ДНК-субстратов составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

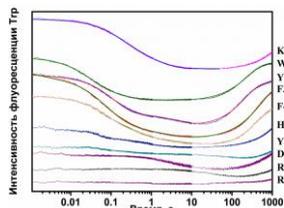
Взаимодействие между hOGG1 WT и ДНК-дуплексом **oxoG/C**₁₂ приводит к снижению сигнала Trp флуоресценции в течение 10 с (рис. 9а). Ранее было показано (Kuznetsov *et al.*, 2005), что эта фаза включает три равновесных стадии, которые были связаны с образованием каталитического комплекса фермент-ДНК (схема 1). Последующее увеличение интенсивности Trp связано с химическими стадиями ферментативного процесса и диссоциацией комплекса фермент-продукт. При взаимодействии hOGG1 WT и ДНК-дуплексом **oxoG^{aPu}/C**₁₂ было зарегистрировано увеличение интенсивности флуоресценции aPu в течение первых 20 мс (рис. 9б). Согласно (Kuznetsov *et al.*, 2007), в этом интервале времени основание oxoGua выворачивается из дуплекса в активный центр фермента, оставляя в дуплексе свободное пространство. На следующем этапе, в течение 20 мс–100 с, происходит двухступенчатое снижение флуоресценции aPu, характеризующее последовательное встраивание аминокислотных остатков Tyr203, Asn149, Arg154 и Arg204 в это свободное пространство ДНК. Каталитические стадии и диссоциация комплекса фермент-продукт приводят к увеличению интенсивности флуоресценции aPu на временах более 100 с.

Схема 1



E – hOGG1; OG – охoG-субстрат; $(E \cdot OG)_n$ – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания 8-оксогуанина; $E \cdot AP$ – комплекс E с AP-сайтом, образующимся в результате N-гликозилазной реакции; $E \cdot P$ – комплекс E с продуктом реакции P , образующимся в результате AP-лиазной реакции; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

а



б

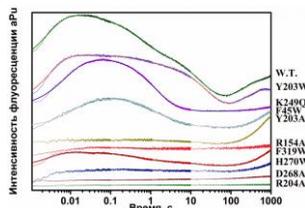
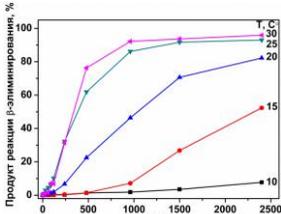


Рис. 9. Экспериментальные и теоретические кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента (а) и ДНК-субстрата (б) в процессе взаимодействия hOGG1 дикого типа и мутантных форм с ДНК дуплексами $oxoG/C_{12}$ и $oxoG^{aPu}/C_{12}$. Концентрации hOGG1 и ДНК-субстратов составляли 2,0 мкМ и 1,0 мкМ соответственно.

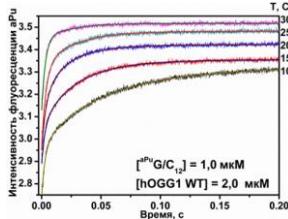
В совокупности эти данные показывают, что выбранные аминокислотные остатки действительно принимают участие, как в процессах неспецифического связывания, так и последующего узнавания повреждения, поскольку, все они оказывают влияние на конформационные изменения и фермента и дуплекса. Для всех мутантных форм получены концентрационные серии кинетических кривых, характеризующих изменения флуоресценции Trp и aPu, и рассчитаны кинетические параметры отдельных стадий (табл. 2).

Термодинамический анализ процесса взаимодействия hOGG1 с поврежденной и неповрежденной ДНК проведен на основе кинетических данных, полученных при разных температурах. При уменьшении температуры значительно уменьшается каталитическая активность фермента (рис. 10а). Кинетические кривые (рис. 10б), характеризующие образование неспецифического комплекса, при низких температурах содержат две различимые фазы роста интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о двухстадийном механизме взаимодействия. Для каждой температуры получена концентрационная серия, позволяющая рассчитать значения индивидуальных констант скорости прямых и обратных реакций равновесных стадий (табл. 3).

а



б



в

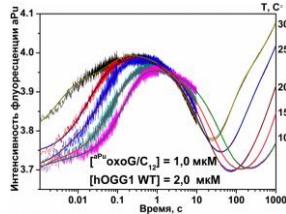


Рис. 10. Изменения интенсивности флуоресценции aPu при взаимодействии hOGG1 с aPu - $oxoG/C_{12}$ -лигандом (а) и aPu - $oxoG/C_{12}$ -субстратом (б) при различных температурах.

Таблица 2. Константы скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие hOGG1 дикого типа и мутантных форм с ДНК-субстратом, содержащим oxoG, полученными на основе анализа изменений интенсивности флуоресценции Trp и aPu

Константы	oxoG/C ₁₂					oxoG ^{aPu} /C ₁₂				
	WT ^a	K249Q	Y203W	F319W	F45W	WT ^a	K249Q	Y203W	F319W	F45W
$k_1 \times 10^{10}$, M ⁻¹ c ⁻¹	2,6 ± 0,1	1,7 ± 0,4	5,4 ± 1,0	2,2 ± 0,1	6,9 ± 1,8	1,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,66 ± 0,04	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
k_{-1} , c ⁻¹	130 ± 1	290 ± 60	520 ± 110	240 ± 10	500 ± 45	120 ± 10	62 ± 12	130 ± 7	260 ± 40	103 ± 9
K_1^b , M ⁻¹	2,0×10 ⁶	0,6×10 ⁶	1,0×10 ⁶	0,9×10 ⁶	1,4×10 ⁶	1,0×10 ⁶	0,5×10 ⁶	0,5×10 ⁶	0,2×10 ⁶	0,5×10 ⁶
k_2 , c ⁻¹	13,3 ± 0,2	5,0 ± 0,5	7,4 ± 1,0	31,9 ± 1,2	12,1 ± 2,0	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	4,1 ± 1,5	1,4 ± 0,1
k_{-2} , c ⁻¹	1,16 ± 0,02	2,8 ± 0,2	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	2,3 ± 0,6	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	2,5 ± 0,8	1,4 ± 0,2
K_2	11,5	1,8	6,2	63,8	5,3	0,9	1,3	0,2	1,6	1,0
k_3 , c ⁻¹	0,012 ± 0,001	0,26 ± 0,01	0,010 ± 0,001	0,08 ± 0,01	0,009 ± 0,001	0,10 ± 0,01	5,4 ± 1,1	0,28 ± 0,04	0,9 ± 0,2	0,48 ± 0,09
k_{-3} , c ⁻¹	0,07 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,013 ± 0,002	0,8 ± 0,1	0,022 ± 0,008	0,5 ± 0,2	0,38 ± 0,04
K_3	0,17	0,5	0,08	0,1	0,02	7,7	6,7	12,7	1,8	1,3
k_4 , c ⁻¹	0,06 ± 0,02	-	0,03 ± 0,01	0,018 ± 0,002	0,05 ± 0,01	0,029 ± 0,001	-	0,015 ± 0,004	0,015 ± 0,004	0,034 ± 0,002
$k_5 \times 10^3$, c ⁻¹	6,4 ± 0,7	-	4,2 ± 0,9	1,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1	3,6 ± 0,2	-	3,0 ± 0,7	1,9 ± 0,1	4,4 ± 0,1
K_{EP} , μM	0,88	-	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,4	7,0 ± 1,1	-	1,0 ± 0,2	-	-
K_{bind}^c , M ⁻¹	2,9×10 ⁷	2,2×10 ⁶	8,0×10 ⁶	6,5×10 ⁷	8,8×10 ⁶	9,2×10 ⁶	5,3×10 ⁶	2,1×10 ⁶	1,3×10 ⁶	1,6×10 ⁶
$K_1 \times K_2 \times K_3$	3,9×10 ⁶	0,54×10 ⁶	0,50×10 ⁶	6,1×10 ⁶	0,15×10 ⁶	6,9×10 ⁶	4,3×10 ⁶	1,3×10 ⁶	0,58×10 ⁶	0,65×10 ⁶

^a Данные работ (Kuznetsov *et al.*, 2005 и 2007), ^b $K_1 = k_1/k_{-1}$, ^c $K_{bind} = K_1 + K_1 \times K_2 + K_1 \times K_2 \times K_3$.

Таблица 3. Константы скорости, характеризующие взаимодействие hOGG1 дикого типа с aPu-oxoG/C₁₂-субстратом и aPuG/C₁₂-лигандом при разных температурах

ДНК	Константы	Температура				
		10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
aPu-oxoG/C ₁₂	k_1 , M ⁻¹ c ⁻¹	(1,3 ± 0,7)×10 ⁷	(2,2 ± 1,0)×10 ⁷	(1,7 ± 0,8)×10 ⁷	(1,9 ± 1,0)×10 ⁷	(2,0 ± 1,0)×10 ⁷
	k_{-1} , c ⁻¹	230 ± 80	390 ± 50	360 ± 20	410 ± 70	520 ± 120
	k_2 , c ⁻¹	8,3 ± 3,8	15,6 ± 4,2	26,6 ± 6,0	53,5 ± 20,3	72,4 ± 31,4
	k_{-2} , c ⁻¹	6,1 ± 0,2	11,8 ± 0,2	19,6 ± 1,7	37,9 ± 11,1	40,5 ± 12,5
	k_3 , c ⁻¹	0,087 ± 0,017	0,12 ± 0,03	0,19 ± 0,07	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
	k_{-3} , c ⁻¹	0,011 ± 0,001	0,018 ± 0,001	0,007 ± 0,002	0,02 ± 0,003	0,002 ± 0,001
	k_4 , c ⁻¹	0,005 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,014 ± 0,002	0,026 ± 0,003	0,041 ± 0,007
	k_5 , c ⁻¹	0,0006 ± 0,0001	0,0012 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001	0,001 ± 0,001	0,0037 ± 0,007
aPuG/C ₁₂	k_1 , M ⁻¹ c ⁻¹	(5,6 ± 1,2)×10 ⁷	(6,6 ± 1,1)×10 ⁷	(5,9 ± 1,3)×10 ⁷	(6,3 ± 0,3)×10 ⁷	(7,4 ± 1,4)×10 ⁷
	k_{-1} , c ⁻¹	97 ± 23	128 ± 21	119 ± 19	140 ± 14	170 ± 17
	k_2 , c ⁻¹	12,6 ± 5,5	17,5 ± 2,2	20,7 ± 6,3	14,0 ± 1,5	18,2 ± 8,7
	k_{-2} , c ⁻¹	12,4 ± 0,5	25,2 ± 1,3	38,9 ± 1,9	49,8 ± 2,3	72,1 ± 9,9

Кинетические кривые, характеризующие процесс взаимодействия hOGG1 с $^{aPu}oxoG/C_{12}$ -субстратом, имеют более сложный профиль: рост-падение-рост (рис. 10б). Концентрационные серии кинетических кривых, полученные при регистрации интенсивности флуоресценции aPu , для каждой из температур описывали схемой 1, что позволило рассчитать значения констант скорости (табл. 3).

