

На правах рукописи



Яковлев Данила Алексеевич

**КОНФОРМАЦИОННАЯ ДИНАМИКА УРАЦИЛ-
ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ ЧЕЛОВЕКА SMUG1 И MBD4
В ПРОЦЕССЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК**

1.5.4 – биохимия

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научные
руководители

Кузнецов Никита Александрович, д.х.н.

Федорова Ольга Семеновна, д.х.н., профессор

Официальные
оппоненты

Кубарева Елена Александровна, д.х.н., профессор

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, главный научный сотрудник

Жарков Дмитрий Олегович, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», зав. лабораторией

Смирнов Иван Витальевич, д.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, зав. лабораторией

Защита диссертации состоится «2» июля 2021 г. в 12.00 на заседании диссертационного совета ИХБФМ 02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

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

Коваль В. В.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Урацил – одно из наиболее распространенных повреждений ДНК, которое образуется либо при дезаминировании цитозина: как спонтанном, так и ферментативном, либо при ошибочной вставке остатка уридина во время репликации. Такие повреждения являются сильно мутагенными из-за того, что ДНК-полимеразы не различают урацил и тимин в ДНК. Таким образом, U:G-пара при дальнейшей репликации приводит к образованию замены C:G → T:A в одной из дочерних цепей.

Урацил в ДНК человека узнается и удаляется несколькими ДНК-гликозилазами: урацил-ДНК-гликозилазой (UNG2), тимин-ДНК-гликозилазой (TDG), специфичной к одноцепочечной ДНК монофункциональной урацил-ДНК-гликозилазой (SMUG1) и метил-CpG-связывающим ферментом 4 (MBD4). Эти ДНК-гликозилазы принадлежат к разным структурным семействам: Udg (UNG2, TDG, SMUG1) и HhH (MBD4). Для многих ДНК-гликозилаз показано, что конформационная динамика самих ферментов и их ДНК-субстратов имеют большое значение для удаления поврежденных оснований.

ДНК-гликозилазы SMUG1 и MBD4 играют решающую роль как в репарации, так и в деметилировании ДНК – важного этапа эпигенетической регуляции экспрессии генов. Несмотря на близкую субстратную специфичность, эти ферменты проявляют разную каталитическую активность. Поэтому актуальными являются исследования предстационарной кинетики и конформационной динамики SMUG1 и MBD4 и их ДНК-субстратов в ходе взаимодействия с целью выяснения механизмов, обеспечивающих субстратную специфичность и каталитическую активность ферментов репарации.

Цель работы – установление кинетических механизмов конформационных переходов в молекулах фермента и ДНК в процессах, катализируемых урацил-ДНК-гликозилазами человека MBD4 и SMUG1, и выявление общих закономерностей процессов образования каталитически активных комплексов ферментами, принадлежащими к разным структурным семействам. Для выполнения поставленной цели были решены следующие задачи:

- Изучить конформационную динамику ферментов MBD4 и SMUG1 (дикого типа и мутантных форм F98W, H239A и R243A) и ДНК в процессе их взаимодействия методом «остановленного потока» с регистрацией изменений интенсивности флуоресценции остатков триптофана в белке, а также флуоресцентных и FRET-меток, введенных в ДНК.
- С помощью методов моделирования по гомологии и молекулярной динамики получить структуры комплексов SMUG1 дикого типа и

мутантных форм (F98W, H239A, R243A), с ДНК и установить роль данных аминокислотных остатков в процессах специфического узнавания повреждения и катализа.

- Используя последовательное усложнение ДНК-субстратов и увеличение их длины изучить влияние длины ДНК-дуплекса на кинетику связывания MBD4 с ДНК и удаления повреждения.
- На основании совокупности теоретических и экспериментальных данных предложить кинетический механизм конформационных превращений в процессе взаимодействия ферментов MBD4 и SMUG1 с поврежденной ДНК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Образование каталитически компетентных комплексов ферментов человека SMUG1 и MBD4 сопровождается взаимными последовательными конформационными превращениями белка и ДНК-субстрата.
2. Аминокислотные остатки Phe98 и His239 фермента SMUG1 играют важную роль в катализе. Аминокислотный остаток Arg243 не является каталитически значимым, но играет важную роль в субстратной специфичности фермента.
3. Изменение длины ДНК-субстрата фермента MBD4 влияет только на скорость поиска повреждения, но не на скорость дальнейших конформационных перестроек фермент-субстратного комплекса.
4. ДНК-гликозилазы SMUG1 и MBD4, принадлежащие к разным структурным семействам, проявляют схожие механизмы узнавания поврежденного основания, включающие изгибание ДНК-дуплекса, выворачивание поврежденного нуклеотида из двойной спирали ДНК и встраивание в неё аминокислотных остатков фермента.

Научная новизна и практическая значимость работы. Методом «остановленного потока» в режиме реального времени изучена конформационная динамика взаимодействия ферментов SMUG1 и MBD4 с ДНК-субстратами. Показано, что в ходе образования и превращения фермент-субстратных комплексов происходят конформационные изменения как в молекулах белков, так и ДНК-субстратов. Методом моделирования по гомологии с последующей оптимизацией методом молекулярной динамики получены структуры комплексов ферментов человека SMUG1 и MBD4 с ДНК.

Сопоставление результатов исследования конформационной динамики ферментов и ДНК со структурами их комплексов позволило установить роль отдельных аминокислотных остатков SMUG1 в процессе узнавания повреждения и гидролиза *N*-гликозидной связи, изучить влияние длины субстрата на кинетику взаимодействия MBD4 с ДНК и предложить

детальные механизмы взаимодействия SMUG1 и MBD4 с ДНК. Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов репарации и деметилирования ДНК.

Публикации и апробация работы: по материалам диссертации опубликовано 4 научные статьи, индексируемые в базах Web of science и Scopus.

Результаты диссертации были представлены на российских и международных конференциях: VII Всероссийский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015); «Химическая биология 2016» (Новосибирск, 2016); «42nd FEBS Congress» (Иерусалим, Израиль, 2017); VIII симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, 2017); «43rd FEBS Congress» (Прага, Чехия, 2018); IX симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, 2019).

