

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Коваль Владимир Васильевич

Динамическая пластичность ДНК-гликозилаз и эндонуклеаз в комплексах с ДНК: кинетические и структурные особенности

1.4.9. Биоорганическая химия

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Научный консультант: **Пышный Дмитрий Владимирович**
доктор химических наук, член-корреспондент
РАН

Официальные оппоненты: **Зверева Мария Эмильевна**
доктор химических наук, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова», химический
факультет, кафедра химии природных
соединений, профессор

Макаров Александр Александрович
доктор биологических наук, профессор, академик
РАН, ФГБУН Институт молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта Российской академии
наук, научный руководитель ИМБ РАН

Попов Владимир Олегович
доктор химических наук, профессор, академик
РАН, ФГУ «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»,
научный руководитель ФИЦ Биотехнологии РАН

Защита диссертации состоится «23» апреля 2024 г. в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 40, НИИФХБ, ауд. 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М. В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2886/>

Автореферат разослан « » февраля 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



Ю. Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Изучение детального механизма и динамических аспектов функционирования ферментов, взаимодействующих с ДНК, является актуальной задачей, решение которой вносит существенный вклад в структурную энзимологию. Фундаментальные знания о белково-нуклеиновом узнавании в надмолекулярных комплексах позволяют выявлять особенности и закономерности таких взаимодействий, создавать новые подходы к терапии и использовать ферменты как инструменты исследования и коррекции определенных биологических процессов.

В настоящее время наблюдается повышенный интерес к детальным механизмам и динамическим аспектам функционирования ферментов, взаимодействующих с ДНК (например, Dubrovin E.V. *Biophys. Rev.* 2023; Albesa-Jove D. *Curr Opin Struct Biol.* 2016; Campbell E. *Nat Chem Biol.* 2016;). Продвижение в данной области ассоциируется с появлением новых подходов к исследованию динамики биополимеров. К таким подходам относится создание современных установок для изучения кинетики ферментативных реакций, развитие методов компьютерного моделирования, улучшение микроскопических методов для исследования реакций на уровне одной молекулы и другие. Среди ДНК-узнающих белков существенный интерес вызывают ферменты репарации ДНК, поскольку в каждой эукариотической клетке ежедневно образуется примерно 10 тысяч AP-сайтов, что является значительной мутагенной нагрузкой для организма. ДНК-узнающие белки репарации относятся к различным структурным типам и участвуют в удалении из ДНК поврежденных нуклеотидов или разрывов цепей.

Поскольку информация о том, что заставляет ферменты репарации на самых начальных стадиях каталитического цикла инициировать взаимодействие с локальными небольшими повреждениями в гетероциклах нуклеотидов, расположенных во внутренних областях двойной спирали ДНК, была неполной или отсутствовала вовсе для отдельных ферментов, получение таких знаний было актуальным. По этой причине для важнейших ферментов репарации ДНК (Fpg, hOGG1, APE1, Apr1, hNEIL2) молекулярное моделирование и получение структурных характеристик фермент-субстратных комплексов является актуальным. Такая информация вносит существенный вклад в структурную энзимологию, что, в свою очередь, расширяет наши знания о белково-нуклеиновом узнавании в надмолекулярных комплексах. Исследование механизмов репарации кластерных повреждений и их регуляции также имеет практическое значение, поскольку эти механизмы напрямую связаны с исправлением повреждений ДНК, вносимых в терапевтических целях при радио- и химиотерапии, а возможность регуляции процессов репарации может повышать эффективность лечения.

Система CRISPR–Cas в настоящее время является доминирующей технологией редактирования генома в исследовательских лабораториях по всему миру благодаря своей эффективности, относительной точности и широкому спектру применения. Cas9 (CRISPR associated protein 9) — это управляемая при помощи РНК-гидов эндонуклеаза, связанная с адаптивной иммунной системой CRISPR у ряда бактерий, в частности *Streptococcus pyogenes*. Программируемые нуклеазы системы CRISPR–Cas нашли свое применение не только в геномике, они также используются для создания и оптимизации модифицированных клеточных линий с заданными функциями, для производства белков, в том числе и антител, для разработки терапевтических препаратов и др. Поэтому задача изучения механизмов узнавания и расщепления целевых последовательностей ДНК ферментами системы CRISPR–Cas с целью повышения эффективности их действия остается актуальным.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось установление структурно-динамического механизма узнавания ДНК-субстратов и реализации каталитической функции ферментами репарации и ферментами геномного редактирования.

Для достижения цели исследования решались следующие **задачи**:

1. Определить ключевые стадии механизма взаимодействия фермента Fpg *E. coli* при процессинге субстратов различной степени специфичности.
2. Выявить определяющие структурные факторы, влияющие на каталитическую эффективность ДНК-гликозилазы человека hOGG1 при удалении 8-охоG из ДНК-субстратов.
3. Дать структурное описание влияние остатка охоG-Clamp на процесс узнавания 8-оксогуанина в ДНК с помощью hOGG1.
4. Предложить и характеризовать подробный кинетический механизм реакции, катализируемой hAPE1 в процессе BER при взаимодействии с ДНК-субстратами (лигандами), различной степени специфичности.
5. Обосновать детальный механизм реакции расщепления ДНК-субстрата AP-эндонуклеазой человека hAPE1 в процессе инцизионной репарации нуклеотидов (NIR).
6. Получить и верифицировать 3D-структуру эндонуклеазы Apn1 из *S. cerevisiae* на основе данных компьютерного моделирования.
7. Предложить и характеризовать кинетический механизм ферментативной реакции, катализируемой ферментом Apn1 из *S. cerevisiae* при удалении AP-сайтов из ДНК
8. Получить 3D-структуру эндонуклеазы NEIL2 человека в растворе на основе данных по масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и молекулярного моделирования.

9. Определить ключевые стадии и термодинамические характеристики взаимодействия эндонуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes* с дцДНК-субстратом, определяющие скорость реакции расщепления ДНК.
10. Получить и верифицировать динамическую 3D-структуру комплекса эндонуклеазы Cas9 из *S. pyogenes* на основе масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и данных молекулярного моделирования.

Научная новизна. В настоящей работе для достижения поставленной цели исследования был применен комплексный методологический подход, включающий изучение кинетических характеристик взаимодействия между ферментом и субстратом, моделирование комплексов по методу молекулярной динамики и использования масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена для получения динамических структур. Используемый подход позволил достаточно подробно на структурном уровне описать динамическую подвижность изучаемых комплексов. Структурные основы узнавания в белково-нуклеиновых комплексах были изучены с применением масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена.

Предложен механизм взаимодействия фермента Fpg *E. coli* с ДНК при процессинге субстратов различной степени специфичности.

Установлен кинетический механизм реакции, катализируемой hAPE1 в процессе BER.

Впервые предложено структурное описание влияния остатка охoG-Clamp на узнавание 8-оксогуанина в ДНК с помощью hOGG1.

Впервые описан детальный кинетический механизм ферментативной реакции, катализируемой hAPE1, в контексте NIR.

Впервые предложена и верифицирована 3D-структура эндонуклеазы Arn1 из *S. cerevisiae*.

Впервые установлено, что для восстановления поврежденной геномной ДНК Arn1 может привлекаться путь NIR в случае функционального отказа ДНК-гликозилазы, что демонстрирует значимость Arn1 для различного типа повреждений, за исключением разрывов ДНК.

В ходе работы впервые структурно охарактеризована ДНК-гликозилаза hNEIL2, уникально специфичная для окисленных пиримидинов в неканонических субстратах ДНК, таких как «ДНК-пузыри» и локальные выпетливания.