Используя значения констант скорости прямых и обратных реакций, для каждой i -ой равновесной стадии были получены значения константы равновесия (K_i). Зависимость $\ln(K_i)$ от $1/T$ имела линейный вид (рис. 11а) и с помощью уравнения Вант-Гоффа (9) позволила рассчитать стандартную энтальпию ΔH_i° и энтропию ΔS_i° всех равновесных стадии (табл. 4). Из зависимости величин констант скорости необратимых стадии, характеризующих гидролиз N-гликозидной связи k_4 и реакцию β -элиминирования k_5 , от температуры (рис. 11б), описываемой уравнением Эйринга (10) для теории переходного состояния, рассчитаны значения стандартной энтальпии активации ($\Delta H^{o,\ddagger}$) и стандартной энтропии активации ($\Delta S^{o,\ddagger}$).

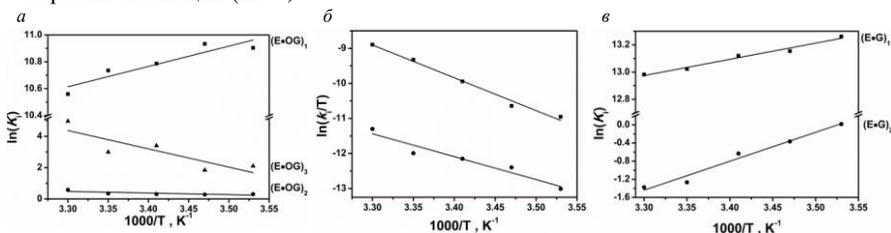


Рис. 11. Зависимость $\ln(K_i)$ (а), $\ln(k_i/T)$ (б) от $1/T$ в соответствии с уравнениями Вант-Гоффа и Эйринга, характеризующая взаимодействие hOGG1 WT с $^{aPu}oxoG/C_{12}$ -субстратом (а, б) и $^{aPu}G/C_{12}$ -лигандом (в).

$$\ln(K_i) = -\Delta G_i^\circ/RT = -\Delta H_i^\circ/RT + \Delta S_i^\circ/R, \quad (9)$$

где ΔG_i° – стандартная свободная энергия Гиббса, ΔH_i° – стандартная энтальпия и ΔS_i° – стандартная энтропия.

$$\ln(k_i/T) = \ln(k_B/h) + \Delta S^{o,\ddagger}/R - \Delta H^{o,\ddagger}/RT, \quad (10)$$

где k_B и h – постоянные Больцмана и Планка соответственно, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура в градусах Кельвина, k_i – константа скорости химической стадии.

Таблица 4. Термодинамические параметры взаимодействия hOGG1 WT с hOGG1 дикого типа с $^{aPu}oxoG/C_{12}$ -субстратом и $^{aPu}G/C_{12}$ -лигандом

ДНК	Параметр		ΔG_i° , ккал/моль	ΔH_i° , ккал/моль	ΔS_i° , кал/(К×моль)
	Номер	стадии			
$^{aPu}oxoG/C_{12}$	1		-6,4	$-2,8 \pm 0,7$	$11,2 \pm 2,4$
	2		-0,2	$2,1 \pm 0,9$	$7,7 \pm 3,3$
	3		-1,8	$23,2 \pm 7,8$	$85,4 \pm 26,6$
	$\sum_{i=1}^{i=3}$		-8,4	$22,5 \pm 9,4$	$104,3 \pm 32,3$
	4		19,6	$18,6 \pm 1,1$	$-3,5 \pm 3,9$
$^{aPu}G/C_{12}$	5		21,0	$13,0 \pm 1,9$	$-27,0 \pm 6,7$
	1		-7,7	$-2,4 \pm 0,2$	$18,0 \pm 0,7$
	2		0,8	$-12,7 \pm 1,2$	$-44,7 \pm 4,1$
	$\sum_{i=1}^{i=2}$		-6,9	$-15,1 \pm 1,4$	$-26,7 \pm 4,8$

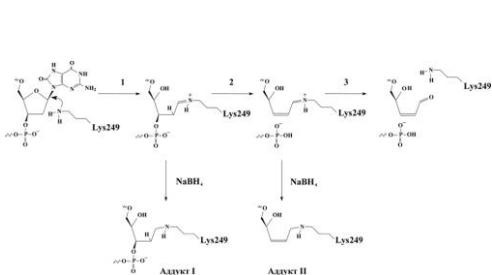


Рис. 12. Основные стадии реакции, катализируемые hOGG1: стадия 1 – удаление поврежденного основания (реакция гидролиза N-гликозидной связи), стадия 2 – реакция β-элиминирования 3'-фосфатной группы, стадия 3 – регенерация свободного фермента. Показаны стабильные ковалентные аддукты, образующиеся после восстановления основания Шиффа NaBH₄.

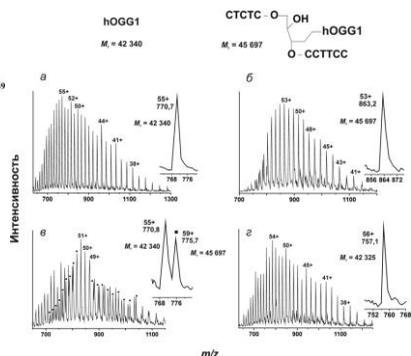


Рис. 13. MS/ESI-спектры интермедиатов, образующихся в процессе взаимодействия фермента hOGG1 и oxoG/C₁₂-субстрата при t = 0, 30, 600 и 1000 с (a – d соответственно).

Механизм расщепления поврежденной ДНК включает последовательное образование ковалентных промежуточных комплексов фермента и ДНК в виде основания Шиффа (рис. 12). Чтобы определить характерные времена образования и исчезновения этих промежуточных продуктов, проводился MS/ESI масс-спектрометрический анализ реакционной смеси через определенные промежутки времени (рис. 13), при этом для восстановления основания Шиффа в реакционную смесь добавляли NaBH₄ через 0–1000 с после начала реакции.

Масс-спектр свободного фермента hOGG1 содержал набор положительно заряженных ионных пиков, которые соответствовали молекулярному весу немодифицированного белка (42340 Да) (рис. 13a). В течение первых 30 с протекает N-гликозилазная реакция и образуется аддукт I (рис. 13б). Аддукт II, соответствующий ковалентному комплексу с ДНК после реакции β-элиминирования 3'-фосфатной группы, зарегистрировать не удалось. В масс-спектрах (рис. 13в-г) видна медленная регенерация свободного фермента из комплекса, соответствующего аддукту I. Полученные данные подтверждают, что скорость-лимитирующей стадией является реакция β-элиминирования.

Совокупный анализ масс-спектрометрических данных, термодинамических параметров и данных мутационного анализа, полученных при взаимодействии с поврежденной и неповрежденной ДНК, позволяет заключить, что первой стадией взаимодействия является образование неспецифического комплекса, сопровождающееся «плавлением» цепей ДНК-дуплекса, что следует из эффекта возрастания интенсивности флуоресценции aPc. Более того, рентгеноструктурный анализ свидетельствует о частичном выворачивании неповрежденного основания из спирали в таком неспецифическом комплексе.

Эта стадия имеет близкие значения термодинамических параметров как для поврежденной, так и неповрежденной ДНК и характеризуется энергетически выгодными изменениями энтальпии и энтропии. На этой стадии происходит

сканирование ДНК на наличие повреждения путем вставки в двойную спираль ДНК так называемого «клина», в роли которого выступает Tug203. Кроме того, показано, что обе замены Arg154Ala и Arg204Ala приводят к значительному снижению активности фермента за счет потери способности нарушать локальную структуру дуплекса, что свидетельствует об их непосредственном участии на этой стадии взаимодействия. Кинетические данные свидетельствуют о том, что каталитическая аминокислота Lys249 также участвует в процессе разрыхления дуплекса и выворачивания ohoGua за счет электростатических взаимодействий с фосфатными группами нуклеотида, а также на этой стадии важны контакты с His270.

Вторая стадия узнавания повреждения является энергетически нейтральной и проигрыш энthalпии компенсируется ростом энтропии. На этой стадии образуется связь между His270 и фосфатной группой поврежденного нуклеотида, что способствует сдвигу ohoGua в активный центр фермента, в котором он образует стэкинг с Phe319. Кроме того, на этой стадии происходит внедрение Arg154, Arg204 и Asn149 внутрь спирали ДНК. В случае неповрежденного дуплекса эта стадия отсутствует, следовательно, эта стадия очень важна для дискриминации поврежденного и неповрежденного оснований.

Последняя третья стадия узнавания приводит к формированию каталитически компетентной конформации hOGG1. На этой стадии основание ohoGua полностью находится внутри активного центра, в котором происходят локальные перегруппировки, необходимые для осуществления гидролиза N-гликозидной связи. При этом формирование каталитического комплекса характеризуется большой эндотермичностью за счет изменения энthalпии, которая компенсируется существенным ростом энтропии. Увеличение энтропии при взаимодействии ДНК-связывающих белков с ДНК, как правило, обусловлено двумя факторами: десольватацией полярных групп в области контакта белок-ДНК и вытеснением высокоупорядоченных «кристаллических» молекул воды из бороздок ДНК. Соответственно, образование каталитически компетентного состояния требует дегидратации области контакта белок-ДНК и образования более компактного фермент-субстратного комплекса. После этого происходят каталитические стадии ферментативного процесса, и диссоциация комплекса фермент-продукт завершает ферментативный цикл.