Структура и объем работы: диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 114 страницах, содержит 64 рисунка, 11 таблиц и 9 схем. Библиография включает 181 литературный источник.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Структуры субстратов и методы исследования кинетики

В качестве специфических субстратов урацил-ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 использовали олигодезоксирибонуклеотидные дуплексы, содержащие остаток уридина (U), в качестве неспецифических субстратов MBD4 использовали неповрежденные дуплексы. Аналогами продукта служили олигонуклеотидные дуплексы, содержащие остаток 2-гидроксиметил-3-гидрокситетрагидрофурана (F). Последовательности всех использованных в работе олигодезоксирибонуклеотидов представлены в Таблице 1.

Изменения конформации фермента регистрировали по изменению флуоресценции триптофана. Изменения конформации олигодезоксирибонуклеотидов регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции флуорофора 2-аминопурина (aPu), который помещали с 3'-стороны от повреждения, либо FRET-пары FAM–BHQ1. Флуорофор FAM располагали на 5'-конце олигонуклеотида, содержащего повреждение, а тушитель BHQ1 - на 3'-конце комплементарной цепи. Структуры использованных модифицированных нуклеотидов и флуорофоров изображены на Рис. 1.

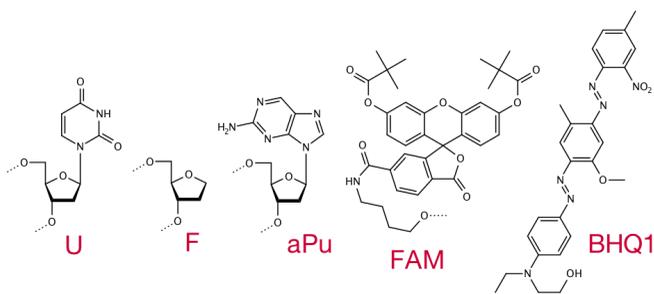


Рисунок 1. Структуры использованных в работе модифицированных нуклеотидов.

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

X/G12 X=U, F	5' -CTCTC X CCTTCC-3' 3' -GAGAGGGGAAGG-5'
X/G17 X=U, F, C	5' -GCTC AXG TACAGAGCTG-3' 3' -CGAG TGC ATGTCTCGAC-5'
U/G28	5' -GTGTCACCACTGCTC AUG TACAGAGCTG-3' 3' -CACAGTGGTGACGAG TGC ATGTCTCGAC-5'
FaPu12	5' -CTCTC FaPu CTTCC-3' 3' -GAGAGG C GAAGG-5'
XaPu17 X=U, F	5' -GCTC AXaPu TACAGAGCTG-3' 3' -CGAG TG C ATGTCTCGAC-5'
FRET-X X=U, F, C	5' - FAM -GCTC AXG TACAGAGCTG-3' 3' -CGAG TGC ATGTCTCGAC- BHQ1 -5'

Для регистрации изменений интенсивности флуоресценции реакционной смеси использовали метод «остановленного потока», позволяющий смешивать компоненты реакционной смеси за ~1 мс и наблюдать процессы на временах от нескольких миллисекунд до тысяч секунд.

Зависимости интенсивности флуоресценции от времени, отражающие конформационные превращения в ходе фермент-субстратного взаимодействия, анализировали в программе DynaFit, используя метод градиентного спуска, путем оптимизации значений параметров системы дифференциальных уравнений, соответствующих предлагаемым кинетическим схемам. Параметры представляли собой константы скорости и коэффициенты удельной флуоресценции всех флуоресцирующих форм (Kuznetsov N. A., 2005).

Моделирование структур комплексов MBD4 и SMUG1 с ДНК

SMUG1

Модель структуры свободного SMUG1 дикого типа получена методом моделирования по гомологии с использованием фермента SMUG1 *X. laevis* в качестве шаблона.

Моделирование структуры комплекса SMUG1 с ДНК. В качестве шаблона для моделирования была взята структура TDG человека в комплексе с ДНК-дуплексом (PDB ID: 5T2W), часть нуклеотидов в котором была удалена, а поврежденное основание заменено на U, что дало в точности модельный субстрат U/G17 (Таблица 1). Начальная модель комплекса SMUG1 с ДНК была сконструирована из комбинации модели свободного SMUG1 и ДНК из структуры 5T2W. Геометрию системы оптимизировали методом молекулярной динамики в течение 10 нс. Полученная структура была модифицирована для получения структур комплексов SMUG1 F98W, H239A и R243A с ДНК. Структуры комплексов мутантных форм SMUG1 так же оптимизировали в течение 10 нс, и затем использовали в дальнейшем анализе.

В результате моделирования показано, что фермент изменяет свою конформацию при связывании с ДНК: боковая цепь остатка Arg243, входящего в состав интеркалирующей петли, встраивается в полость ДНК, образованную вывернутым из двойной спирали основанием, а остатки активного центра, в том числе, Phe98 и His239, меняют свое положение, формируя карман, связывающий вывернутое основание (Рис. 2).

Замена Phe98 на Trp, по-видимому, приводит к нарушению стэкинг-взаимодействия с остатком урацила в активном центре, блокируя тем самым образование каталитической компетентной конформации (Рис. 2А). В то же время мутация H239A не приводит к значительным нарушениям геометрии области взаимодействия белка и ДНК, но уменьшает положительный заряд на поверхности ДНК-связывающего кармана, что должно ухудшать связывание белка с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом.

Замена R243A также приводит к потере значительного числа межмолекулярных водородных связей с ДНК (Рис. 2Б). При этом структура фермент-субстратного комплекса не претерпевает значительных изменений, что свидетельствует о том, что, несмотря на образование многочисленных контактов Arg243 с основаниями ДНК, эта аминокислота не является ключевым остатком, участвующим в стабилизации вывернутого состояния поврежденного основания.

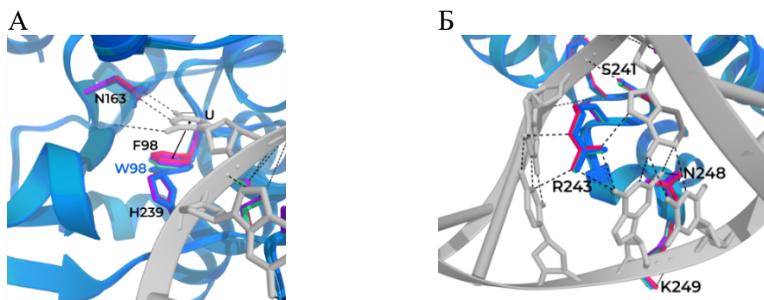


Рисунок 2. Структурное выравнивание SMUG1 дикого типа и мутантных форм. А. Детализация Phe98 и His239 в активном центре. Б. Область контакта интеркалирующей петли с ДНК. Водородные связи показаны пунктирными черными линиями.