Впервые предложена тонкая динамическая структура эндонуклеазы Cas9 из *S. pyogenes* на основе масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена и данных молекулярного моделирования.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В настоящей работе проведено исследование ферментов, относящихся к классу гликозилаз и эндонуклеаз в комплексах с каноническими и неканоническими субстратами.

В работе получены новые фундаментальные знания о механизмах активации альтернативных путей репарации с участием Apr1.

Новые данные об особенностях элементарных стадий, относящихся к узнаванию и связыванию AP-сайтов в ДНК формами фермента APE1 с аминокислотными заменами, могут быть полезны для создания фунгицидных агентов, что свидетельствует о практической значимости работы.

При исследовании структурной организации ДНК-гликозилазы hNEIL2 человека, фундаментально значимыми являются результаты, доказывающие, что открытая конформация, вероятно, благоприятна для свободного hNEIL2 в растворе. Подтверждена гипотеза о том, что hNEIL2 является конформационно гибким белком, что может быть связано с его участием в репарации неканонических структур ДНК и/или с участием в функциональных и регуляторных белок-белковых взаимодействиях.

Разработанные и оптимизированные методы для изучения структурной динамики больших белковых комплексов в растворе на примере белков hNEIL2 и его комплексов с субстратами, системы геномного редактирования Cas9 - как свободного фермента, так и его комплексов с одиночной направляющей РНК эндонуклеазы Cas9 (sgRNA) и ДНК-субстратами методом водородно-дейтериевого обмена с использованием масс-спектрометрии (HDX-MS) могут быть применены для характеристики стабильности таких глобулярных структур. Предложенный в исследовании подход комбинации методов обменной водородно-дейтериевой масс-спектрометрии, моделирования по гомологии и молекулярной динамики может быть использован для предсказания структуры в растворе сложных белково-нуклеиновых и белок-белковых комплексов, что актуально для структурной протеомики в целом. Полученные в исследовании результаты позволяют по-новому оценить природу механизмов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами и глубже понять фундаментальные основы процессов, обеспечивающих сохранение стабильности геномов живых организмов.

Основные положения, выносимые на защиту

- Взаимодействие ДНК-гликозилазы Fpg из *E. coli* с ДНК-субстратом, содержащими модифицированные 8-охоG нуклеотиды происходит в четыре элементарные стадии. Предложенные стадии процесса отражают связывание ДНК-субстрата с ферментом, узнавание повреждения с последующей корректировкой структуры ДНК и структуры молекулы фермента для достижения каталитически компетентной конформации. Стадия подстройки ДНК-дуплекса относительно медленная и за ней следуют быстрые стадии ферментативного катализа.
- Аминокислотный остаток Asn212 в hAPE1 выполняет ключевую роль в формировании нуклеофильной частицы, участвующей в процессе гидролиза фосфодиэфирной связи ДНК-субстрата. Введение в положении 212 белка

остатка аланина вместо аспарагина существенно на влияет на родство hAPE1 к ДНК-субстрату.

- Скорость расщепления с помощью hAPE1 субстрата, который содержит в последовательности ДНК остаток 5,6-DHU, по пути NIR сравнима по величине со скоростью разрезания с помощью hAPE1 в процессе BER ДНК-субстрата, содержащего AP-сайт. Этот факт подтверждает гипотезу об участии hAPE1 в NIR как о значимом процессе репарации ДНК.
- Внедрение аминокислотной замены Lys98Ala в молекулярную структуру фермента hAPE1 проявляет более выраженное воздействие на катализ в процессе NIR, по сравнению с влиянием на процесс BER.
- Распределение структур для FRET-комплекса ДНК (Cy3/Cy5) с hOGG1 указывает на то, что при изменении геометрии ДНК вследствие её связывания гликозилазой hOGG1 остатки красителей приобретают новые (в сравнении с комплексом без фермента) варианты локализации в малой бороздке и вне дуплекса.
- Добавление в реакционную систему остатка 8-BrG изменяет механизм реакции между 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой hOGG1 человека и ее субстратами 8-охоG и AP-сайтами в ДНК, изменяя скорость β-элиминирования.
- В активном центре нуклеазы Apr1 из дрожжей остаток His83, координирующий ионы Zn^{2+} в активном центре, играет решающую роль в каталитической стадии разрезания ДНК-субстрата.
- Белок hNEIL2 в свободном состоянии в растворе предпочитительно находится в открытой конформации. Характерная для позвоночных область NEIL2, содержащая протяженную инсерцию в N-концевом домене и отсутствующая в других ДНКгликозилазах, находится в растворе в неструктурированном состоянии.
- В случае коротких дуплексов, содержащих неканонические пары оснований, узнавание и связывание ферментом Cas9 дцДНК-субстратов определяет скорость реакции расщепления ДНК вне зависимости от термодинамических параметров, характеризующих «расплетание» ДНК.

Публикации и апробация работы

Результаты диссертационного исследования представлены в 26 публикациях в рецензируемых журналах, включенных в базы данных Web of Science и Scopus, а также в одном патенте Российской Федерации. Далее перечислены международные и российские научные конференции, на которых были представлены основные результаты работы: 47th FEBS Congress: Together in bioscience for a better future (Тур, Франция, 2023), 3rd International conference on hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (Лондон, Великобритания, 2022), VII съезд биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России (Сочи, 2022), 45th FEBS Congress: Molecules of Life: Towards New Horizons (Любляна,

Словения, 2021), II Объединенный научный форум «VI съезд физиологов СНГ и VI съезд биохимиков России» (Дагомыс, 2019); 43rd FEBS Congress: Biochemistry Forever (Прага, 2018); VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, 2017); Международная конференция «Химическая биология», посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016), V съезд биохимиков России» (Дагомыс, 2016), 44th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (Прага, 2015); 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, 2013); 8th International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids (Шеффилд, Великобритания, 2010); X International Conference on Environmental Mutagens (Флоренция, Италия, 2009).

Личный вклад автора

Результаты исследований были получены автором лично либо в соавторстве при непосредственном руководстве на всех этапах исследования. Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Имена соавторов по научным коллективам указаны в соответствующих публикациях. Работы по изучению динамики Fpg и hOGG1 выполнены совместно с Фёдоровой О. С., Кузнецовым Н. А., Невинским Г. А., Ищенко А. А., Лукиной М. В., Жарковым Д. О. ([10], [12], [14], [22-26]); работы по исследованию динамики APE1 и Apn1 выполнены совместно с Федоровой О. С., Тимофеевой Н. А., Канажевской Л. Ю., Дьяконовой Е. С. ([7-8], [11], [13], [15-18], [20-21]); цикл работ по HDX-масс-спектрометрии выполнен совместно с Черноносным А. А., Ждановой П. В., Барановой С. В., Жарковым Д. О. ([1-4], [6]). Компьютерное моделирование комплексов проведено совместно с Ломзовым А. А. и Ждановой П. В. ([1-11], [13]). Автор активно участвовал в планировании и организации экспериментов, систематизации и анализе экспериментальных данных, подготовке научных публикаций, а также представлении результатов исследований на научных конференциях.

Несколько фрагментов проведенного диссертационного исследования стали отправной точкой для создания новых научных тем, которые продолжают развитие данного научного направления.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 253 страницах, содержит 75 рисунков, 7 схем и 16 таблиц. Библиография включает 297 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Белково-нуклеиновое узнавание играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов и сохранении стабильности генома. ДНК-связывающие белки, участвующие в репарации, способны быстро и селективно узнавать свои нуклеиновые мишени благодаря способности биополимеров изменять конформацию. ДНК-связывающие белки систем репарации представляют собой большую группу белков, относящихся к различным структурным типам, задача которых заключается в удалении из ДНК повреждённых нуклеотидов или устранении разрывов цепей.