2.2. Другие представители структурного семейства HhH-GPD: MutY, MBD4 и Nth

Ферменты, входящие в структурное семейство HhH-GPD, имеют значительные отличия как по размеру, так и по общей компоновке глобулы белка. Такие отличия связаны, в том числе, со специфическими функциями этих ферментов. Например, *аденин-ДНК-гликозилаза MutY* обладает уникальной специфичностью по отношению к ohoG/A-паре и образует развитую сеть контактов с обеими цепями ДНК и при этом гидролизует N-гликозидную связь с неповрежденным основанием

аденином, расположенным напротив охoG. Более того, удаление аденина из пары G/A проходит примерно в 10 раз менее эффективно, что подтверждает высокую эффективность дискриминации специфического сайта. Кинетику процесса взаимодействия с модельными ДНК-субстратами и лигандами регистрировали по изменению интенсивности остатков Tgr и остатка флуоресцеина в ДНК. Показано, что при образовании первичного комплекса происходит формирование неспецифических контактов между ДНК-связывающим центром фермента и ДНК-дуплексом. На второй стадии взаимодействия MutY с ДНК-субстратом происходит дискриминация оснований Gua и охoGua, расположенных напротив аденина, а также узнавание самого аденина и образование каталитического комплекса.

Другой представитель структурного семейства HhH-GPD – *метилцитозин-связывающий домен 4 человека MBD4* содержит N-гликозилазный каталитический домен, взаимодействующий, в основном, с поврежденной цепью ДНК, и удаляет урацил. Для анализа конформационных превращений в ходе ферментативного процесса был проведен скрининг модельных субстратов, содержащих различные флуорофоры, включая новые. Показано, что не во всех случаях флуорофоры имеют достаточную чувствительность к изменениям структуры дуплекса, индуцируемым ферментом. В качестве наиболее чувствительных флуоресцентных маркеров ферментативного процесса были отобраны остатки Tgr, aPu и FRET-пара FAM/BNQ1. При использовании флуоресцентно меченых субстратов было показано, что в первичном комплексе происходит изгибание ДНК-дуплекса и его локальное плавление. В последующий момент времени происходит выворачивание поврежденного нуклеотида из дуплекса и встраивание аминокислотных остатков Arg468 и Leu508 в образовавшуюся полость. Образуется каталитический комплекс, в котором происходит гидролиз связи с урацилом и последующая диссоциация комплекса с продуктом.

Еще один представитель этого семейства – *эндонуклеаза III Nth* из *E.coli* отвечает за удаление окисленных и восстановленных пиримидиновых оснований, например, 5,6-дигидроурацила. Несмотря на то, что Nth содержит два остатка Tgr, конформационные изменения фермента в процессе взаимодействия с ДНК зарегистрировать не удалось. Для регистрации конформационных превращений ДНК был проведен скрининг флуорофоров и их местоположения. Были выбраны и использованы наиболее флуоресцентно-чувствительные модельные системы X^{aPu}/G ($X = DHU, AP$ и F) и X/tC^O ($X = DHU, AP, F$ и G), которые содержали различные модифицированные нуклеотиды, к которым Nth имеет разную специфичность. Совокупный анализ полученных данных показал, что ДНК претерпевает множественные конформационные превращения в процессе образования фермент-субстратного комплекса. Уменьшение интенсивности флуоресценции нового флуорофора tC^O и рост для aPu на начальном участке кинетических кривых характеризует дестабилизацию двойной спирали, которая может происходить за счет локального плавления, изгибания дуплекса или вставки остатка Leu81 и попытке выворачивания поврежденного нуклеотида из дуплекса.

Затем переход аРи в гидрофобное окружение, сопровождающийся уменьшением интенсивности флуоресценции, свидетельствует о встраивании аминокислотного остатка активного центра в двойную спираль, которое происходит после полного выворачивания поврежденного нуклеотида. Согласно рентгеноструктурным данным таким аминокислотным остатком является Gln41. Происходит подстройка активного центра и образование каталитически компетентного состояния, каталитические стадии и диссоциация комплекса фермент-продукт.

2.3. Общая модель узнавания повреждения ферментами структурного семейства HhH-GPD

В случае всех ферментов этого семейства для использованных вариантов ДНК-субстратов и ДНК-лигандов получены концентрационные серии, установлены кинетические схемы взаимодействия и рассчитаны значения констант скорости, входящие в эти схемы. Проведенный анализ кинетических данных показывает, что, как и для hOGG1, у ферментов MutY, MBD4 и Nth образование каталитически компетентного комплекса протекает через последовательность стадий, сопровождающихся изменением конформации молекул белка и ДНК. Взаимодействие можно разбить на два ключевых этапа: этап первичного неспецифического связывания, который также происходит при взаимодействии с неповрежденной ДНК, и на этап образования специфических контактов и узнавания повреждения (табл. 5).

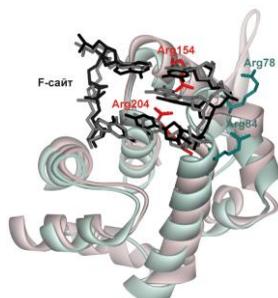
Таблица 5. Ключевые этапы узнавания повреждения ферментами структурного семейства HhH-GPD

		hOGG1	Nth (<i>B.st.</i>)	MBD4	MutY (<i>E.coli</i>)
Первичное связывание	Дестабилизация двойной спирали	Arg154, Arg204	Arg78, Arg84	Arg468	Arg50, Arg91
	Встраивание «сенсора»	Tyr203	Leu82	Leu508	Tyr88
Специфическое узнавание	Полное выворачивание поврежденного основания	+	+	+	+
	Встраивание аминокислотных остатков	Asn149	Gln42	--	Gln48

На этапе неспецифического связывания происходит образование водородных связей между остатками аргининов (Arg154 и Arg204 у hOGG1, Arg78 и Arg84 у Nth и, возможно, Arg468 у MBD4) и нуклеотидом, расположенным в комплементарной цепи напротив удаляемого основания, что приводит к дестабилизации Уотсон-Криковских водородных связей в поврежденном участке ДНК-дуплекса. Необходимо отметить, что остатки аргининов у разных ферментов расположены по-разному, например, при сравнении структур hOGG1 и Nth видно (рис. 14а), что это структурно не гомологичные остатки, но, тем не менее, эти остатки могут выполнять одну и ту же функцию по дестабилизации поврежденного участка двойной спирали. Кроме того, на этом этапе происходит вклинивание аминокислотного остатка-сенсора (Tyr203 у hOGG1, Leu81 у Nth, Tyr88 у MutY и, возможно, Leu508 у MBD4) в дестабилизированный остатками аргинина дуплекс

ДНК. На примере hOGG1/Nth видно (рис. 14б), что это гомологичные остатки. Вклинивание аминокислоты приводит к частичному выворачиванию поврежденного основания из цепи ДНК. Такое частичное выворачивание в так называемый экзо-сайт фермента было зарегистрировано кристаллографически для hOGG1 (PDB ID 1YQK). Показано, что у hOGG1 частично вывернутое основание образует контакты с His270 и Lys249 (Lys120 у Nth).

а



б

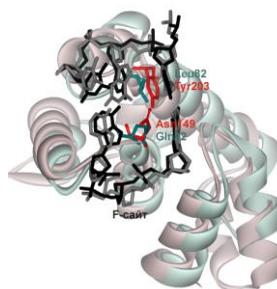


Рис. 14. Сравнение пространственной структуры ДНК-связывающих центров hOGG1 (розовый, PDB ID 1FN7) и Nth из *G. Stearothermophilus* (зеленоватый, PDB ID 1P59) с ДНК, содержащей F-сайт. (а) Остатки аргинина, взаимодействующие с фосфатными группами комплементарной цепи ДНК. Arg154 и Arg204 в hOGG1 выделены красным цветом, Arg78 и Arg84 в Nth выделены зеленым цветом. (б) Пространственное соответствие остатков Tyr203 и Gln149 (красный) в hOGG1 и остатков Leu82 и Gln42 (зеленый) в Nth.

На этапе специфического связывания в случае hOGG1 происходит полное выворачивание ohoGua в карман активного центра фермента с образованием стэкинга с ароматическим кольцом Phe319, окончательное формирование контактов между аминокислотными остатками Arg154, Arg204 и Asn149, которые встраиваются в дуплекс, и основанием Cyt. У Nth в роли этих остатков выступают Arg78, Arg84 и Gln41, а у MutY – Gln48 и, возможно, Arg50 и Arg91. Известные структуры каталитического домена MBD4 не позволяют выявить аминокислотный остаток, выполняющий функцию Asn или Gln у других представителей семейства HhN-GPD. Полное встраивание этих остатков в двойную спираль ДНК сопровождается окончательной подстройкой конформации фермент-субстратного комплекса для достижения каталитически компетентного состояния.

3. Конформационные изменения ДНК-гликозилаз структурного семейства H2tH и ДНК в процессе их взаимодействия

3.1. Эндонуклеаза VIII Nei

Эндонуклеаза VIII Nei является одной из основных ДНК-гликозилаз в прокариотических клетках, удаляющих широкий набор окисленных или восстановленных пиримидиновых оснований (рис. 15). Анализ рентгеноструктурных данных (Zharkov *et al.*, 2002) показал, что в фермент-субстратном комплексе происходит закрытие N- и C-концевых доменов фермента, изгибание рибозо-фосфатного остова ДНК, поврежденное основание

выворачивается из дуплекса и располагается в активном центре фермента, а в образовавшуюся полость встраивается триада аминокислотных остатков Gln69, Leu70 и Tyr71 (рис. 16а).

Фермент Nei содержит 4 остатка Трп (рис. 16б) с помощью которых ранее (Kuznetsov *et al.*, 2012) были зарегистрированы конформационные изменения фермента в процессе связывания ДНК. Предложена схема 2, согласно которой на первой стадии происходит первичное связывание ДНК. А изгибание, выворачивание поврежденного основания, встраивание триады аминокислотных остатков и образование каталитически компетентного состояния должны происходить в ходе второй и третьей стадии. Для определения природы процессов, происходящих на этих стадиях, в рамках диссертационной работы были зарегистрированы конформационные изменения ДНК.

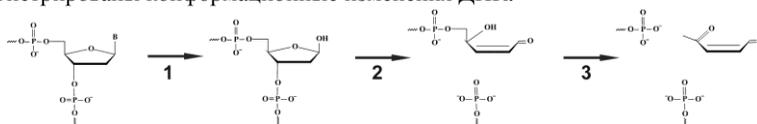


Рис. 15. Химические стадии процесса катализа Nei. Стадия 1: гидролиз N-гликозидной связи и удаление поврежденного основания с образованием AP-сайта; стадия 2: β-элиминирование 3'-фосфатной группы; стадия 3: β-элиминирование 5'-фосфатной группы.