MBD4

Для каталитического домена (426–580 а.а.) белка MBD4 известен ряд кристаллических структур, как для свободной формы, так и для комплекса MBD4^{cat}–ДНК. В ходе работы было проведено моделирование структуры комплекса фермента с U/G17-субстратом, который использовался в нашем исследовании. Эта модель позволила точнее описать структурное взаимодействие между ДНК и белком и получить представление о геометрии ключевых аминокислотных остатков MBD4^{cat} и ДНК в описываемом комплексе (Рис. 3).

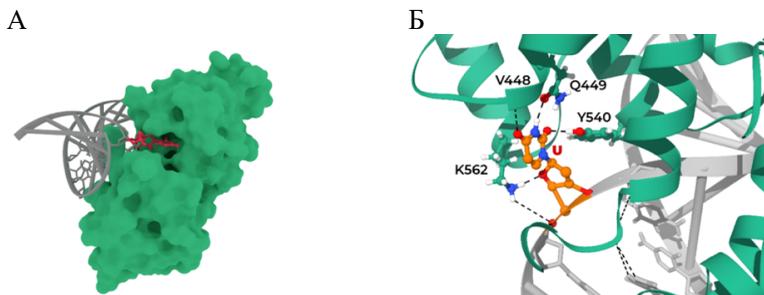


Рисунок 3. Модель структуры комплекса MBD4^{cat} с ДНК-субстратом U/G17. А: общий вид, MBD4^{cat} изображен в виде зеленой поверхности доступности растворителя, ДНК-дуплекс в виде серой спирали, вывернутое основание в виде красной шаростержневой модели. Б: Строение активного центра MBD4^{cat}, водородные связи изображены в виде черных пунктирных линий.

Карман активного центра MBD4^{cat} связывает вывернутый нуклеотид не со всех сторон: атомы O⁴, C5, C6, O4' и 5'-фосфатная группа контактируют с растворителем (Рис. 3А). Более свободная организация кармана активного центра по сравнению с SMUG1 обеспечивает более широкую субстратную специфичность: атомы C5 и C6 могут иметь достаточно

объемные модификации, как, например, в случае повреждений 5-йод-урацил (5IU) или тимингликоль (Tg).

MBD4^{cat} образует контакты с областью ДНК с -3 по +1 нуклеотид от поврежденного основания. В случае достаточно длинных субстратов (> 10 п. н.) такая небольшая область контакта вынуждает фермент перемещаться по молекуле ДНК в поисках повреждения, при этом небольшое количество контактов, образующихся в ходе взаимодействий, не мешает перемещению, поэтому этот процесс должен быть достаточно быстрым.

Влияние замен SMUG1 F98W, H239A, R243A на каталитическую активность фермента

Чтобы установить роль остатков Phe98, His239 и Arg243 фермента в проявлении каталитической активности, исследовали зависимости степени превращения субстрата от времени соответствующими мутантными формами. Кинетику накопления продукта исследовали путем разделения реакционной смеси электрофорезом в ПААГ (Рис. 4) и описывали уравнением (1):

$$[P] = A(1 - e^{-k_{obs}t}), \quad (1)$$

в котором P – продукт, A – начальная концентрация субстрата, k_{obs} - наблюдаемая константа скорости, t – время (с).

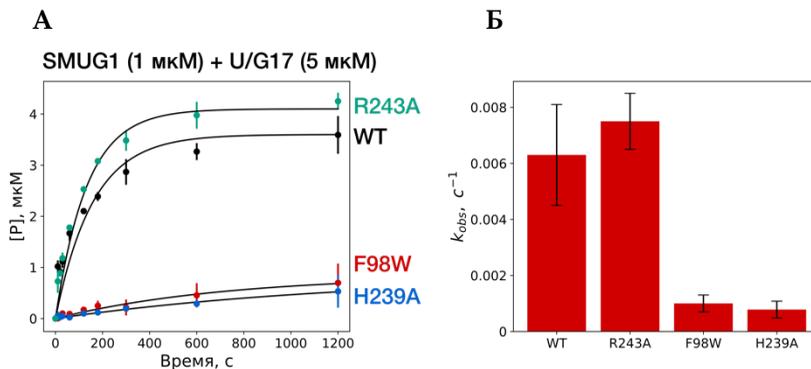


Рисунок 4. (А) Кинетика накопления продукта реакции SMUG1 дикого типа и мутантных форм F98W, H239A и R243A в процессе взаимодействия с модельным ДНК-дуплексом U/G17 и (Б) значения k_{obs} . $[SMUG1] = 1.0 \times 10^{-6} M$, $[U/G17] = 5.0 \times 10^{-6} M$.

Замены F98W и H239A приводят к практически полной потере активности фермента. В то же время замена R243A ведет к небольшому увеличению скорости реакции. Приведенные результаты согласуются с

исследованием каталитической активности ортолога SMUG1 из *Geobacter metallireducens* (Mi R., 2009).

Конформационная динамика взаимодействия SMUG1 WT и R243A с аналогом продукта

Для изучения механизма узнавания поврежденного основания ферментом SMUG1 регистрировали конформационные изменения в процессе взаимодействия фермента с продуктом гидролиза *N*-гликозидной связи субстрата. Для этого был использован модельный ДНК-дуплекс, содержащий тетрагидрофурановый аналог AP-сайта (F/G17-лиганд, Таблица 1).

Анализ изменений интенсивности флуоресценции остатков триптофана в белке (Рис. 5А), аРи в ДНК-лиганде (Рис. 5Б) и изменения FRET-сигнала (Рис. 5В) указывает на взаимосвязанные быстрые изменения конформации белка и ДНК с характерными временами ~ 100–200 мс. Падение интенсивности флуоресценции остатка аРи свидетельствует об образовании вокруг него гидрофобного окружения за счет взаимодействия с интеркалирующей петлей белка. Падение интенсивности FRET-сигнала указывает на уменьшение расстояния между флуорофорами, которое может происходить в результате изгибания молекулы ДНК при связывании с ферментом.