Действие различных эндогенных клеточных метаболитов и внешних факторов может вызывать в ДНК повреждения разного типа, исправляемые разными системами репарации. В клетках эукариот существует несколько основных способов восстановления структуры ДНК, среди которых важное место занимают эксцизионная репарация оснований (BER) и эксцизионная репарация нуклеотидов (NER). Система BER обеспечивает исправление наиболее многочисленных негромоздких повреждений ДНК, не приводящих к значительному искажению двойной спирали. Общий механизм BER включает в себя удаление поврежденного азотистого основания, остатка дезоксирибозы и фосфата и последующее восстановление вырезанного нуклеотида репликативным аппаратом клетки. Удаление поврежденного или неправильно спаренного основания осуществляется ДНК-гликозилазами. Для устранения повреждений путь BER требует последовательного действия двух ферментов - ДНК-гликозилазы и эндонуклеазы, при этом образуются генотоксичные интермедиаты, такие как AP-сайты и/или блокирующие синтез 3'-концевые группы, которые должны быть дополнительно элиминированы перед инициацией репарационного синтеза ДНК (Федорова и др. 2010, Биохимия, 75, 1377-1394). Система NER направлена на удаление из ДНК объемных аддуктов и повреждений, индуцированных УФ-облучением.

Повреждения ДНК, находящиеся на расстоянии не более двух витков спирали, относят к кластерным повреждениям. Одним из наиболее часто встречающихся в кластерах повреждений ДНК являются апуриновые/апиримидиновые сайты (AP-сайты), которые на уровне хроматина могут быть источником сшивок ДНК-белок или ДНК-ДНК и двойных разрывов в ДНК (Sczepanski et al, 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 22475–22480).

Наряду с системами BER и NER, существует альтернативный вариант репарации – инцизионная репарация нуклеотидов (NIR), протекающая без участия гликозилаз. Преимуществом этого пути является предотвращение образования генотоксичных интермедиатов. Помимо гликозилаз, важное значение в репарации имеют AP-эндонуклеазы, участвующие как в пути BER, так и в пути NIR. AP-эндонуклеаза APE1 человека разрезает дуплексы ДНК, содержащие пару 5,6-дигидроурацил (DHU) с 5'-конца повреждения по пути, не

зависящему от ДНК-гликозилазы. Структурно-динамическая информация о том, как AP-эндонуклеазы эукариот инициируют взаимодействие с повреждениями ДНК в процессе инцизионной репарации нуклеотидов NIR позволит глубже понять пластичность комплексов ДНК с AP-эндонуклеазами.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были выбраны: 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы – эукариотическая (OGG1) и прокариотическая (Fpg из *E. coli*), hNEIL2 – ДНК-гликозилаза, AP-эндонуклеазы - APE1 человека и её гомолог из дрожжей Apn1, а также эндонуклеаза Cas9.

Для определения структурных особенностей и конформационной динамики комплексов указанных ферментов с субстратами использовали следующие методы и подходы:

- сравнение взаимодействия с субстратами природных и мутантных форм белков Fpg, hOGG1, APE1 и Apn1, hNEIL2 и Cas9. Рекомбинантные белки и их мутантные формы были получены в системе бактерий *E.coli*.

- исследование кинетики быстрых реакций методом «остановленной струи» по изменению интенсивности флуоресценции остатков триптофана (Trp) в комплексах с субстратами и лигандами, 2-аминопурина (2-aPu) и дополнительных репортерных групп Cy3/Cy5 в ДНК для детекции конформационных переходов в молекулах ферментов и субстратов.

- моделирование методами молекулярной динамики структур белков и белково-нуклеиновых комплексов, полученных методом гомологического моделирования.

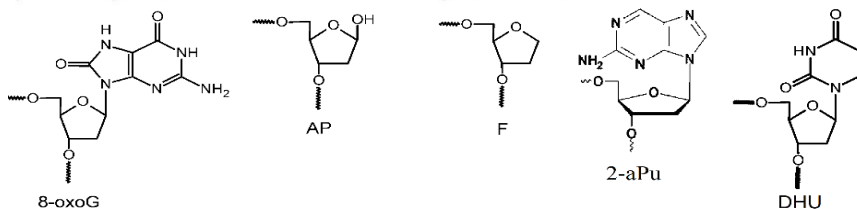
- масс-спектрометрический анализ уровня обмена иминопотонов в белках на дейтерий из буферного раствора в зависимости от конформации белковой молекулы.

- исследование конформационных переходов в комплексах белков с нуклеиновыми кислотами методом резонансного переноса энергии флуоресценции FRET.

- анализ активности ферментов по появлению продуктов реакции с использованием модифицированных олигонуклеотидов в качестве субстратов и лигандов. Последовательности использованных в работе олигонуклеотидов и их модификации представлены в таблице 1.

Таблица 1. Олигонуклеотидные модели, использованные в работе, и структура модифицированных оснований.

Обозн. модели	Нуклеотиды/модифицированные нуклеотиды	Последовательность
A	X = AP, F, G, oхoG	5' CTCTC X CCTTCC3'
B	X = AP, F, G, oхoG Y = 2-aPu	5' CTCTC XY CTTCC3'
C	X = AP, F, G, oхoG Y = 2-aPu	5' CTCTC YX CTTCC3'
D	X = AP, F, oхoG, G	5' -Cy3-CTCTC X CCTTCC 3' GAGAGCGGAAGG-Cy5
E	X = F	5' CTCTC-OH 5' p X CCTTCC
F	X = F, Y = 2-aPu	5' CTCT Y -OH 5' p X CCTTCC
G	X = F, Y = 2-aPu	5' CTCTC-OH 5' p YX CTTCC
H	X = C, F, AP, DHU	5' TGACTGCATA X GCATGTAGACGATGTGCAT
I	X = C, DHU; Y = 2-aPu	5' TGACTGCAT YX GCATGTAGACGATGTGCAT
J	X = C, DHU; Y = 2-aPu	5' TGACTGCATA XY CATGTAGACGATGTGCAT
K	X = F, DHU	5' TGACTGCATA 5' pd X GCATGTAGACGATGTGCAT



1. Взаимодействие ферментов репарации Fpg *E. coli* и OGG1 человека с ДНК-субстратами

Белки репарации Fpg из *E. coli* и hOGG1 относятся к классу 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаз. Эти ферменты вовлечены в гомологичные клеточные процессы и удаляют из ДНК-субстратов остатки 8-оксогуанина и другие поврежденные азотистые основания (см. обзор – Коваль и др., 2014, Acta Naturae, 6, 55-70). Эти ДНК-гликозилазы катализируют разрыв N-гликозидной связи с образованием свободного модифицированного основания, а затем – фосфодиэфирной связи со стороны 3'- атома углерода остатка 2'-дезоксирiboзы путем β-элиминирования, образуя в ДНК одноцепочечный разрыв. Кроме того, фермент Fpg способен осуществлять вторую реакцию γ-элиминирования фосфата со стороны 5'-атома углерода, что приводит к удалению остатка 2'- дезоксириboзы (Коваль и др., 2014, Acta Naturae, 6, 55-70). Поэтому, эффективная дискриминация элементарных стадий реакций является критически важной задачей.