Анализ структуры активного центра показал (рис. 16в), что основание, расположенное с 5'-стороны от поврежденного нуклеотида, сближено с остатком Leu70, а основание, расположенное напротив поврежденного нуклеотида образует контакты с Gln69 и Tyr71. Поэтому в качестве перспективных субстратов использовали дуплексы, содержащие флуоресцентный краситель с 5'-стороны (^XDHU/G₁₂, X = aPu, C^{Py}, ЗНС) либо напротив (DHU/N₁₂, N = aPu, C^{Py}, ЗНС, tC^O) поврежденного основания DHU.

а

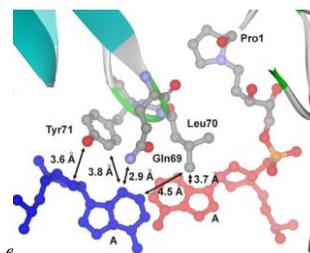
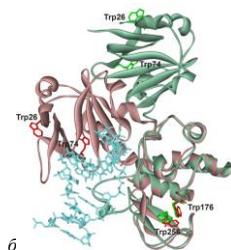
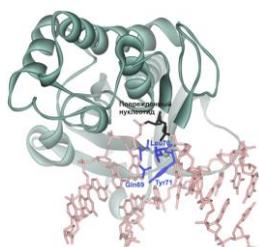
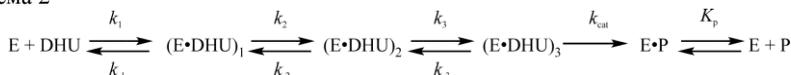


Рис. 16. Схематическое изображение пространственной структуры комплекса Nei с ДНК. (а) Структура ковалентного комплекса фермента Nei с дуплексом ДНК, содержащим AP-сайт (PDB ID 1K3W). (б) Функционально важные аминокислотные остатки, участвующие в образовании специфических контактов между ферментом и ДНК.

Схема 2



E – Nei; DHU – DHU-субстрат; (E·DHU)_i – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания 5,6-дигидроурацила; E·P – комплекс E с продуктом реакции P; k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных реакций отдельных стадий.

Такой скрининг флуорофоров показал, что, аРи не обладает чувствительностью к процессам, проходящим на стадиях образования комплекса с ферментом. Было показано, что С^{Рy} и ЗНС в модельной системе ^XDHU/G₁₂ приводят к полной потере каталитической активности фермента. Поэтому в работе использовали модельную систему DHU/N₁₂, которая в значительно меньшей степени оказывала влияние на каталитическую активность фермента. Для всех флуорофоров, кроме аРи, для которого изменений зарегистрировано не было (рис. 17), получены концентрационные серии кинетических кривых, определены кинетические схемы и константы скорости. На рис. 17 приведены примеры кинетических кривых, полученных при использовании различных флуорофоров в модельной системе DHU/N₁₂.

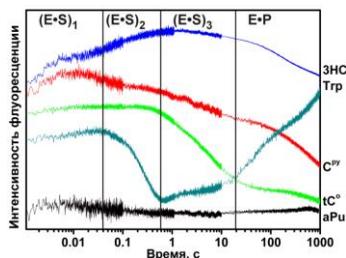


Рис. 17. Взаимодействие Nei с DHU-субстратами, содержащими напротив основания DHU флуоресцентные аналоги оснований аРи, С^{Рy}, iС^О и ЗНС. Вертикальные линии ограничивают временные диапазоны конформационных изменений фермента, соответствующие кинетическим стадиям в схеме 2.

Регистрация флуоресценции Тгр и флуорофоров в ДНК позволила выявить сопряженную конформационную динамику фермента и ДНК в ходе ферментативного процесса и детализировать природу стадий узнавания повреждения. Начальный рост интенсивности флуоресценции Тгр, а также начальное увеличение интенсивности флуоресценции ЗНС до 6 мс, вероятно, характеризуют быстрый процесс «закрытия» N- и С-доменов фермента при образовании первичного неспецифического комплекса. Сравнение кинетических кривых показывает, что за время первого изменения интенсивности флуоресценции Тгр (до 0,6 с) протекают два конформационных изменения ДНК, зарегистрированных по ЗНС (плато от 0,006 до 0,02 с и увеличения интенсивности до 1,0 с). Эти фазы кинетики флуоресценции ЗНС могут отражать изгибание спирали ДНК, выворачивание из спирали основания DHU и последующую вставку аминокислотных остатков Gln69, Leu70 и Tyr71 в спираль ДНК, поскольку эти процессы приводят к увеличению гидрофобности среды вблизи остатка ЗНС. Следующий рост интенсивности флуоресценции Тгр (в интервале времени от 1 до 10 с) приводит к незначительному изменению флуоресценции ЗНС. В этом интервале времени происходит подстройка структуры активного центра, необходимая для достижения каталитически компетентного состояния. Последнее изменение интенсивностей флуоресценции Тгр и ЗНС на временах более 10 с является результатом каталитических стадий и диссоциации комплекса фермент-продукт, которые приводят к появлению более гидратированного окружения ЗНС в ДНК-продукте.

С целью определения функциональной роли ряда аминокислот и дальнейшего уточнения природы специфических стадий связывания ДНК использовали ряд

мутантных форм фермента. Для замены были выбраны аминокислотные остатки Leu70, Tyr71, встраивающиеся в дуплекс; остатки Phe121, Phe230 и Pro253, расположенные в ДНК-связывающем центре; и остаток Glu2, необходимый для осуществления каталитической реакции. Методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные формы Nei, содержащие замены Glu2Gln, Leu70Ser, Leu70Trp, Tyr71Trp, Phe121Trp, Phe230Trp и Pro253Trp. Проверка относительной активности мутантных форм показала, что замена Glu2 и Leu70 приводит к значительной потере каталитической активности (рис. 18а). Изменения интенсивности флуоресценции Trp, характеризующие конформационные перестройки фермента, были зарегистрированы при взаимодействии мутантных форм с DHU/G₁₂- и AP/G₁₂-субстратами (рис. 18б и в). Замены Glu2 и Leu70, инактивирующие ферментативную активность, одновременно приводили к практически полной потере каких-либо изменений интенсивности флуоресценции Trp. Это свидетельствует о том, что амплитуда изменений интенсивности флуоресценции Trp связана с протеканием каталитических стадий ферментативного процесса.

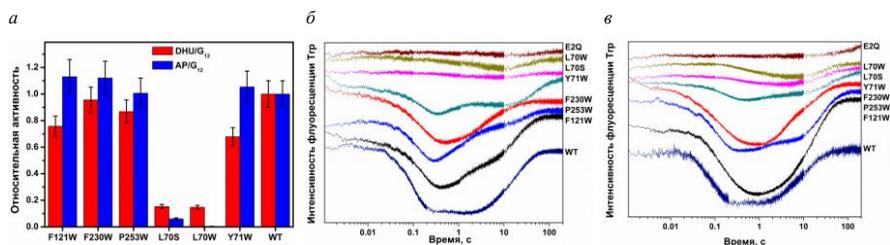


Рис. 18. (а) Относительная активность Nei WT и мутантных форм фермента. Экспериментальные кинетические кривые, характеризующие конформационные изменения фермента в процессе взаимодействия Nei дикого типа и мутантных форм с (б) DHU/G₁₂- и (в) AP/G₁₂-субстратами.

Для мутантных форм Nei Tyr71Trp, Nei Phe121Trp, Nei Phe230Trp и Nei Pro253Trp, сохранивших ферментативную активность, наблюдается различное поведение интенсивности флуоресценции Trp на начальном участке кинетических кривых до 5 с, который характеризует стадии узнавания повреждения и образования каталитического комплекса. Такие различия с формой кривой для фермента дикого типа свидетельствуют о вкладе в интенсивность флуоресценции нового остатка Trp и позволяют сделать заключение о наличии конформационных изменений фермента в области данной конкретной аминокислоты и установить момент времени и стадию в механизме, на которой эта аминокислота принимает участие. Для расчета констант скорости для каждой мутантной формы были получены концентрационные серии кинетических кривых (табл. 6).

Таблица 6. Константы скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие Nei дикого типа и мутантных форм с DHU/G₁₂-субстратом

Константы	L70S	L70W	Y71W	F121W	F230W	P253W	WT ^a
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$(0,09 \pm 0,02) \times 10^6$	$(0,06 \pm 0,01) \times 10^6$	$(21 \pm 3) \times 10^5$	$(39 \pm 11) \times 10^6$	$(30 \pm 2) \times 10^6$	$(27 \pm 2) \times 10^6$	$(36 \pm 7) \times 10^6$
k_{-1}, c^{-1}	$1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	330 ± 30	120 ± 31	310 ± 45	310 ± 26	410 ± 20
K_1^b, M^{-1}	$0,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$0,63 \times 10^5$	3×10^5	$0,97 \times 10^5$	$0,87 \times 10^5$	$0,88 \times 10^5$
k_2, c^{-1}			16 ± 3	17 ± 4	21 ± 3	23 ± 3	27 ± 2
k_{-2}, c^{-1}			$2,5 \pm 0,1$	$0,55 \pm 0,25$	$1,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$
K_2			$6,4$	31	$17,5$	$28,7$	15
k_3, c^{-1}			$0,4 \pm 0,1$	$0,58 \pm 0,15$	$0,82 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,03$	$1,6 \pm 0,1$
k_{-3}, c^{-1}			$1,1 \pm 0,1$	$0,89 \pm 0,14$	$0,66 \pm 0,06$	$1,2 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$
K_3			$0,36$	$0,65$	$1,2$	$0,83$	$1,1$
K_{ass}^c, M^{-1}			$1,45 \times 10^5$	6×10^6	2×10^6	2×10^6	$1,45 \times 10^6$
k_{cat}, c^{-1}	$0,09 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,02$
Kp, M	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(0,7 \pm 0,5) \times 10^{-6}$	$(0,4 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(0,6 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	$(0,63 \pm 0,08) \times 10^{-6}$	$(0,7 \pm 0,1) \times 10^{-6}$

^a Данные работы Kuznetsov *et al.*, 2012, ^b $K_1 = k_1/k_{-1}$, i – номер стадии, ^c $K_{ass} = K_1 \times K_2 \times K_3$.