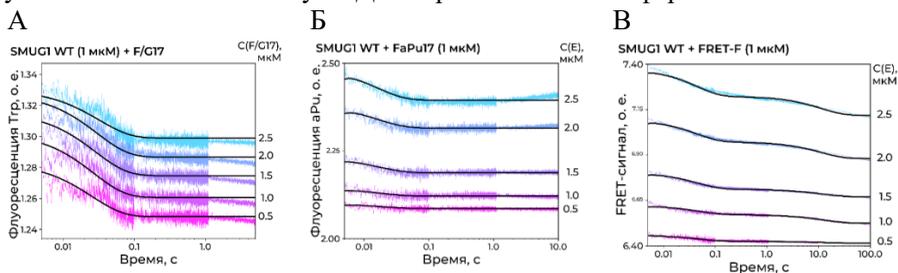


Рисунок 5. Кинетика взаимодействия SMUG1 WT (E) с ДНК-аналогом продукта F. А: изменение интенсивности флуоресценции остатков Trp фермента при разных концентрациях F/G17, Б: изменение интенсивности флуоресценции остатков аРи в F-aPu17 при разных концентрациях E, В: изменение FRET-сигнала в FRET-F при разных концентрациях E.

Изменения интенсивности флуоресценции Trp в SMUG1 WT при взаимодействии с F/G17 описываются Схемой 1:

Схема 1.

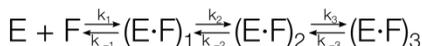


где E – фермент, F – аналог продукта, $(E \cdot F)_1$ и $(E \cdot F)_2$ – комплексы фермента с продуктом *N*-гликозилазной реакции.

Этой же Схемой 1 описывается кинетика связывания SMUG1 WT с аналогом продукта FaPu17 в случае регистрации изменений интенсивности флуоресценции aPu (Рис. 5Б).

При исследовании процесса связывания SMUG1 WT с аналогом продукта FRET-F анализ изменений интенсивности FRET-сигнала показал, что кинетический механизм может быть описан трехстадийной равновесной Схемой 2.

Схема 2



В Таблице 2 представлены значения констант скорости и равновесия, соответствующие Схемам 1 и 2, описывающим взаимодействие SMUG1 WT с ДНК, содержащей F-сайт.

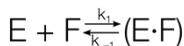
Таблица 2. Константы скорости и равновесия, соответствующие Схемам 1 и 2, описывающим взаимодействие SMUG1 WT с ДНК, содержащей F-сайт

Константа	Флуорофор		
	Трп (схема 1)	aPu (схема 1)	FRET (схема 2)
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	120±30	130±10	200±50
k_{-1}, c^{-1}	1000±250	490±60	650±70
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,12	0,26	0,31
k_2, c^{-1}	60±23	25±16	7,7±3,5
k_{-2}, c^{-1}	24±7	55±21	18,4±0,9
K_2	2,5	0,45	0,42
$K_1 \times K_2 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,3	0,12	0,13
k_3, c^{-1}			0,13±0,02
k_{-3}, c^{-1}			0,067±0,004
K_3			1,9
$K_1 \times K_2 \times K_3 \times 10^{-6}, M^{-1}$			0,25

Как видно из Таблицы 2, значение k_1 хорошо согласуется с величинами бимолекулярных диффузионно-контролируемых констант скорости образования комплексов белков с нуклеиновыми кислотами $\sim 1 \times 10^8 M^{-1}c^{-1}$ (Halford S. E., 2004). Поэтому 1-я обратимая стадия в Схемам 1 и 2 может быть отнесена к стадии образования первичного столкновительного комплекса, а 2-я и 3-я стадии – к образованию специфических контактов между белком и нуклеиновой кислотой. Как следует из данных, полученных при регистрации флуоресценции Трп, сродство фермента к F-дуплексу увеличивается вследствие появления специфических контактов ($K_2 = 2,5$), тогда как присутствие пары aPu/C вместо G/C снижает сродство в ~ 2 раза ($K_2 = 0,45$), причем наличие FRET-пары на концах дуплекса практически не влияет на общее сродство к ДНК, поскольку произведение $K_1 \times K_2 \times K_3 = 0,25$ близко по значению к $K_1 \times K_2 = 0,3$, полученному при регистрации флуоресценции Трп.

Аналогичные эксперименты проводили с мутантной формой SMUG1 R243A (Рис. 6). При взаимодействии SMUG1 R243A с аналогом продукта F/G17 изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp (Рис. 6А), описывались Схемой 1 (Таблица 3), как и в случае фермента дикого типа. Однако, при взаимодействии SMUG1 R243A с аналогом продукта FaPu17 кинетические кривые, представляли собой однофазное падение интенсивности флуоресценции aPu (Рис. 6Б) и описывались одностадийной Схемой 3.

Схема 3.



Кинетические кривые, зарегистрированные при наблюдении FRET-сигнала в ходе взаимодействия SMUG1 R243A с FRET-F-лигандом, содержали две фазы падения интенсивности: в области (< 1 с) и в области ~ 10 с. Уменьшение FRET-сигнала отражает процесс связывания ДНК и может быть объяснено изгибанием ДНК, уменьшением расстояния FAM – BHQ1. Процесс взаимодействия SMUG1 R243A – ДНК описывался двухстадийной Схемой 1.

Константы скорости и равновесия, соответствующие кинетическим Схемам 1 и 3, описывающих взаимодействие SMUG1 R243A с ДНК, содержащей F-сайт, представлены в Таблице 3. Видно, что значения констант скорости в данном случае определяются с очень большой ошибкой.