1.1. Взаимодействие Fpg *E. coli* с ДНК-субстратами

Известно, что Fpg эффективно удаляет 8-охоG не только из олигонуклеотидов в составе двуцепочечного комплекса, но и из одноцепочечных олигонуклеотидов. Было показано, что константа Михаэлиса для одноцепочечных олигонуклеотидов в 12-170 раз выше, чем для соответствующих олигонуклеотидов в составе комплементарных двуцепочечных комплексов. Для понимания кинетического механизма удаления 8-охоG из ДНК-субстрата, была использована методология остановленного потока, позволяющая детектировать конформационные изменения фермента по изменению флуоресценции остатков Trp в белке в режиме реального времени. Поскольку Fpg специфически взаимодействует с последовательностью из 10 пар оснований, в работе детектировали изменение флуоресценции Fpg при связывании с субстратом - 12-звенным комплементарным модельным дуплексом А (Таблица 1), содержащим 8-охоG нуклеотид (А/8-охоG). Такой подход позволил определить число интермедиатов, промежуточных стадий и скорость появления/исчезновения этих интермедиатов. Было обнаружено, что флуоресценция Fpg быстро снижалась непосредственно после смешивания с субстратом А/8-охоG, после чего медленно повышалась в интервале времени 2-100 с. На Рис. 1 приведен пример кинетических кривых, отражающих изменения флуоресценции остатков Trp фермента в процессе взаимодействия с субстратом А/8-охоG.

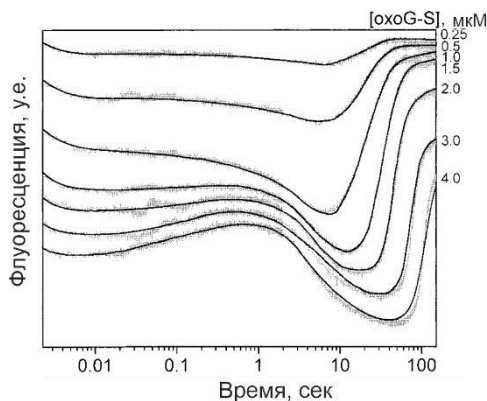


Рис. 1. Кинетика взаимодействия Fpg с ДНК-субстратом с 8-охоG. Данные представлены как изменение флуоресценции остатков Trp фермента. Концентрацию субстрата варьировали от 0,25 до 4,0 мкМ. Концентрация белка в экспериментах составляла 1,5 мкМ.

Анализ конформационных переходов фермента позволил определить константы скоростей элементарных стадий. Начальные две фазы представляют равновесные процессы, первый из которых описывает бимолекулярную стадию связывания, а второй образование апуринового сайта. Третьей необратимой стадией является β -элиминация. Четвертая фаза отражает δ -элиминацию и декомпактизацию комплекса фермент/продукт между Fpg и выщепленным 8-охоG. Вторая, третья и четвертая фазы могут быть описаны экспоненциальными функциями. Эти данные являются непосредственным доказательством

конформационных переходов в молекуле Fpg при реализации каталитических процессов.

Константы скорости первой (k_1, k_{-1}) и второй (k_2, k_{-2}) стадий реакции ранее были определены для интервала времени взаимодействия 2-20 мс и 100 мс – 2 с, соответственно. Для расчета скорости образования продукта на стадии 4 (k_4) использовали данные кинетики разрезания субстрата ohoG, полученные при разделении продуктов реакции в ПААГ. Стадия 4 характеризуется наименьшей константой скорости и может представлять собой финальный каталитический шаг. Продукт может находиться в равновесии между свободной и связанной с ферментом формами. Для всех стадий реакции были рассчитаны константы скорости, равновесная константа ассоциации K_{EP} фермента с продуктом реакции (Таблица 2).

Таким образом, были определены константы скорости многостадийного взаимодействия Fpg со специфическим субстратом.

Таблица 2. Константы скорости реакции взаимодействия Fpg со специфическим ДНК-субстратом ohoG при 25°C.	
Константа скорости	Численное значение
$k_1 (M^{-1}, s^{-1})$	$(3,2 \pm 0,3) \times 10^8$
$k_{-1} (s^{-1})$	$(8,9 \pm 1,0) \times 10^2$
$k_2 (s^{-1})$	12 ± 1
$k_{-2} (s^{-1})$	10 ± 1
$k_3 (s^{-1})$	$0,16 \pm 0,01$
$k_4 (s^{-1})$	$0,10 \pm 0,01$
$K_{EP} (M^{-1})$	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^5$

Далее, были исследованы особенности AP-лиазной активности Fpg. AP-сайты существенно дестабилизируют термодинамику ДНК-дуплекса и повышают гибкость ДНК. Помимо изменения конформации фермента в процессе взаимодействия с субстратом, Fpg также индуцирует изгибание ДНК-субстрата и локальное плавление дуплексов, необходимое для принятия конформации, оптимальной для катализа. Можно предположить, что ДНК-дуплекс, содержащий тетрагидрофуран (F), который узнается, но не расщепляется Fpg, будет претерпевать конформационные изменения при связывании с Fpg.

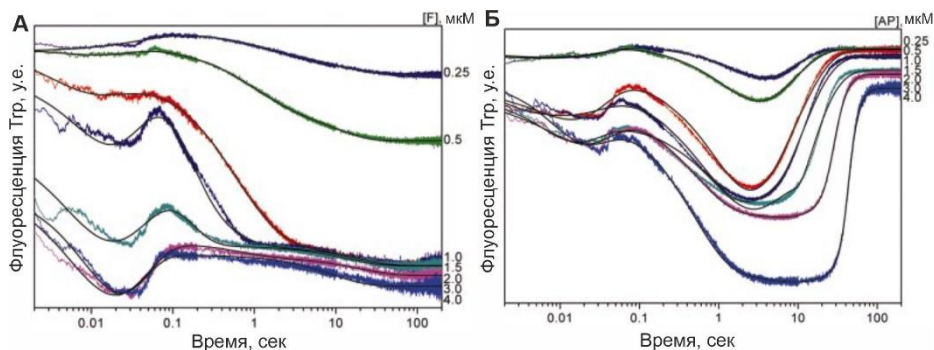
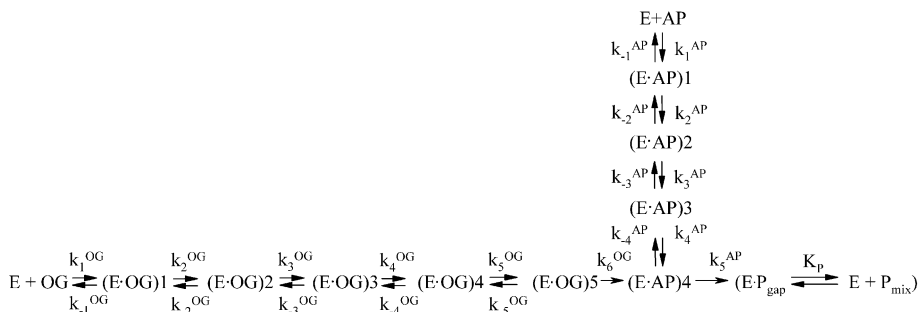


Рис. 2. Кинетика взаимодействия Frg с двуцепочечными дуплексами, содержащим тетрагидрофуран - A/F (А) и природный AP-сайт –A/AP (Б). Данные представлены как изменение флуоресценции остатков Trp фермента. Концентрацию субстрата варьировали от 0,25 до 4,0 мкМ. Теоретические кривые изображены гладкими линиями. Концентрация белка в экспериментах составляла 1,5 мкМ.