Таблица 7. Термодинамические параметры взаимодействия ДНК-гликозилазы Fpg с G/C^{Py}₁₂- и F/C^{Py}₁₂-лигандами и oxoG/C^{Py}₁₂-субстратом

ДНК	Параметр Номер стадии	ΔG°_{i298} , ккал/моль	ΔH°_i , ккал/моль	ΔS°_i , кал/(К×моль)	Процесс
G/C ^{Py} ₁₂	1	-7,0	-3,8 ± 0,9	10,9 ± 3,2	Неспецифическое связывание, локальное «плавление» участка спирали ДНК, дегидратация
	1	-7,2	-4,0 ± 0,3	10,8 ± 1,0	Неспецифическое связывание, локальное «плавление» участка спирали ДНК, дегидратация
F/C ^{Py} ₁₂	2	0,7	6,7 ± 0,3	20,3 ± 0,9	Изгибание цепи ДНК и вставка внутрь цепи остатков аминокислот Fpg
	$\sum_{i=1}^{i=2}$	-6,5	2,7 ± 0,4	31,1 ± 1,3	
oxoG/C ^{Py} ₁₂	1	-7,0	-3,2 ± 0,4	12,7 ± 1,5	Неспецифическое связывание, локальное «плавление» участка спирали ДНК, дегидратация
	2	0,4	0,3 ± 0,8	-0,3 ± 2,7	Вставка в спираль ДНК «клина» – остатка аминокислоты Phe110 с целью дискриминации поврежденного и неповрежденного участков ДНК
	3	0,8	6,3 ± 1,7	18,4 ± 5,8	Изгибание цепи ДНК
	4	-1,5	-15,5 ± 3,9	-46,9 ± 13,5	Выворачивание основания oxoGua в активный центр Fpg одновременно с вставкой аминокислот Arg108 и Met73 в освободившуюся полость в спирали ДНК
	5	-1,9	31,2 ± 5,5	111,1 ± 18,6	Окончательная подстройка активного центра к структуре каталитически компетентного состояния, дегидратация бороздок ДНК
	$\sum_{i=1}^{i=5}$	-9,2	19,1 ± 12,3	95,0 ± 42,1	
	6	19,6	6,0 ± 1,4	-45,5 ± 4,7	Переходное состояние каталитической химической стадии
7	-7,0	-4,1 ± 0,3	9,6 ± 0,9	Образование комплекса фермент-продукт	

Ошибка определения ± 1 ст. отклонение. $\Delta \Delta G^{\circ}_{i298} = RT(\Delta K_i/K_i) \leq 0,1$ ккал/моль.

Совокупность полученных данных, характеризующих конформационные изменения фермента и ДНК-субстратов, а также мутационный анализ позволили предложить молекулярно-кинетический механизм узнавания повреждения ферментом Nei, в котором стадия (1) соответствует быстрому первоначальному связыванию ДНК и образованию неспецифического фермент-субстратного комплекса, в котором N- и C-домены фермента находятся в закрытом положении. В этом комплексе происходит вклинивание остатка Leu70 в дуплекс, которое является ключевым процессом в поиске поврежденного участка ДНК. Стадия (2) включает изгиб двойной спирали в месте поврежденного основания, выворачивание DHU из дуплекса и встраивание Tug71 в ДНК. Остаток Tug71 необходим для стабилизации вывернутой конформации поврежденного нуклеотида. Кроме того, на стадии (3) в процессе подстройки активного центра для достижения каталитически-компетентного состояния остаток Tug71 также принимает участие. На этой стадии образуются контакты между Phe121 и рибозо-фосфатным остовом ДНК. Формирование каталитического комплекса приводит к гидролизу N-гликозидной связи и последующей реакции β-элиминирования 3'- и 5'-фосфатных групп. Завершает ферментативный цикл диссоциация комплекса фермент-продукт.

3.2. Другие представители структурного семейства H2tH: Fpg и NEIL1

Формамидопиримидин-ДНК-гликозилаза Fpg имеет широкую субстратную специфичность по отношению к окисленным азотистым основаниям, в том числе охoGua. Молекула белка имеет положительно заряженный канал, в котором происходит связывание ДНК. В каталитическом комплексе ДНК изогнута, поврежденное основание вывернуто из дуплекса, и это свободное пространство заполняется аминокислотными остатками Met73, Arg108 и Phe110.

В работе проведен анализ накопления продуктов реакции, начиная с миллисекундного диапазона времени методом «прерывания реакции» (quench-flow) (Kuznetsov *et al.*, 2009). Полученные данные свидетельствуют о существовании стадии фермент-субстратного взаимодействия, после протекания которой добавление в реакционную смесь «тушителя» (7 М мочевины) не влияет на достижение каталитической конформации, то есть диссоциация комплекса фермент-субстрат происходит медленнее внутримолекулярных конформационных перестроек, ведущих к образованию каталитически компетентного состояния и протеканию химических стадий. Согласно полученным данным такой стадией является выворачивание поврежденного основания.

Методом двойного электрон-электронного резонанса определен угол изгиба ДНК-дуплексов, вызванный как самим поврежденным нуклеотидом, так и индуцированный образованием комплекса с Fpg (Kuznetsov *et al.*, 2009 и 2011). Показано, что присутствие F-сайта в дуплексе приводит к его изгибу примерно на 20°, в то время как нуклеотид, содержащий поврежденное основание охoGua, не влияет на общую структуру дуплекса. Кроме того, в равновесных условиях

показано, что Fpg приводит к дополнительному изгибанию ДНК-дуплекса, содержащего F-сайт, и индуцирует изгиб неповрежденной ДНК при образовании неспецифического комплекса.

Проведен масс-спектрометрический анализ ковалентных интермедиатов реакции, как это было сделано для hOGG1. Показано, что стадия распада ковалентного комплекса с остатком рибозы является скоростью-лимитирующей стадией всего ферментативного процесса.

Кинетические закономерности катализа Fpg при разных температурах были изучены при взаимодействии с неповрежденной ДНК и с дуплексами, содержащими F-сайт и ohoG. Регистрацию конформационных изменений ДНК проводили по изменению интенсивности флуоресценции остатка C^{Py}, расположенного напротив специфического сайта. Используя аналогичный подход, как и в случае с hOGG1, для каждой температуры получены концентрационные серии кривых и константы скорости, что позволило рассчитать термодинамические параметры стадий ферментативного процесса по уравнениям Вант-Гоффа (9) и Эйринга (10).

Совокупный анализ кинетических и термодинамических данных о конформационных превращениях фермента Fpg и ДНК, протекающих в ходе их взаимодействия, позволил предложить наиболее вероятную интерпретацию природы конформационных переходов, протекающих в составе фермент-субстратного комплекса на пути превращения в каталитически компетентное состояние (табл. 7). Необходимо отметить, что в целом стадии связывания ДНК и узнавания повреждения протекают со значительными затратами энтальпии, однако это компенсируется увеличением энтропии за счет удаления молекул воды из области контакта и формирования прочносвязанного фермент-субстратного комплекса. При этом дегидратация области контакта белок-ДНК начинается на стадии образования первичного неспецифического комплекса.

Эндонуклеаза VIII человека NEIL1 является эукариотическим представителем данного структурного семейства. Сравнение известной в настоящее время структуры свободного фермента NEIL1 (Doublie *et al.*, 2004) со структурами комплексов Fpg и Nei с поврежденной ДНК показывает высокую степень структурного соответствия. Сравнение аминокислотных последовательностей NEIL1, Fpg и Nei также показывает высокую степень гомологии ферментов. На фрагменте последовательностей (рис. 19) показано, что организация аминокислотных остатков, которые встраиваются в ДНК после выворачивания поврежденного нуклеотида у NEIL1 такая же, как у Fpg, то есть эти остатки расположены удаленно друг от друга в аминокислотной последовательности в отличие от Nei.

Высокая гомология структуры NEIL1, Fpg и Nei позволяет предположить, что NEIL1 в процессе образования каталитического комплекса аналогичным образом претерпевает конформационные перестройки, связанные с узнаванием поврежденного нуклеотида, изгибанием ДНК, выворачиванием поврежденного

основания в активный центр фермента и встраиванием аминокислотных остатков в ДНК. Поэтому для регистрации взаимных конформационных изменений NEIL1 и ДНК в процессе их взаимодействия был использован такой же подход, как в случаях Nei и Fpg. В качестве ДНК-субстратов для регистрации конформационных изменений фермента по изменению интенсивности флуоресценции Trp использовали серию дуплексов, которые в центральной части содержали неповрежденный нуклеотид (G/C₁₂) либо модифицированные нуклеотиды (X/G₁₂, где X = F-сайт, AP-сайт или DHU). Сравнение кинетических кривых для ферментов данного семейства, полученных в одинаковых условиях, выявило значительные отличия в кинетике изменения интенсивности флуоресценции Trp. То есть, несмотря на одинаковые структурные закономерности образования каталитического комплекса и высокую гомологию, изменения интенсивности флуоресценции Trp в каждом случае определяются индивидуальными особенностями расположения остатков Trp в глобуле фермента. Тем не менее, общей особенностью всех кинетических кривых является локальный минимум интенсивности флуоресценции Trp в процессе образования каталитического комплекса при взаимодействии с «расщепляемыми» ДНК-дуплексами, содержащими AP-сайт и DHU.

NEIL1	RGKELRLILSPFGAQPQOEPLALVFRFGMSGSFQLVPREELPRHAHLRFYTAPPGPRLA	111
Fpg	RAKYLLE-----LPEGWII-IHLGMSGSLRILPEELPPEKHDH--VDLVMNGKV	102
Nei	RGKALLTH-----FSNDLTLYSHNQLYGVWRVVDTSEEPQTTRVLRVKLQTADKTI	101
	*. * * : : : : * : : . *	
NEIL1	LCFVDIRRFGRWDLGGKW----QPGRGPCVLQEQYQQFRENVL--RNLADKAFDRPICEA	164
Fpg	LRYTDPRRFGAWLWTKLEGHNVLTHLGPEPLSD--FNGEYLHQCAK---KKTAIKPW	157
Nei	LLYSASD--TEMLRPEQLTTHFFLQRVGPDVLDPN--LTPEVVKERLLSPFRNRQFAGL	157
	* : : : ** * . : : : . :	

Рис. 19. Сравнение фрагментов последовательностей NEIL1, Fpg и Nei. Аминокислотные остатки, встраивающиеся в ДНК, выделены красным.

Для регистрации конформационных изменений ДНК использовали ДНК-дуплексы (X^{FAM/ВНQ1}/G₁₇, где X = C, F-сайт, AP-сайт или DHU), содержащие красители FAM и ВНQ1 на 5'-концах олигонуклеотидов, формирующих дуплекс. Были зарегистрированы стадии изгибания ДНК и катализа, установлены кинетические схемы и рассчитаны константы.