Таблица 3. Константы скорости и равновесия, соответствующие Схемам 1 и 3, описывающих взаимодействие SMUG1 R243A с ДНК, содержащей F-сайт

Константа	Флуорофор		
	Trp (схема 1)	aPu (схема 3)	FRET (схема 1)
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	35±8	14±4	6±2
k_{-1}, c^{-1}	0,5±0,3	5,4±1	30±7
k_2, c^{-1}		2,6	0,2
k_{-2}, c^{-1}	0,011±0,008		0,4±0,1
K_2, c^{-1}	0,07±0,02		6±2
			0,07

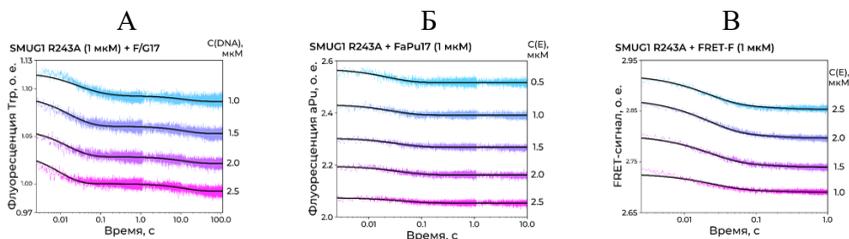


Рисунок 6. Кинетика взаимодействия SMUG1 R243A (E) с аналогом продукта F. А: изменение флуоресценции остатков Trp при разных концентрациях F, Б: изменение интенсивности флуоресценции остатков aPu при разных концентрациях E, В: изменение FRET-сигнала при разных концентрациях E.

Тем не менее, из Таблицы 3 видно, что в случае SMUG1 R243A образование как неспецифического комплекса с F-лигандом (E·F)₁, как и специфического комплекса (E·F)₂ происходит на порядок медленнее, чем в случае SMUG WT. Из этих данных следует, что аминокислота Arg243, расположенная в интеркалирующей петле SMUG1, играет роль в протекании стадий связывания с субстратом и формировании каталитически активного состояния фермента.

Конформационная динамика взаимодействия SMUG1 WT и R243A с субстратом

Полный ферментативный цикл изучали, используя модельные ДНК-субстраты, содержащие остаток урацила (Таблица 1). В ходе ферментативной реакции происходит связывание фермента с субстратом, формирование каталитически компетентного комплекса, гидролиз N-гликозидной связи и диссоциация фермента с продуктом.

Изменения интенсивности флуоресценции Trp при взаимодействии SMUG1 WT с субстратом U/G17 (Рис. 7А) свидетельствовали о более сложном и многостадийном процессе, чем в случае аналога продукта F/G17. К стадиям быстрого связывания фермента с ДНК, которые наблюдались при взаимодействии с F-лигандами, добавилась фаза роста интенсивности флуоресценции Trp, отражающая, по-видимому, процесс гидролиза N-гликозидной связи.

Кинетика конформационных изменений в ДНК, полученная при регистрации интенсивности флуоресценции aPu в UaPu17 (Рис. 7Б) или FRET-сигнала в случае FRET-U-субстрата (Рис. 7В), на начальном участке до 100 мс аналогична кинетике взаимодействия SMUG1 WT с аналогом продукта F/G17 (Рис 5Б, В). Кинетические кривые описывались Схемами 4-6, константы скорости соответствующих стадий представлены в Таблице 4.

Схема 4. Кинетический механизм связывания SMUG1 WT с ДНК-субстратом. Данные получены из наблюдения за изменением флуоресценции Trp.



Схема 5. Кинетический механизм связывания SMUG1 WT с ДНК-субстратом. Данные получены из наблюдения за изменением флуоресценции aPu.



Схема 6. Кинетический механизм связывания SMUG1 WT с ДНК-субстратом. Данные получены из наблюдения за изменением FRET-сигнала.

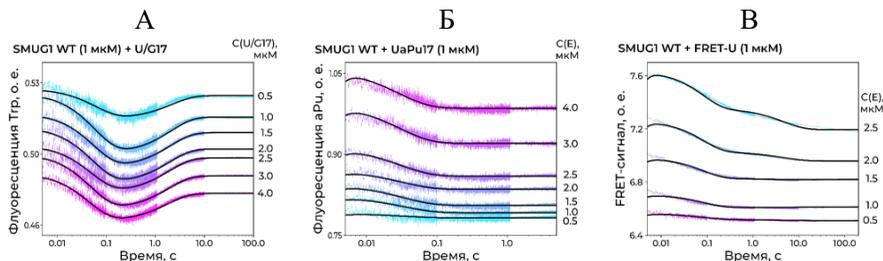
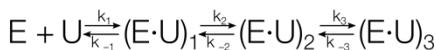


Рисунок 7. Кинетика взаимодействия SMUG1 WT с ДНК-субстратом. **А:** изменение интенсивности флуоресценции остатков Trp при разных концентрациях субстрата U/G17, **Б:** изменение интенсивности флуоресценции остатков aPrU в субстрате UaPu17 при разных концентрациях фермента E, **В:** изменение FRET-сигнала в субстрате FRET-U при разных концентрациях фермента E.

Таблица 4. Константы скорости и равновесия, характеризующие взаимодействие SMUG1 WT с ДНК, содержащей урацил.

Константа	Флуорофор		
	Trp (схема 4)	aPrU (схема 5)	FRET (схема 6)
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1}c^{-1}$	115±20	130±60	140±20
k_{-1}, c^{-1}	760±90	240±30	410±20
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,15	0,54	0,34
k_2, c^{-1}	30±8	15±8	3,6±0,8
k_{-2}, c^{-1}	11,5±0,8	25±6	9,7±0,2
K_2	2,6	0,6	0,37
$K_1 \times K_2 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,39	0,32	0,13
k_3, c^{-1}	1,7±0,2		0,6±0,1
k_{-3}, c^{-1}			0,11±0,02
K_3			5,4
$K_1 \times K_2 \times K_3 \times 10^{-6}, M^{-1}$			0,68
$k_{cat}, c^{-1} (2)$	1,16		
$K_M \times 10^{-6}, M (3)$	2,0		

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_{-2} + k_3} \quad (2)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3}{k_1 (k_2 + k_{-2} + k_3)} \quad (3)$$

Сравнение констант скорости, полученных для взаимодействия SMUG1 с ДНК-дуплексами, содержащими урацил и F-сайт (Таблицы 2 и 4), показало, что образование как начальных столкновительных комплексов $(E \cdot U)_1$

и $(E \cdot F)_1$, так и специфических комплексов $(E \cdot U)_2$ и $(E \cdot F)_2$ и $(E \cdot U)_3$ происходит с близкими по величине значениями констант скорости.

Аналогичные эксперименты с мутантной формой SMUG1 R243A (Рис. 8А) указывают на схожую картину конформационных превращений. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции триптофана свидетельствуют о протекании трехстадийного процесса: имеются две обратимые стадии связывания и необратимый гидролиз *N*-гликозидной связи, как и в случае фермента дикого типа (Схема 4). Кинетические кривые изменения флуоресценции аРи (Рис. 8Б) и FRET-сигнала (Рис. 8В) описываются Схемами 7 и 5, соответственно, и указывают только на конформационные перестройки в ДНК, происходящие на временах менее 1–3 с и, по-видимому, отражают лишь процесс связывания фермента с ДНК, но не гидролиза *N*-гликозидной связи.