Связывание Frg с ДНК реализуется через стадию формирования неспецифического узнающего комплекса. В случае дуплекса, содержащего F, следующим шагом является уже специфическое связывание без реализации расщепления. Для детального исследования элементарных стадий процесса, был проведен анализ взаимодействия Frg с F-лигандом и субстратом, содержащим AP-сайт (A/AP). На рисунке 2 представлены кинетические кривые взаимодействия Frg с дуплексами в условиях однооборотной реакции. В случае лиганда F, можно видеть зависимое от времени уменьшение интенсивности флуоресценции остатков Trp фермента, и это уменьшение положительно коррелировало с увеличением концентрации субстрата (Рис. 2А). Характер кривых, в соответствии с теоретической моделью, отражает наличие как минимум четырех стадий взаимодействия. При анализе связывания и расщепления субстрата A/AP, была обнаружена дополнительная стадия, по сравнению с F-дуплексом, относящаяся к промежутку 10-100 с и соответствующая минимальному значению флуоресценции Frg (Рис. 2Б). Поскольку в условиях избытка субстрата ($>1,5$ мкМ) отрезок кривой в этой области становится линейным, это демонстрирует существование дополнительной стадии. На начальных участках, характер кривых для дуплексов F и AP совпадал. На основании полученных данных можно заключить, что стадии 1-4 отражают формирование первичного комплекса и конформационную коррективку в процессе выворачивания модифицированного нуклеотида. Заключительная пятая стадия характеризуется константой скорости k_5^{AP} и соответствует вырезанию модифицированного рибозного остатка и формированию двух отдельных олигонуклеотидов. Увеличение интенсивности флуоресценции в финальных сегментах кривых для AP-дуплекса отражает выход фермента из комплекса с продуктом (P_{gap}), далее представляющем собой смесь

трех отдельных олигонуклеотидов (P_{mix}). На основании полученных результатов, была предложена полная кинетическая схема, описывающая взаимодействие Frg *E. coli* с различными субстратами (Схема 1).

Схема 1. Унифицированная схема связывания и разрезания любого субстрата гликозилазой Frg. OG – субстрат, содержащий 8-охоG, AP – субстрат, содержащий AP-сайт.



Таким образом, кинетический анализ взаимодействия Frg из *E. coli* с олигонуклеотидным дуплексом A/AP, содержащим AP-сайт или его нерасщепляемый аналог, выявил наличие четырех стадий взаимодействия фермента с субстратом в интервале времени 2 мс – 10 с. Указанные стадии отражают связывание фермента с ДНК и узнавание повреждения с взаимной корректировкой структур биополимеров для достижения каталитически компетентной конформации комплекса.

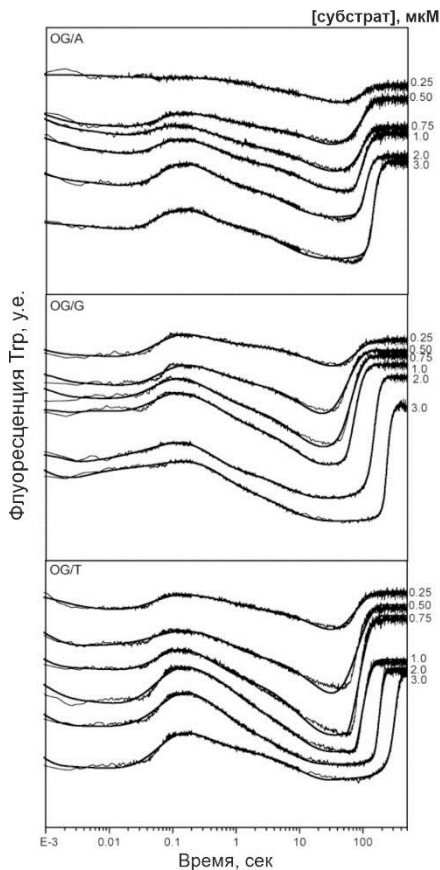


Рис. 3. Кинетика взаимодействия Frg с ДНК-субстратами, содержащими А (OG/A), G (OG/G) и Т (OG/T) напротив 8-охоG. Приведены экспериментальные (шероховатые) и теоретические (гладкие) кривые. Экспериментальные данные представлены как изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp белка.

напротив поврежденного основания располагались А, G или Т. Происходящие с ферментом конформационные изменения при взаимодействии с двуцепочечными ДНК субстратами отражают кинетические кривые на Рис. 3.

Константы скорости индивидуальных стадий реакции были рассчитаны с учетом теоретической модели и полученных ранее данных для 8-охо-G•С субстрата. Сравнение индивидуальных констант скорости для схемы с пятью стадиями (Схема 1) показало, что для дискриминации основания напротив повреждения наиболее важна вторая стадия, характеризующаяся константами k_2 и k_{-2} . Предпочтение Frg к основанию, находящемуся напротив 8-охоG было следующим: $C \gg T \approx A \approx G$. Общая константа связывания K_{bind} для охоG/С составляет 200 мкМ^{-1} против $16\text{-}24 \text{ мкМ}^{-1}$ для других дуплексов. Полученные результаты были подтверждены данными анализа продуктов расщепления соответствующих субстратов в ПААГ.

1.2. Кинетика узнавания и разрезания субстрата ферментом hOGG1

При исследовании кинетики взаимодействия ДНК-гликозилазы человека hOGG1 с ДНК-дуплексом А (Таблица 1), содержащим 8-охоG напротив С обнаружено, что конверсия 8-охоG включает как минимум пять различных стадий, которые детектируются по изменению флуоресценции остатков триптофана фермента (Рис. 4). Эксперименты проводили в условиях однооборотной реакции.

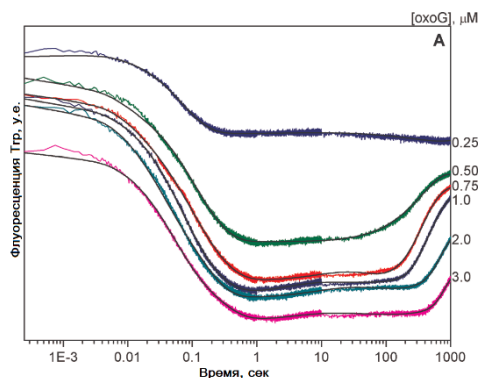


Рис. 4. Кинетика взаимодействия hOGG1 с ДНК-субстратом, содержащим 8-охоG. Данные исследования методом остановленной струи представлены как изменение флуоресценции остатков Trp фермента. Концентрацию субстрата варьировали от 0,25 до 3,0 мкМ. Концентрация белка в экспериментах составляла 1,5 мкМ.

Сначала следуют три равновесные стадии, далее две медленные стадии и заключительная равновесная стадия. Взаимодействие hOGG1 с субстратом, содержащим AP-сайт происходило в некаталитическом режиме с очень низким уровнем β -элиминации, наблюдаемым в течение первых 1000 с реакции (Рис. 4). Вторая необратимая стадия является лимитирующей стадией всего процесса. Сравнивая кинетические данные изменения флуоресценции hOGG1 и анализируя накопление расщепленных продуктов в ПААГ, было показано, что необратимыми стадиями в кинетической схеме процесса взаимодействия hOGG1 с охоG-субстратом соответствуют расщепление N-гликозидной связи поврежденного нуклеотида и β -элиминация его 3'-фосфатной группы. Быстрые равновесные стадии соответствовали конформационным изменениям фермента в процессе распознавания 8-охоG, а заключительная равновесная стадия - связыванию ферментом продукта реакции.

1.2.1. Влияние свободного модифицированного основания, аналога гуанина 8-BrG, на взаимодействие hOGG1 с ДНК-дуплексами с AP-сайтом и повреждением 8-охоG, расположенными напротив цитозина

Для ДНК-гликозилаз и ДНК-полимераз характерны конформационные переходы между открытым и закрытым комплексом, которые реализуются в несколько элементарных стадий. Подобные переходы hOGG1, вероятно, претерпевает при связывании субстрата и, далее, при акте каталитического расщепления. Такое поведение иллюстрирует концепцию динамической модели ферментативного катализа, в которой конформационные перестроения в

молекуле фермента запускают конверсию субстрата в продукт. Согласно структурным данным (Fromme J., et al., 2003), отрыв протона от С2' атома является необходимой стадией для инициирования β-элиминирования, которая может быть катализована высвобожденным из реакции окисленным основанием непосредственно после разрыва гликозидной связи. Для проверки этой гипотезы, в реакции с hOGG1 добавляли свободный 8-бромгуанин (8-BrG), аналог гуанина, замещенный по положению С8, и анализировали накопление продуктов реакции при разделении реакционной смеси в ПААГ (Рис. 5).