3.3. Общая модель узнавания повреждения ферментами структурного семейства H2tH

Суммируя данные по этому классу ферментов, можно отметить, что процесс узнавания поврежденного нуклеотида имеет общую модель для изученных про- и эукариотических членов (табл. 8). На первой стадии происходит образование первичного неспецифического комплекса между ферментом и ДНК-субстратом, сопровождающееся дестабилизацией дуплекса и его локальным «плавлением». В неспецифическом комплексе происходит вклинивание между основаниями ДНК аминокислоты-сensors (Phe110 у Fpg, Leu70 у Nei, Phe119 у NEIL1), приводящее к дополнительной дестабилизации двойной спирали. Вклинивание «сensors» в

дуплекс инициирует выворачивание поврежденного основания в активный центр фермента. Сравнение кинетических кривых, полученных с использованием FRET-субстратов, показывает, что изгибание дуплекса и встраивание остальных остатков триады в ДНК (Met73 и Arg108 у Fpg, Gln69 и Tyr71 у Nei, Met80

Таблица 8. Ключевые этапы узнавания повреждения ферментами структурного семейства H2tH

	Nei (<i>E.coli</i>)	Fpg (<i>E.coli</i>)	NEIL1
Дестабилизация двойной спирали, локальное «плавление»	+	+	+
Встраивание «сенсора»	Leu70	Phe110	Phe119
Выворачивание поврежденного основания и изгибание дуплекса	+	+	+
Встраивание аминокислотных остатков	Gln69, Tyr71	Met78, Arg108	Met80, Arg117

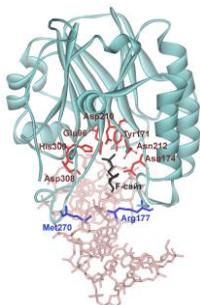
и Arg117 у NEIL1), стабилизирующих внеспиральное положение повреждения, происходит согласованно. На последней стадии происходит подстройка структуры фермент-субстратного комплекса для достижения каталитически компетентного состояния. Согласно термодинамическим данным, полученным для Fpg, на этой стадии происходит компактизация фермент-субстратного комплекса и вытеснение молекул воды из области контакта фермента и ДНК-субстрата. Затем проходят химические стадии процесса и последующая диссоциация комплекса фермента с продуктом.

4. AP-эндонуклеаза человека APE1

AP-эндонуклеаза человека является Mg^{2+} -зависимым ферментом и отличается от ДНК-гликозилаз и по структуре и по каталитическим свойствам (рис. 20). Анализ кристаллических структур свободного фермента APE1 и его комплексов с ДНК показал, что аминокислотные остатки фермента взаимодействуют преимущественно с одной цепью дуплекса. В каталитическом комплексе ДНК изогнута, а AP-сайт вывернут из двойной спирали.

В рамках диссертационной работы установлено влияние одно- и двухзарядных ионов металлов и pH на связывание ДНК и катализ (рис. 21a-e). Кроме того, с использованием флуоресценции Tgr, FRET-сигнала и прямой регистрации продуктов показано (рис. 21g-e), что природа двухзарядного металла также влияет на эти процессы. Показано, что скорость образования первичного комплекса не зависит от концентрации двухзарядных металлов, однако они ускоряют вторую стадию связывания ДНК. При этом отсутствие двухзарядных ионов, а также ионы Cu^{2+} и Ca^{2+} полностью инактивируют фермент, а эффективность других ионов металлов в процессе гидролиза фосфодиэфирной связи возрастает в ряду $Zn^{2+} < Ni^{2+} < Mn^{2+} < Mg^{2+}$.

a



б

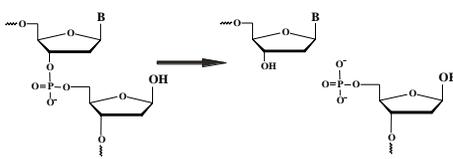


Рис. 20. (а) Структура комплекса AP-эндонуклеазы APE1 с F-субстратом (PDB ID 1DE8). (б) Гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от AP-сайта, катализируемый APE1.

Для уточнения природы процессов, происходящих на последовательных стадиях узнавания F-сайта в ДНК-субстрате, катализа и диссоциации комплекса фермента с продуктом, выполнен поэтапный термодинамический анализ взаимодействия APE1 с F/G₁₇-субстратом. Анализ кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции белка показал, что минимальный кинетический механизм взаимодействия APE1 с F/G₁₇-субстратом включает двухстадийное равновесное связывание, необратимое образование комплекса фермент-продукт и равновесную диссоциацию этого комплекса (схема 3).

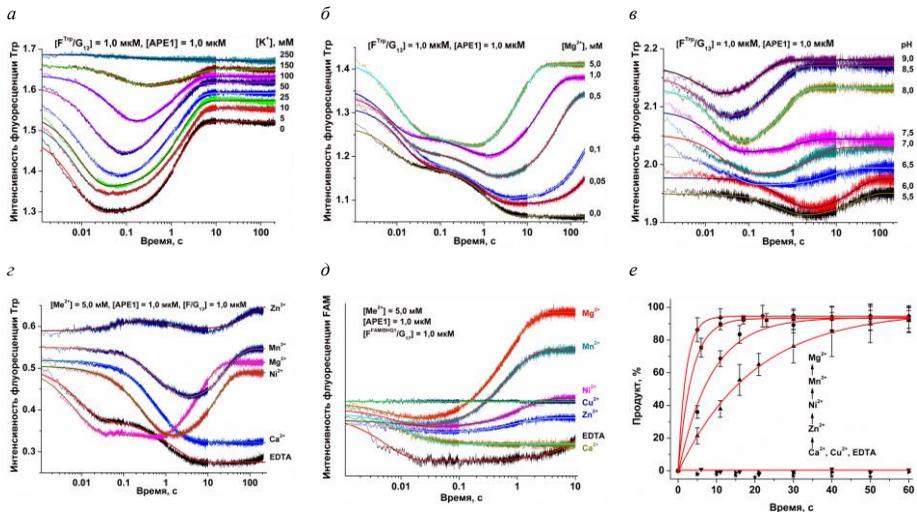
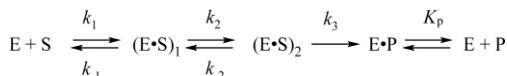


Рис. 21. Влияние ионов K⁺ (а), Mg²⁺ (б) и pH (в) на активность APE1. Влияние ионов на активность APE1 AP/G₁₂-субстратами. Влияние природы двухвалентных ионов металлов на конформационные изменения APE1 (з), ДНК-субстрата (д) и скорость накопления продуктов реакции (е).

Схема 3



E – фермент, S – ДНК-субстрат, $(E \cdot S)_1$ и $(E \cdot S)_2$ – комплексы фермента с субстратом, P – продукт превращения субстрата, $E \cdot P$ – комплекс фермента с продуктом, k_i и k_{-i} – константы скорости прямых и обратных стадий равновесных стадий, k_3 – константа скорости каталитической стадии, K_p – равновесная константа диссоциации комплекса $E \cdot P$.

Согласно полученным данным, образование первичного фермент-субстратного комплекса (первая стадия в схеме 3) характеризуется положительным изменением стандартной энтальпии (14,3 ккал/моль) и положительным изменением энтропии (79,0 кал/(моль×К)). Поскольку увеличение энтропии при взаимодействии ДНК-связывающих белков с ДНК обусловлено либо десольватацией полярных групп в области контакта белок-ДНК, либо вытеснением высокоупорядоченных «кристаллических» молекул воды из бороздок ДНК, то можно заключить, что на этой стадии происходит образование связей между аминокислотными остатками ДНК-связывающего центра и ДНК-дуплексом. Среди них можно отметить взаимодействие между фосфатными группами ДНК-дуплекса с 5'- и 3'-стороны от F-сайта и остатками Arg73, Ala74, Lys78, Trp280, Asn222, Asn226 и Asn229 (рис. 20а). Кроме того, в этот момент времени, вероятно, происходит встраивание остатка Arg177 в ДНК-дуплекс со стороны большой бороздки и образование водородной связи с фосфатной группой, расположенной с 3'-стороны от F-сайта. Остаток Met270 встраивается в ДНК-дуплекс со стороны малой бороздки и также может вытеснять «кристаллическую» воду.

Вторая стадия взаимодействия APE1 с F-субстратом, представляющая собой специфическую перегруппировку комплекса $(E \cdot S)_1$, характеризуется отрицательным значением изменения как энтальпии ($\Delta H^{\circ}_2 = -6,8$ ккал/моль), так и энтропии (-24,6 кал/(моль×К)). Отрицательное значение ΔH°_2 свидетельствует о стабилизации комплекса при образовании новых, энергетически выгодных связей между взаимодействующими атомами, а отрицательное значение ΔS°_2 – об увеличении его жесткости, т.е. об уменьшении внутренних степеней свободы. Эти результаты свидетельствуют о том, что данная стадия включает процесс выворачивания F-сайта в активный центр фермента и стабилизации этого состояния с помощью остатков Arg177 и Met270, которые встраиваются в большую и малую бороздки ДНК соответственно. Кроме того, в этот момент происходит, вероятно, образование связей между фосфатной группой, расположенной в 5'-направлении от F-сайта, остатками Asn174, Asn212 и His309 и ионом Mg^{2+} , расположенными в активном центре фермента.

Для каталитической стадии были рассчитаны значения изменений энтальпии (ΔH^{\ddagger}) и энтропии (ΔS^{\ddagger}) активации процесса образования переходного комплекса. Полученное значение для энтальпии активации равно 12,2 ккал/моль. Это значение относится к стадии гидролиза фосфодиэфирной связи ферментом APE1 и лежит в диапазоне величин 6,0–18,6 ккал/моль, полученных для каталитических стадий

реакций разрыва N-гликозидной связи и β-элиминирования фосфатных групп, осуществляемых ДНК-гликозилазами Fpg и hOGG1.

5. Практическое применение данных о молекулярно-кинетических механизмах ферментов репарации

Практическим приложением полученных данных об особенностях взаимодействия ферментов репарации с ДНК является разработка метода, позволяющего определить их активность в биологических образцах, включая лизаты клеток, содержащих небольшое количество фермента. Разработка таких методов имеет большое значение для диагностирования уровня репарационно-защитного статуса конкретного организма. Кроме того, использование высокочувствительного метода определения специфической активности востребовано для быстрого, поточного поиска низкомолекулярных соединений, оказывающих влияние на эту активность.