Кинетические механизмы, соответствующие описываемым процессам представлены в виде Схем 4, 5 и 7, константы скорости соответствующих стадий приведены в Таблице 5.

Из кинетических данных следует, что если проанализировать полученные данные в рамках более привычной для биохимиков кинетической Схемы Михаэлиса-Ментен, то такой параметр, как каталитическая эффективность $\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)$, оказывается равной $0,58 \times 10^6 \text{ M} \cdot \text{с}^{-1}$ для фермента дикого типа и $1,52 \times 10^6 \text{ M} \cdot \text{с}^{-1}$ для мутантной формы R243A (Таблицы 4 и 5). Следовательно, мутантная форма SMUG1 R243A обладает несколько более высокой каталитической активностью, чем фермент дикого типа, что подтверждается также результатами экспериментов, полученных методом электрофореза в ПААГ (Рис. 4). Однако образование фермент-субстратного комплекса в случае мутантной формы R243A происходит медленнее, чем у фермента дикого типа.

Схема 7. Взаимодействие SMUG1 R243A с ДНК-субстратом. Данные получены из наблюдения за изменением флуоресценции аРи.

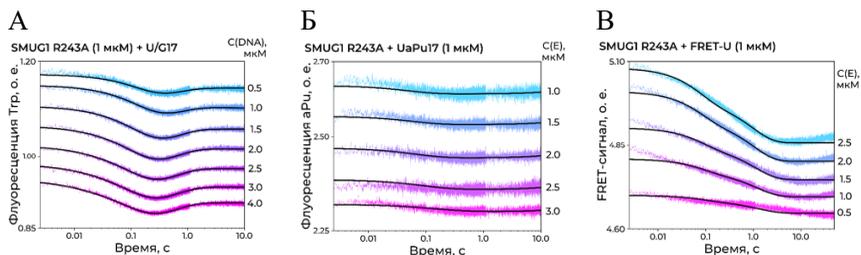


Рисунок 8. Взаимодействие SMUG1 R243A с ДНК-субстратом. А: изменение флуоресценции остатков Trp, Б: изменение флуоресценции остатков aPu, В: изменение FRET-сигнала.

Таблица 5. Константы скорости и равновесия, соответствующие взаимодействию SMUG1 R243A с ДНК, содержащей урацил.

Константа	Флуорофор		
	Trp (схема 4)	aPu (схема 7)	FRET (схема 5)
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	22±5	8±3	1,2±0,2
k_{-1}, s^{-1}	2,2±0,6	0,19±0,07	8±1
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	10	41,6	0,16
k_2, s^{-1}	9±3		1,7±0,3
k_{-2}, s^{-1}	0,8±0,1		0,64±0,06
K_2	11,1		2,66
$K_1 \times K_2 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	111		0,43
k_3, s^{-1}	2,0±0,3		
$k_{\text{cat}}, \text{s}^{-1}$ (2)	1,52		
$K_M \times 10^{-6}, \text{M}$ (3)	1,0		

Таким образом, образование первичного столкновительного комплекса мутантной формы SMUG1 R243A с U-субстратом, протекает на порядок медленнее, чем в случае природного фермента, как это наблюдалось для связывания F-лигандов. Этот факт указывает на то, интеркалирующая петля фермента, в которой находится остаток Arg243, принимает участие во взаимодействии с ДНК на самой начальной стадии процесса. Замена Arg243Ala влияет только на скорость обнаружения поврежденного основания, а не эффективность его удаления.

Общий механизм удаления повреждения ферментом SMUG1

Общий кинетический механизм (Схема 8) включает две обратимые стадии, характеризующие образование каталитически компетентного комплекса. Первичное связывание включает встраивание интеркалирующей петли фермента в ДНК-дуплекс, согласованное с локальным плавлением ДНК и выворачиванием повреждения из дуплекса (Рис. 9).

На второй стадии формируется каталитически активный комплекс, в котором аминокислотные остатки интеркалирующей петли полностью встраиваются в ДНК и образуют все возможные контакты с вывернутым нуклеотидом, включая контакты His239 с фосфатными группами. Каталитическая реакция протекает на третьей стадии взаимодействия.

Каталитическая активность SMUG1 дикого типа и мутантной формы R243A примерно одинакова: $k_3 = 1,7 \text{ s}^{-1}$ и $2,0 \text{ s}^{-1}$, соответственно. Однако скорости 1-ой и 2-ой стадий, характеризующие связывание и узнавание субстрата, в случае SMUG1 WT существенно выше, чем в случае

мутантной формы R243A. Поскольку эти стадии не являются лимитирующими, то снижение скорости образования комплексов с субстратом мутантной формы SMUG1 R243A в целом, не влияет на скорость ферментативного процесса.

Схема 8.



Рисунок 9. Общий кинетический механизм удаления повреждения ферментом SMUG1.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что аминокислотный остаток Arg243 принимает участие в узнавании поврежденного нуклеотида, но не важен для протекания каталитической стадии, остаток His239 необходим как для узнавания поврежденного нуклеотида, так и для катализа. Замена Phe98 на более объемный Trp нарушает архитектуру активного центра и инактивирует фермент.

Конформационная динамика взаимодействия метил-SpG-связывающего фермента человека MBD4 с ДНК

Для того, чтобы идентифицировать природу конформационных изменений фермента и ДНК, происходящих в процессе связывания продукта ферментативной реакции, содержащего AP-сайт, был использован его стабильный аналог F-сайт.

Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана при взаимодействии MBD4^{cat} и лиганда F/G12 имеют многофазный профиль и характеризуют процесс первичного связывания и дальнейшую перестройку конформации фермента (Рис. 10). Полученные кинетические данные удовлетворительно описываются двухстадийной кинетической Схемой **Error! Reference source not found.**, как и для фермента SMUG1.