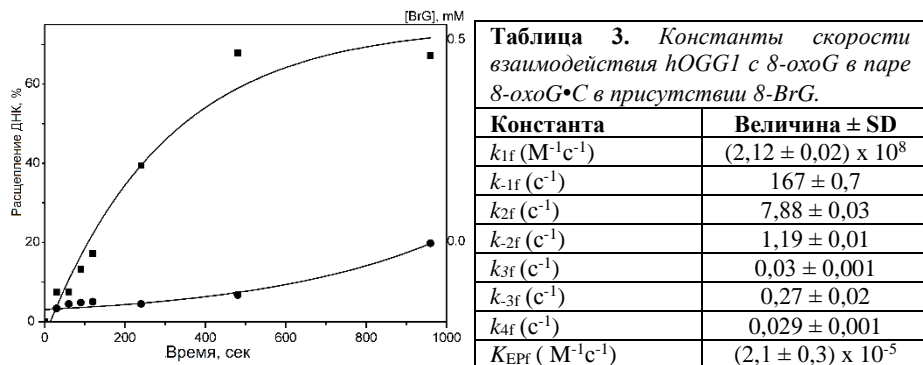


Таблица 3. Константы скорости взаимодействия hOGG1 с 8-охоG в паре 8-охоG•C в присутствии 8-BrG.

Константа	Величина ± SD
k_{1f} ($M^{-1}c^{-1}$)	$(2,12 \pm 0,02) \times 10^8$
k_{-1f} (c^{-1})	$167 \pm 0,7$
k_{2f} (c^{-1})	$7,88 \pm 0,03$
k_{-2f} (c^{-1})	$1,19 \pm 0,01$
k_{3f} (c^{-1})	$0,03 \pm 0,001$
k_{-3f} (c^{-1})	$0,27 \pm 0,02$
k_{4f} (c^{-1})	$0,029 \pm 0,001$
K_{EPf} ($M^{-1}c^{-1}$)	$(2,1 \pm 0,3) \times 10^{-5}$

Рис. 5. Усиление AP-лиазной активности hOGG1 в отношении субстрата 8-охоG•C в присутствии 8-BrG. Кинетические кривые накопления продукта (расщепленного дуплекса ДНК) по данным разделения продуктов реакции в ПААГ.

Можно видеть, что hOGG1 разрезает получившийся в результате N-гликозилазной реакции AP-сайт очень медленно, но добавление 8-BrG существенно ускоряет реакцию.

Для уточнения кинетического механизма стимуляции ферментативной активности hOGG1 аналогом гуанина 8-BrG при взаимодействии с 8-охоG•C и AP-содержащими субстратами детектировали изменение флуоресценции Trp hOGG1. Дополнительно детектировали изменение флуоресценции 2-aPu в составе субстратов. При кинетической обработке кривых флуоресценции триптофанов белка, полученных для взаимодействия hOgg1 с дуплексом, содержащим охоG (олигонуклеотид типа А, Таблица 1), было выявлено, что константа скорости расщепления AP-сайта $k_{4f} = 0,029 c^{-1}$, что в 5 раз выше, чем для реакции в отсутствие 8-BrG ($0,006 c^{-1}$) (Таблица 3).

Также были получены кинетические кривые взаимодействия для дуплексов, содержащих 2aPu рядом с повреждением (дуплексы, содержащие олигонуклеотиды типа В из таблицы 1), при этом были зарегистрированы конформационные переходы как для фермента (используя внутреннюю

флуоресценцию остатков Trp белка), так и ДНК-дуплексов, регистрируя изменения в флуоресценции 2-аPu. На Рис. 6А представлены отдельные кривые изменения флуоресценции фермента и субстратов при добавлении 8-BrG в реакцию. Можно видеть, что основные изменения флуоресценции фермента происходят в промежутке времени, превышающем 100 с. В случае добавления в реакцию 8-BrG, две необратимые стадии – отщепление основания и β-элиминирование, заменяются одной необратимой стадией, характеризующейся константой скорости k_d . Значения k_d , определенные из кинетических кривых по изменению флуоресценции 2-аPu и Trp, составили $0,0070 \text{ с}^{-1}$ и $0,0077 \text{ с}^{-1}$, соответственно.

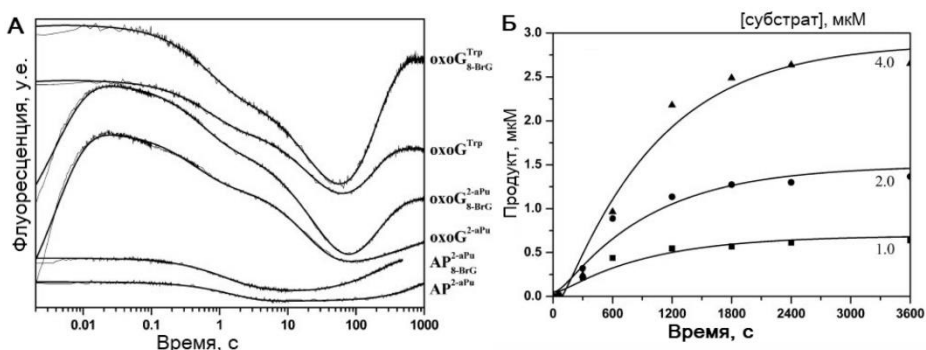


Рис. 6. 8-BrG изменяет механизм реакции hOGG1 с ДНК-субстратами, содержащими 8-охоG и AP-сайт. (А) Кинетика изменения флуоресценции остатков Trp фермента hOGG1 или флуоресценции 2-аPu субстратов в ходе реакции. Концентрация ДНК-субстратов 1 мкМ и фермента 2 мкМ. (Б) Кинетика образования продукта AP-лиазной реакции из 8-охоG/C субстрата в присутствии 8-BrG (0,5 мМ).

Прямой анализ образующихся расщепленных продуктов ДНК в реакции в присутствии 8-BrG проводили методом их разделения в ПААГ (Рис. 6Б). Кривые накопления продуктов реакции позволили рассчитать константу скорости необратимой стадии $k_{elim}=0,012 \text{ с}^{-1}$, что превышало значение константы, полученной на основе данных изменения флуоресценции. Скорость β-элиминирования 8-охоG из субстрата была, как минимум, в 2 раза выше в присутствии 8-BrG.

Предположительно, при высокой концентрации 8-BrG, он эффективно связывается рядом с активным центром hOGG1, и далее этот комплекс связывает AP-сайт, как и свободный фермент, но реакция расщепления происходит быстрее при участии 8-BrG. Когда hOGG1 взаимодействует с 8-охоG-субстратом и расщепляет N-гликозидную связь, 8-охоG может как задерживаться в активном центре, так и быстро замещаться свободным 8-BrG. Полученные данные продемонстрировали, что 8-BrG влияет на скорость β-элиминирования,

осуществляемого hOGG1, а не на кинетику взаимодействия фермента и ДНК субстрата до стадии расщепления.