В рамках работы был создан ДНК-зонд $F^{FAM/Dab}/C_{12}$, использованный для определения активности APE1. Апробация данного ДНК-зонда на очищенном препарате фермента показала перспективность его использования для определения низких концентраций APE1 (до 1×10^{-10} М). Нужно отметить, что для использования ДНК-зонда в общем клеточном лизате необходимо повысить его устойчивость к неспецифическим эндо- и экзонуклеазам. Для этого были апробированы олигонуклеотиды, содержащие замены 3'-концевого мостикового атома кислорода в фосфатной группе нуклеотида, расположенного с 5'-стороны от AP-сайта, на иминогруппу NH с образованием N3'-P5'-фосфорамиды или одного из немостиковых атомов кислорода на атом серы, аминогруппу NH₂ или остаток тетраметилгуанидина (Tmg) (табл. 9).

Таблица 9. Модификации фосфатной группы, использованные в работе

Сокращенное название	Последовательность олигонуклеотида и сайт модификации
F^O , X = O, Y = O ⁻ , Z = O ⁻ F^{3N} , X = NH, Y = O ⁻ , Z = O ⁻ F^S , X = O, Y = S ⁻ , Z = O ⁻ F^{SS} , X = O, Y = S ⁻ , Z = S ⁻ F^N , X = O, Y = NH ₂ , Z = O ⁻ F^{NB} , X = O, Y = NH ₂ , Z = Tmg* F^{BB} , X = O, Y = Tmg, Z = Tmg	
G^O , Z = O G^S , Z = S ⁻ G^B , Z = Tmg	

* Tmg –тетраметилгуанидиновая группа N=C(NMe₂)₂.

Показано, что некоторые модификации, такие как тиофосфат, фосфорамид, значительно замедляют гидролиз фосфодиэфирной связи по AP-сайту, при этом сохраняя способность специфического связывания с AP-эндонуклеазой (рис. 22а и б). А очень эффективной блокировкой экзонуклеазной активности AP-эндонуклеазы является тетраметилфосфорилгуанидиновая модификация 3'-концевой межнуклеотидной фосфатной группы.

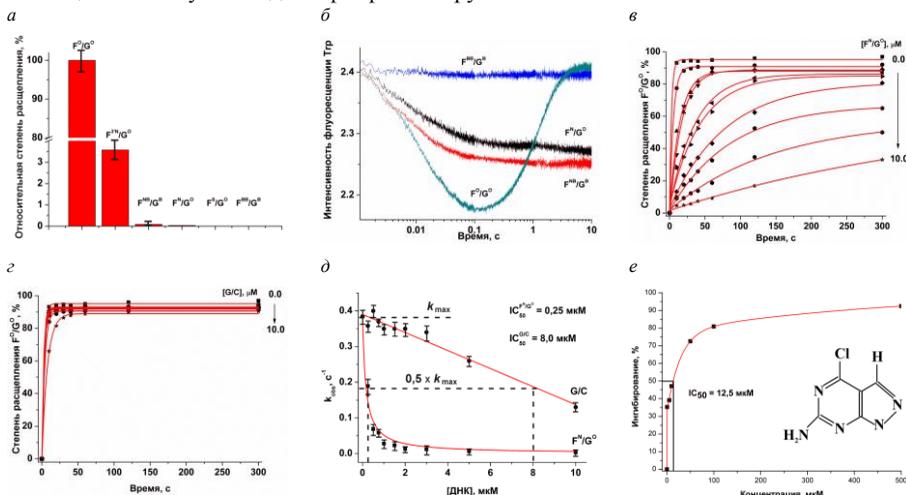


Рис. 22. (а) Относительная эффективность расщепления модифицированных ДНК-дуплексов. (б) Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Тпр при взаимодействии APE1 с модифицированными ДНК-дуплексами. Степень расщепления дуплекса F^O/G^O APE1 в присутствии дуплексов F^N/G^O (в) и G/C (г). (д) Зависимость наблюдаемой константы скорости расщепления дуплекса F^O/G^O от концентрации дуплексов F^N/G^O и G/C . (е) Степень ингибирования hOGG1 различными концентрациями 6-амино-4-хлоропиримидо[3,4-d]пиримидина.

Кроме того, эти же модифицированные олигонуклеотиды, обладающие способностью эффективно связываться с ферментом и при этом не подвергаться расщеплению, можно рассматривать как перспективные специфические ингибиторы. Видно (рис. 22в-д), что в присутствии F^N/G^O происходит ингибирование AP-эндонуклеазы с IC_{50} равной 0,25 мкМ. При этом дуплекс без специфического F-сайта (G/C) обладает значительно худшей ингибирующей способностью. Также в ходе выполнения работ было обнаружено соединение (рис. 22з), которое является в настоящее время первым и единственным в мире ингибитором фермента hOGG1 с IC_{50} равной 12,5 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В рамках настоящей работы разработана и апробирована комплексная методология изучения механизмов узнавания повреждений ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанная на кинетическом,

термодинамическом и мутационном анализе изменений конформации ферментов и ДНК.

Кинетический анализ конформационных изменений ферментов и ДНК при образовании и превращении фермент-субстратных комплексов включал использование методов предстационарной кинетики, поскольку процессы узнавания повреждений являются быстрыми. Конформационные переходы фермента регистрировались по изменению как собственной флуоресценции, обусловленной, преимущественно, присутствием природного набора остатков Trp в молекуле, так и флуоресценции введенных методом сайт-направленного мутагенеза дополнительных остатков Trp в различные домены молекулы, принимающие участие в специфических белково-нуклеиновых взаимодействиях. Чтобы регистрировать конформационные превращения в ДНК-субстратах, использовали модельные ДНК-дуплексы, содержащие флуоресцирующие аналоги азотистых оснований, которые располагались либо с 5'-, 3'-стороны от поврежденного нуклеотида, либо в комплементарной цепи напротив повреждения. Проведена апробация различных флуорофоров и их положения в составе ДНК. Кроме того, анализировалось качественное поведение сигнала флуоресцентной метки, позволяющее судить о характере изменения ее окружения. Изгибание ДНК-субстрата при образовании комплекса с ферментом, каталитические стадии реакции и диссоциация комплекса фермент-продукт регистрировались методом FRET, который чувствителен к изменению расстояния между донором и акцептором флуоресценции. В отдельных случаях изгибание спирали ДНК доказывали с помощью метода PELDOR.

Для соотнесения конформационных изменений в ДНК с взаимодействиями конкретных остатков в процессе образования специфических фермент-субстратных комплексов использовали подход постадийного усложнения субстрата. Переход от неповрежденного дуплекса ДНК, отражающего наиболее простые, неспецифические взаимодействия, к специфическому ДНК-субстрату, характеризующему полный ферментативный цикл, позволил выявить природу взаимодействий между реагирующими молекулами и соотнести их с взаимодействиями конкретных химических групп.

Термодинамический анализ основывался на исследовании ферментативных процессов методом остановленной струи с флуориметрической детекцией при различных температурах. Данная методология позволила определить термодинамические параметры ΔH_o и ΔS_o равновесных стадий формирования промежуточных короткоживущих белково-нуклеиновых комплексов и интермедиатов из зависимостей $\ln(K)$ от $1/T$ по уравнению Вант-Гоффа. Несмотря на общеизвестность самого принципа определения величин ΔH_o и ΔS_o равновесных процессов, в литературе до настоящего времени практически отсутствуют данные о применении такого подхода к многостадийным быстропротекающим процессам, возможно, вследствие трудоемкости получения и сложности обработки данных.

Мутационный анализ основывался на использовании мутантных форм ферментов (9 мутантных форм для hOGG1, 7 для Nei и 2 для APE1), содержащих замены аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента и участки связывания с субстратом, что позволяло определять функциональную роль этих остатков на различных стадиях превращения фермент-субстратного комплекса.

Масс-спектрометрический анализ интермедиатов ферментативного процесса, катализируемого ферментами Fpg и hOGG1, подтвердил, что скоростью-лимитирующей стадией является реакция β -элиминирования фосфатной группы. Более того, регенерация ДНК-гликозилазы Fpg из комплекса с остатком рибозы происходит медленно и также может лимитировать скорость ферментативного процесса в стационарном режиме реакции.

Совокупность данных, полученных с использованием всех подходов и характеризующих конформационные изменения как ферментов и их мутантных форм, так и модельных ДНК-дуплексов, содержащих модификации разной степени специфичности и различные флуорофоры, позволила *установить детальные молекулярно-кинетические механизмы узнавания специфических сайтов в ДНК, образования каталитически компетентных комплексов и протекания химических стадий реакции.* Разработанная в работе методология может быть распространена для изучения не только ДНК-процессирующих ферментов, но и белок-белковых взаимодействий, а также взаимодействий ферментов с низкомолекулярными субстратами (пептидами, аминокислотами, нуклеотидами и т.д.) или низкомолекулярными соединениями, выступающим в роли ингибиторов или активаторов ферментативных процессов.

2. Проведено систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов процессов, катализируемых рядом про- и эукариотических ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК (hOGG1, Nth, MBD4, MutY, Fpg, Nei, NEIL1 и APE1), ответственных за сохранение стабильности генетической информации живых организмов. Показано, что высокая субстратная специфичность ферментов, относящихся к разным структурным семействам, и дискриминация поврежденных и неповрежденных нуклеотидов обеспечивается в результате последовательной взаимосогласованной подстройки конформации ферментов и ДНК в составе фермент-субстратных комплексов. В пределах каждого структурного класса определена функциональная роль аминокислотных остатков, входящих в активные центры ферментов. Впервые проведено детальное сравнение про- и эукариотических ДНК-гликозилаз структурных семейств H2tH и HhH-GPD, а также AP-эндонуклеазы, структурно и каталитически отличной от ДНК-гликозилаз, показавшее, что процессы распознавания повреждений ДНК этими ферментами, включающие стадии изгибания ДНК, выворачивания поврежденного нуклеотида и встраивания аминокислотных остатков ферментов в ДНК-дуплекс, имеют общие кинетические и термодинамические особенности.

3. Термодинамический анализ быстропротекающих стадий образования каталитически компетентных состояний ферментов в составе комплексов с

поврежденной ДНК для ДНК-гликозилаз, принадлежащих к структурным семействам HhH-GPD и H2tH, и AP-эндонуклеазы показал, что субстратная специфичность ферментов обеспечивается путем многостадийного образования специфических связей, сопряженного с конформационными перестройками, ведущими к последовательной компактизации структуры белково-нуклеинового комплекса. Такое изменение структуры фермента и ДНК требует дополнительных затрат энергии, которые компенсируются за счет роста энтропии системы вследствие десольватации полярных групп в области контакта белок-ДНК и удаления молекул воды из области контактов, в том числе «кристаллической» воды, расположенной в бороздках ДНК.