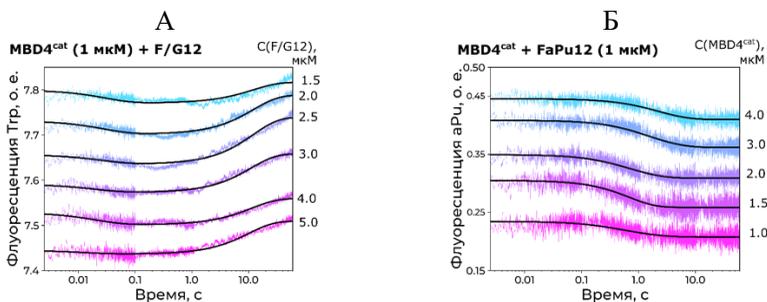


Рисунок 10. А. Изменение интенсивности флуоресценции остатков Trp при взаимодействии $MBD4^{cat}$ и лиганда F/G12 (концентрация ДНК изменяется в диапазоне 1 – 4 мкМ, концентрация $MBD4^{cat}$ постоянна и равна 2 мкМ). Б. Изменение интенсивности флуоресценции остатков aPu при взаимодействии $MBD4^{cat}$ и лиганда FaPu12 (концентрация ДНК постоянна (1 мкМ), концентрация $MBD4^{cat}$ изменяется от 0,5 до 3 мкМ). Кинетические кривые: экспериментальные (цветные линии) и теоретические (черные линии).

Изменения интенсивности флуоресценции 2-аминопурина лиганда FaPu12 (Рис. 10) на временах ~ 2 с удовлетворительно описываются одностадийной кинетической схемой 3.

Можно отметить, что минимуму на кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции триптофана соответствует падение интенсивности флуоресценции 2-аминопурина (Рис. 10), что указывает на синхронность процесса конформационной перестройки фермента и ДНК.

На Рис. 11А представлены кинетические кривые, характеризующие процесс взаимодействия $MBD4^{cat}$ с двенадцатизвенным субстратом U/G12 и соответствующие изменению интенсивности флуоресценции триптофана. Видно, что имеются две стадии: падение интенсивности (10–500 мс) и рост (0,5–10 с) с выходом на плато.

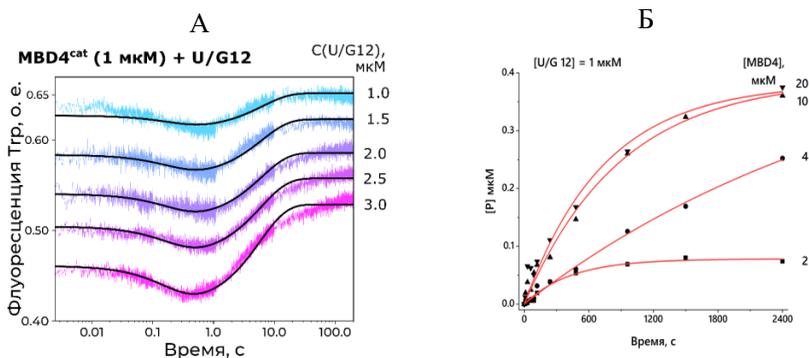


Рисунок 11. **А:** Изменение флуоресценции остатков Trp при взаимодействии $MBD4^{cat}$ с субстратом U/G12 (экспериментальные кинетические кривые (цветные линии) и теоретические кривые (черные линии)). Концентрация белка постоянна (2 мкМ), концентрация U/G12 изменяется от 1 до 3 мкМ. **Б:** Накопление продукта реакции $MBD4^{cat}$ с субстратом U/G12 (0 с, 10 с, 30 с, 60 с, 120 с, 240 с, 480 с, 960 с, 1360 с и 2400 с) для разных концентраций фермента (2, 4, 10 и 20 мкМ). Концентрация ДНК постоянна и равна 1 мкМ.

Время накопления заметного количества продуктов реакции составляет не менее 500 с (Рис. 11Б), что значительно превышает временной интервал наблюдения в эксперименте методом «остановленного потока». Поэтому на кинетических кривых, полученных этим методом, отсутствовала каталитическая стадия, и данные описывались Схемой 5.

В то же время для субстратов большей длины (17 и 28 пар оснований) форма кинетических кривых (Рис. 12) несколько отличается: падение более растянуто во времени (минимум около 10 с) и имеет двухфазный характер (медленное падение на 10–100 мс и более быстрое на 0,1–10 с). Такой процесс взаимодействия уже нельзя описать двухстадийным механизмом.

Из анализа кинетических кривых (Рис. 12) можно сделать вывод о наличии, как минимум, четырех стадий в кинетическом механизме взаимодействия $MBD4^{cat}$ с более длинными ДНК-субстратами: двух стадий первичного связывания, стадии гидролиза N-гликозидной связи (необратимая) и диссоциации фермента и ДНК-продукта, как и в случае фермента SMUG1 (Схема 8).

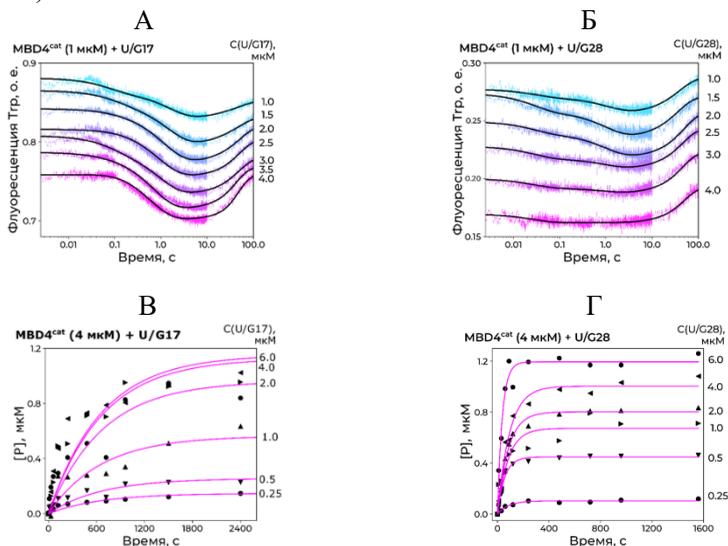


Рисунок 12. **А, Б.** Экспериментальные (цветные) и теоретические (черные) кинетические кривые, характеризующие изменение интенсивности флуоресценции остатков Thr, полученные при взаимодействии MBD4^{cat} с разными концентрациями субстратов U/G17 (А) и U/G28 (Б). Концентрация белка постоянна (2 мкМ), концентрация субстратов изменяется от 1 до 4 мкМ. **В, Г.** Кинетические кривые накопления продукта реакции при взаимодействии MBD4^{cat} с соответствующими субстратами. Концентрация субстрата изменяется от 0,25 до 6 мкМ. Концентрация фермента постоянна (4 мкМ).