1.2.2. Процессинг повреждений ДНК мутантными формами hOGG1

Для понимания динамических аспектов узнавания и процессинга ДНК-субстрата ферментом, были сконструированы мутанты hOGG1 с заменой Cys253 на Leu или Ile. В hOGG1 Cys253 формирует “стенку” кармана, связывающего основание, а при замене Cys253 на объемные Leu или Ile активный центр блокируется. Структура активного центра фермента с заменами Cys253 на Leu или Ile была моделирована методами молекулярной динамики (Рис. 7), на основании чего было высказано предположение, что дополнительный стерический объем и неспособность формировать дипольную связь Cys253-Lys249 может вести к вытеснению 8-охоG из кармана и дестабилизировать процесс его вырезания, но не исключать взаимодействие фермента с AP-сайтом, полученном в результате первой стадии работы фермента.

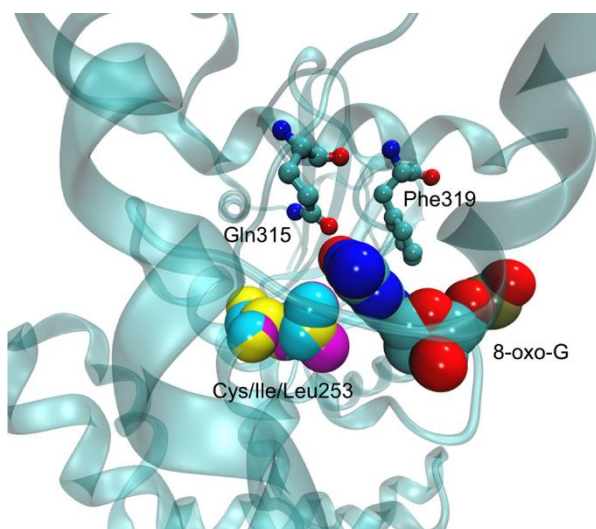


Рис. 7. Молекулярное моделирование структуры активного центра мутантной hOGG1 с заменами Cys253 при взаимодействии с повреждением 8-охоG в ДНК-субстрате.

Взаимодействие мутантных форм hOGG1 C253L и C253I с 8-охоG субстратом изучали методом остановленной струи. На Рис. 8 представлены кинетические кривые изменения флуоресценции остатков триптофанов фермента.

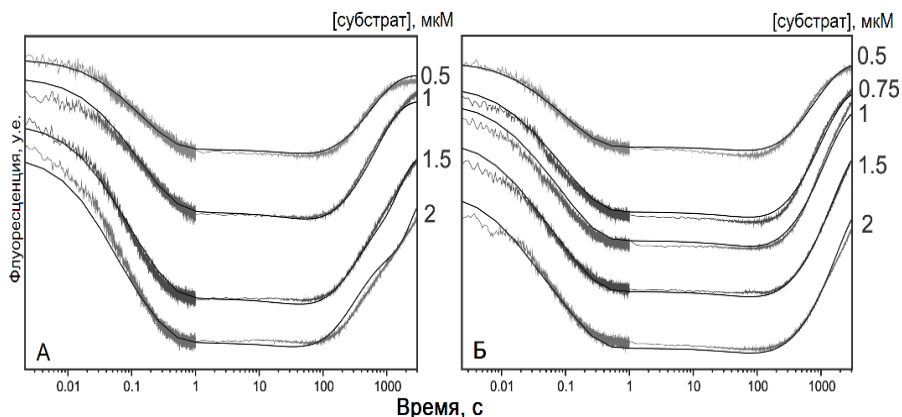


Рис. 8. Кинетика взаимодействия C253L (А) и C253I (Б) вариантов hOGG1 с ДНК-субстратом, содержащим 8-охоG. Концентрацию субстрата варьировали от 0,5 до 2,0 мкМ. Концентрация белка в экспериментах составляла 1,0 мкМ.

Можно видеть, что общий вид кривых для мутантов Leu253 и Ile253, а также для природной формы hOGG1^{wt} фермента практически совпадает (см. Рис 4). Быстрое начальное снижение флуоресценции соответствует стадии образования комплекса с субстратом, а увеличение флуоресценции на заключительной стадии соответствует выходу продукта из фермент-субстратного комплекса. Для дикого типа фермента и мутантов были рассчитаны константы скорости (Таблица 4) стадий взаимодействия с субстратом.

Таблица 4. Константы скорости взаимодействия природного hOGG1 и его мутантных форм Leu253 и Ile253 с субстратом, содержащим 8-охоG.

Константа	hOGG1 ^{wt}	Leu253 hOGG1	Ile253 hOGG1
k_1 (M ⁻¹ c ⁻¹)	$(260 \pm 10) \times 10^6$	$(28,5 \pm 1,3) \times 10^6$	$(13,8 \pm 0,6) \times 10^6$
k_{-1} (c ⁻¹)	130 ± 1	$5,7 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,3$
k_2 (c ⁻¹)	$13,3 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,4$
k_{-2} (c ⁻¹)	$1,16 \pm 0,02$	$5,2 \pm 0,02$	$2,9 \pm 0,2$
k_3 (c ⁻¹)	$0,012 \pm 0,001$	$0,0116 \pm 0,0005$	$0,0163 \pm 0,0006$
k_{-3} (c ⁻¹)	$0,07 \pm 0,01$	$0,0045 \pm 0,0003$	$0,0082 \pm 0,0004$
k_4 (c ⁻¹)	$0,06 \pm 0,02$	$0,0042 \pm 0,0003$	$0,0046 \pm 0,0002$
K_P (M)	$8,8 \times 10^{-7}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-7}$

Константа скорости необратимой стадии k_4 была в 15 раз меньше для форм белка с введенными аминокислотными заменами по сравнению с ферментом дикого типа. Константа скорости k_4 наиболее вероятно соответствует стадии образования AP-сайта на месте поврежденного основания, после чего следует стадия выхода ДНК из комплекса с ферментом. Общая константа ассоциации K_a ,

рассчитанная по полученным кинетическим константам для трех равновесных стадий, составила $1,9 \cdot 10^7$ и $1,6 \cdot 10^7$ M^{-1} для hOGG1 C253I и hOGG1 C253L соответственно, и это всего в 1,5 раза ниже, чем для фермента дикого типа. фермент ($2,9 \cdot 10^7$ M^{-1}) (Таблица 4). Мы показали, что, обе мутации: C253I и C253L, в-основном, влияют на эффективность катализа фермента hOGG1. Эти замены не оказывают влияния на сродство фермента к ДНК-продукту или его способность изгибать цепь ДНК в предкаталитическом комплексе.

При моделировании взаимодействия в узнающем кармане, как и ожидалось, показано, что объемные заместители в мутантных формах фермента замещают 8-охоG (Рис. 9). В случае Ile253 hOGG1 происходит перекрытие области Phe319 и планарного кольца 8-охоG на 80%, тогда как для Leu253 hOGG1 перекрытие происходит на 20%. Можно видеть, что наибольшему искажению в ДНК при взаимодействии с мутантными белками подвергается цитозин, комплементарный 8-охоG (dC⁰ на рис. 9Б) и нуклеотид dT⁽⁻¹⁾. Несмотря на то, что заполнение связывающего кармана поврежденным азотистым основанием для мутантов Leu253 и Ile253 дестабилизирует активный центр hOGG1 со связанным субстратом и существенно снижает способность фермента к катализу, присутствуют остаточные способности к узнаванию и выщеплению поврежденного основания.