4. На основании результатов, полученных в ходе исследований, разработан и апробирован высокочувствительный метод определения активности одного из ключевых ферментов репарации ДНК – APE1. Разработанный подход к созданию специфических ДНК-зондов может быть расширен для определения активности других ферментов репарации ДНК, например ДНК-гликозилаз hOGG1, NEIL1 и AAG, выполняющих важную роль при удалении повреждений ДНК, с целью диагностирования уровня репарационно-защитного статуса конкретного организма. Кроме того, специфические ДНК-зонды могут быть использованы для быстрого, поточного поиска низкомолекулярных соединений, оказывающих селективное влияние на активность ферментов репарации ДНК. Ингибиторы данных ферментов могут быть использованы для уменьшения репарационной устойчивости организма и повышения эффективности химио- и лучевой терапии, направленной на повреждение ДНК. Найдено низкомолекулярное соединение, являющееся первым и единственным в мире ингибитором важнейшего фермента репарации человека hOGG1.

ВЫВОДЫ

1. Разработана комплексная методология изучения механизмов узнавания повреждений про- и эукариотическими ферментами эксцизионной репарации оснований ДНК, основанная на предстационарном кинетическом, термодинамическом и мутационном анализе конформационных изменений ферментов и ДНК-субстратов и включающая:

а) анализ конформационных изменений ферментов по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp ферментов дикого типа, а также мутантных форм ферментов, содержащих дополнительные остатки Trp, введенные методом сайт-направленного мутагенеза;

б) использование для выяснения природы конформационных переходов в молекуле ДНК модельной системы ДНК-субстратов, содержащих флуоресцентные аналоги азотистых оснований и/или FRET-красителей, и основанной на постадийном усложнении их строения;

в) получение термодинамических параметров быстропротекающих стадий, приводящих к узнаванию поврежденного нуклеотида;

г) использование мутантных форм ферментов, содержащих замены функционально важных аминокислотных остатков, входящих в активный центр или участвующих в связывании субстратов, что позволяет определять их функциональную роль на различных стадиях превращения фермент-субстратных комплексов.

2. С помощью разработанной методологии впервые проведено систематическое исследование широкого круга ферментов репарации ДНК человека и *E. coli*, ДНК-гликозилаз, принадлежащих к разным структурным семействам, а также AP-эндонуклеазы, которая структурно и каталитически отличается от ДНК-гликозилаз (всего 8 ферментов и 18 мутантных форм):

а) показано, что элементарные акты всех изученных ферментативных процессов сопровождаются взаимосвязанными последовательными конформационными перестройками взаимодействующих молекул;

б) установлены молекулярно-кинетические механизмы взаимодействия ферментов с ДНК-субстратами;

в) установлены ключевые стадии ферментативных процессов, обеспечивающие высокую субстратную специфичность и ответственные за узнавание поврежденных нуклеотидов в ДНК;

г) определена и детализирована функциональная роль отдельных аминокислотных остатков, входящих в активные центры и участки связывания субстратов.

3. При сравнении молекулярно-кинетических механизмов, полученных для про- и эукариотических ДНК-гликозилаз и AP-эндонуклеазы человека, установлено, что ферменты обладают общими кинетическими особенностями распознавания повреждений ДНК, включающими стадии дестабилизации дуплекса, изгибания ДНК, выворачивания поврежденного нуклеотида и встраивания аминокислотных остатков активного центра ферментов в ДНК-дуплекс.

4. Впервые проведен термодинамический анализ быстропротекающих процессов узнавания поврежденного нуклеотида. Сравнение термодинамических параметров равновесных стадий молекулярно-кинетических механизмов, установленных для ферментов hOGG1, Fpg и APE1, позволило выявить общие термодинамические особенности трансформации фермент-субстратных комплексов, включающие десольватацию полярных аминокислотных остатков активного центра, дегидратацию бороздок ДНК и компактизацию структуры комплексов в ходе образования каталитически компетентных состояний.

5. Создана тест-система для определения активности AP-эндонуклеазы человека APE1. Апробирован набор модификаций концевых и межнуклеотидных фосфатных групп, повышающих устойчивость ДНК-зонда. Впервые показано, что 6-амино-4-хлоропиразоло[3,4-d]пиримидин является эффективным ингибитором важнейшего фермента репарации человека hOGG1.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Кузнецов Н.А., Коваль В.В., Воробьев Ю.Н., Жарков Д.О., Сильников В.Н., Федорова О.С. Ингибитор 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека. Патент на изобретение № RU 2380417 от 27.01.2010.
2. Kuznetsov N.A., Milov A.D., Koval V.V., Samoilova R.I., Grishin Y.A., Knorre D.G., Tsvetkov Y.D., Fedorova O.S. and Dzuba S.A. PELDOR study of conformations of double-spin-labeled single- and double-stranded DNA with non-nucleotide inserts. Phys. Chem. Chem. Phys., 2009, V. 11, P. 6826-6832.
3. Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Koval V.V., Buckle M. and Fedorova O.S. Reversible chemical step and rate-limiting enzyme regeneration in the reaction catalyzed by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Biochemistry, 2009, V. 48, P. 11335-11343.
4. Кузнецов Н.А., Коваль В.В., Федорова О.С. Способ определения активности АП-эндонуклеазы человека. Патент на изобретение № RU 2389026 от 10.05.2010.
5. Koval V.V., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K. and Fedorova O.S. Real-time studies of conformational dynamics of the repair enzyme *E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase and its DNA complexes during catalytic cycle. Mutat. Res., 2010, V. 685, P. 3-10.
6. Федорова О.С., Кузнецов Н.А., Коваль В.В., Кнорре Д.Г. Конформационная динамика и предстационарная кинетика ДНК-гликозилаз. Биохимия, 2010, Т. 75, стр. 1377-1394.
7. Retailleau P., Ishchenko A.A., Kuznetsov N.A., Saparbaev M. and Morera 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 Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., 2010, V. F66, P. 798-800.
8. Кузнецов Н.А., Коваль В.В., Федорова О.С. Механизмы ферментативного катализа и узнавания поврежденных участков ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой человека hOgg1. Биохимия, 2011, Т. 76, стр. 142-156.
9. Kuznetsov N.A., Milov A.D., Isaev N.P., Vorobjev Yu.N., Koval V.V., Dzuba S.A., Fedorova O.S. and Tsvetkov Yu.D. PELDOR analysis of enzyme-induced structural changes in damaged DNA duplexes. Mol. BioSyst., 2011, V. 7, P. 2670-2680.
10. 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, V. 40, P. 7384-7392.
11. Кузнецов Н.А., Федорова О.С. В главной роли – фермент. НАУКА из первых рук, 2012, Т. 43, стр. 60-65.
12. Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Step-by-step mechanism of DNA damage recognition by human 8-oxoguanine DNA glycosylase. Biochim. Biophys. Acta, 2014, V. 1840, P. 387-395.
13. 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, 2014, V. 9, e98495.
14. Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Barthes N.P., Michel B.Y., Burger A., Fedorova O.S. New Environment-sensitive multichannel DNA fluorescent

- label for investigation of the protein-DNA interactions. PloS ONE, 2014, V. 9, e100007.
15. Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K. and Fedorova O.S. Pre-steady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glycosylases to AP endonuclease APE1. Biochim. Biophys. Acta, 2014, V. 1840, P. 3042-3051.
 16. Kuznetsov N.A., Kladova O.A., Kuznetsova A.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Zharkov D.O., Fedorova O.S. Conformational dynamics of DNA repair by *Escherichia coli* endonuclease III. J. Biol. Chem., 2015, V. 290, P. 14338-14349.
 17. Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Термодинамика быстропотекающих стадий процессов эксцизионной репарации оснований, катализируемых ДНК-гликозилазами. Репарация ДНК / отв. ред. Лаврик О. И., Ходырева С. Н., Речкунова Н. И., Новосибирск: Издательство СО РАН, 2016, стр. 67-88.
 18. Kuznetsov N.A., Kurpyushkin M.S., Abramova T.V., Kuznetsova A.A., Miroshnikova A.D., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V. and Fedorova O.S. New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apurinic/aprimidinic endonuclease APE1. Mol. BioSyst., 2016, V. 12, P. 67-75.
 19. Мирошникова А.Д., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Термодинамика конформационных переходов AP-эндонуклеазы человека APE1 при взаимодействии с ДНК. Acta Naturae, 2016, T. 8, стр. 106-113.
 20. Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A. and Fedorova O.S. Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. Mol. BioSyst., 2016, V. 12, P. 1527-1539.
 21. Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Термодинамический анализ быстропотекающих стадий специфического узнавания поврежденных ферментами репарации ДНК. Биохимия, 2016, T. 81, стр. 1410-1426.
 22. Kuznetsov N.A., Kiryutin A.S., Kuznetsova A.A., Panov M.S., Barsukova M.O., Yurkovskaya A.V., Fedorova O.S. The formation of catalytically competent enzyme-substrate complex is not a bottleneck in lesion excision by human alkyladenine DNA glycosylase. J. Biomol. Struct. Dyn., 2017, V. 35, P. 950-967.
 23. Лукина М.В., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Кинетический анализ узнавания поврежденных нуклеотидов мутантными формами 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы. Биоорган. химия, 2017, T. 43, стр. 4-17.
 24. Тюгашев Т.Е., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. Особенности взаимодействия аденин-ДНК-гликозилазы MutY из *E. coli* с ДНК-субстратами. Биоорган. химия, 2017, T. 43, стр. 18-28.
 25. Vasilyeva S.V., Kuznetsov N.A., Kuznetsova A.S., Khalyavina J.G., Tropina D.A., Lavrikova T.I., Kargina O.I., Gornostaev L.M. DNA fluorescent labeling with naphtho[1,2,3-cd]indol-6(2H)-one for investigation of protein-DNA interactions. Bioorg. Chem., 2017, V. 72, P. 268-272.
 26. Яковлев Д.А., Кузнецова А.А., Федорова О.С., Кузнецов Н.А. Поиск поврежденных участков ДНК метил-CpG-связывающим ферментом человека MBD4. Acta Naturae, 2017, T. 9, стр. 95-105.
 27. Kladova O.A., Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. Mutational and kinetic analysis of lesion recognition by *Escherichia coli* endonuclease VIII. Genes, 2017, V. 8, P. 1-13.