Общий механизм удаления повреждения ферментом MBD4^{cat}

Основываясь на результатах эксперимента и последующих расчетов, можно предположить, каким процессам соответствуют определенные стадии кинетического механизма, описываемого Схемой 8. Так, стадия 1 ($k_{1/-}$), скорее всего, указывает на формирование неспецифического комплекса фермент-ДНК и движение по цепи с поиском поврежденного основания. В этом процессе прослеживается зависимость скорости от длины субстрата – чем больше нуклеотидов, тем медленнее поиск. На стадии 2 ($k_{2/-2}$) происходит «узнавание» субстрата и формирование каталитически компетентного комплекса. Стадия 3 – необратимый гидролиз N-гликозидной связи, стадия 4 – диссоциация фермента и продукта реакции – ДНК, содержащей AP-сайт.

Таблица 6. Значения кинетических параметров отдельных стадий механизмов взаимодействия MBD4^{cat} с разными субстратами.

	U/G12	U/G17	U/G28	F/G12	FaPu12
Схема	5	8	8	1	3
$k_1 \times 10^{-6}, \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$	0.5±0.2	12±3	7±2	11±4	0.48±0.02
$k_{-1}, \text{ c}^{-1}$	3.3±0.5	43±16	26±7	8±4	0.002±0.001
$k_2, \text{ c}^{-1}$	0.18±0.04	3±1	2.1±0.3	0.08±0.01	
$k_{-2}, \text{ c}^{-1}$	0.12±0.01	0.23±0.05	0.38±0.05	0.03±0.01	
$k_{\text{cat}}, \text{ c}^{-1}$		0.046±0.002	0.056±0.007		
$K_{\text{dis}} \times 10^6, \text{ M}$		0.15±0.02	0.10±0.02		

$K_{\text{dis}} = k_3/k_{-3}$

Сравнивая значения полученных констант скорости, можно проследить некоторые закономерности. Стадия первичного связывания (k_1) протекает несколько быстрее для субстрата U/G17. С ним же образуется и наиболее прочный комплекс (E·U)₁, вероятно, потому что концы семнадцатизвенного дуплекса находятся достаточно далеко от повреждения и не мешают связыванию. При этом, этот субстрат достаточно короткий, из-за чего вероятность связывания MBD4^{cat} с повреждением, а значит и дальнейшей реакции, увеличивается.

Таким образом, несмотря на принадлежность ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4 к разным структурным семействам Udg и HhH, соответственно, и разной организации активных центров, механизмы конформационных перестроек состоят из принципиально одинаковых стадий поиска повреждения и катализа.

ВЫВОДЫ

1. Методом «остановленного потока» по регистрации флуоресценции остатков триптофана в белках, 2-аминопурина и FRET-пары FAM/ВНQ1 в ДНК установлены кинетические механизмы конформационных переходов в процессе ферментативных реакций с участием урацил-ДНК-гликозилаз человека MBD4 и SMUG1. Показано, что в процессе взаимодействия происходят последовательные конформационные изменения как ферментов, так и ДНК-субстратов, которые приводят к взаимной адаптации структур взаимодействующих молекул и образованию каталитического фермент-субстратного комплекса.
2. Экспериментально показано, что замены F98W и H239A существенно снижают каталитическую активность SMUG1. На основании молекулярного моделирования сделан вывод о том, что замена Phe98 на Trp приводит к нарушению стэкинг-взаимодействия с урацилом в активном центре, затрудняя образование каталитической компетентной конформации. Мутация H239A уменьшает положительный заряд на поверхности ДНК-связывающего кармана, что должно ухудшать связывание белка с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК.
3. Показано, что замена SMUG1 R243A увеличивает каталитическую активность фермента, преимущественно, за счет снижения эффективности связывания продукта *N*-гликозилазной реакции. Данные, полученные с помощью моделирования, позволили предположить, что замена R243A приводит к потере некоторых межмолекулярных контактов с ДНК из-за изменения сети водородных связей с основанием, находящимся напротив повреждения.
4. Анализ конформационной динамики фермента MBD4 в сочетании с последовательным усложнением строения и длины ДНК-субстратов показали, что длина ДНК-субстрата влияет только на скорость поиска повреждения, но не на скорость дальнейших конформационных перестроек фермент-субстратного комплекса.
5. Установлено, что для SMUG1 и MBD4 механизмы конформационных перестроек состоят из принципиально одинаковых стадий поиска повреждения и катализа, несмотря на принадлежность ферментов к

разным структурным семействам и разной организации активных центров.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Яковлев Д. А. и др. Роль аминокислотных остатков Arg243 и His239 в процессе узнавания поврежденного нуклеотида урацил-ДНК-гликозилазой человека SMUG1 //Биохимия. – 2020. – Т. 85. – №. 5. – С. 695-705.
2. Iakovlev D. A. et al. The role of active-site residues Phe98, His239, and Arg243 in DNA binding and in the catalysis of human uracil-DNA glycosylase SMUG1 //Molecules. – 2019. – Т. 24. – №. 17. – С. 3133.
3. Kuznetsova A. A. et al. Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1 //Molecular BioSystems. – 2017. – Т. 13. – №. 12. – С. 2638-2649.
4. Яковлев Д. А. и др. Поиск поврежденных участков ДНК метил-СpG-связывающим ферментом MBD4 //Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2017. – Т. 9. – №. 1 (32).

Яковлев Данила Алексеевич.
Конформационная динамика урацил-ДНК-гликозилаз человека
SMUG1 и MBD4 в процессе взаимодействия с ДНК.
Формат 60×90/16, Усл. печ. л. 1,38
Цифровая печать. Тираж 100 экз.
Подписано в печать 19.05.2021. Заказ № 14-1905-1850.

ИП Бараненко Д. А. ИНН 783801303482
190068, г. Санкт-Петербург,
проспект Римского-Корсакова, д. 29, кв. 11

Отпечатано в КЦ «Комендантский»
Россия, г. Санкт-Петербург,
улица Гаккелевская, 34
тел.: 702-70-70