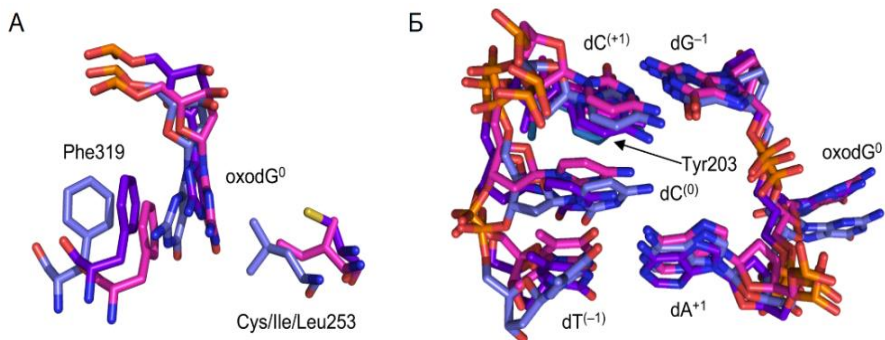


Рис. 9. Моделирование перекрытия структур остатков нуклеотидов в активном центре hOGG1.

Наиболее вероятно, это связано с внутренней пластичностью белка и существенной энергетической выгодой выворачивания 8-охоG когда фермент уже связался с субстратом.

1.2.3. Динамика репарации 8-охоG под действием hOGG1 (регистрация FRET-флуоресценции)

Для детекции изменений флуоресценции при взаимодействии фермента с субстратом методом FRET использовали модифицированный субстрат, несущий

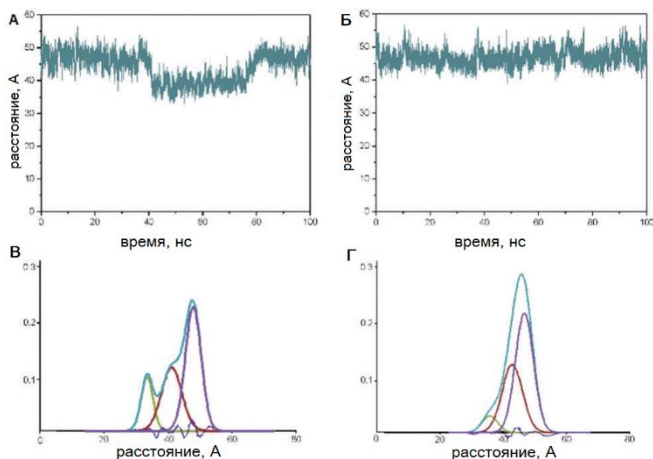


Рис. 10. Расстояние между центральными атомами углерода в мотиве Су3/Су5 в процессе моделирования взаимодействий в комплексе hOGG1 с ДНК-дуплексом 8-охоG- Су3/Су5 (А) и ДНК в отсутствие фермента (Б). (В) и (Г) – вероятности распределения для А и Б, соответственно.

флуоресцентные группы Су3 и Су5 на 5'-концах комплементарных цепей ДНК-субстрата (Субстрат D из таблицы 1) Введение этих групп стабилизировало дуплекс, содержащий 8-охоG, и увеличивало температуру его плавления с 45.2°C до 47.2°C. Интенсивность FRET зависит от целого ряда факторов, но изменения FRET сигнала строго коррелирует с расстоянием между флуорофорами. На рис. 10А представлена траектория изменения дистанции между центральным углеродным атомом в Су3 и Су5 в составе ДНК-дуплекса, взаимодействующего с hOGG1. Анализ возможного расположения красителей позволил идентифицировать три стабильных значения расстояния между этими углеродными атомами – 33 Å, 40 Å и 47 Å (Рис. 10 В). Взаиморасположение Су3/Су5 в ДНК-дуплексе без добавления фермента отличалось от такового в присутствии фермента, и расстояние между ними составляло 48 Å (Рис. 10 Б и Г), что доказывает наличие существенного изгиба ДНК в комплексе с hOGG1.

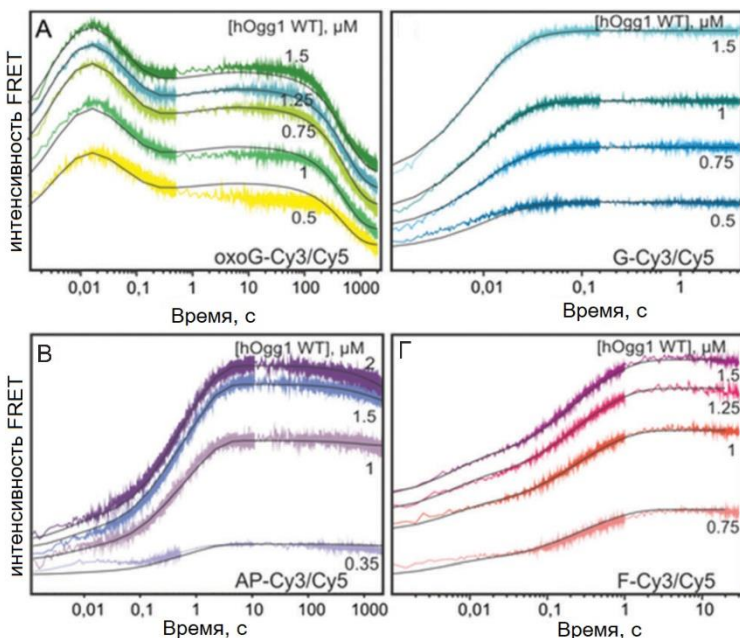


Рис. 11. Влияние различных ДНК-субстратов (А-Г) на кинетику изменения интенсивности FRET при взаимодействии с белком hOGG1^{wt} дикого типа.

Для анализа взаимодействия hOGG1^{wt} с ДНК использовали модельные дуплексы, содержащие 8-охоG (Рис. 11А), неповрежденное основание (Рис. 11Б), AP-сайт (Рис. 11В) и тетрагидрофуран (F) (Рис. 11Г). Изменения флуоресценции субстрата отражали последовательные конформационные изменения в структуре ДНК в ходе каталитического цикла. Можно видеть, что на ранних временах (до 0,1 с) для всех исследуемых субстратов происходило увеличение сигнала FRET, что соответствовало стадии начального неспецифического связывания с ДНК. При взаимодействии с неповрежденным основанием, сигнал FRET возрастал на протяжении 0,2 с, и в дальнейшем изменений уже не происходило (Рис. 11Б). В случае взаимодействия с 8-охоG-дуплексом, на начальном участке кривой за увеличением интенсивности флуоресценции происходит быстрое снижение уровня сигнала (Рис. 11А). Такое падение было обнаружено только для специфического субстрата 8-охоG, что соответствует специфическому узнаванию поврежденного основания и его выворачиванию в связывающий карман фермента. Завершающим событием является медленное падение интенсивности флуоресценции, отражающее расщепление цепи ДНК в процессе AP-лиазной реакции, локальное расхождение цепей ДНК в области образования продукта и его диссоциация из комплекса с ферментом. Математическая обработка полученных кинетических кривых показала, что в случае природного

AP-сайта, связывание фермента с субстратом происходило как минимум в три раза эффективнее, чем в случае нерасщепляемого F-сайта. Разница в узнавании ферментом заместителя в 1'-положении дезоксирибозы подтверждает гипотезу о важности структурной пластичности в процессе подстройки активного центра к субстрату.

Для того, чтобы оценить роль отдельных аминокислотных остатков в координации поврежденного основания 8-оксо-G в активном центре hOGG1, с использованием мутагенеза был создан мутантный белок hOGG1, содержащий единичную аминокислотную замену глутамина на триптофан (Q315W) в области связывающего кармана. Аминокислота Gln315 отвечает за правильное позиционирование 8-охоG в активном центре hOGG1, а замена глутамина на триптофан ведет как к изменению размера аминокислотного остатка, так и его химической природы – полярной группы на ароматическую.

Было проведено молекулярное моделирование структуры комплекса hOGG1 Q315W с ДНК-дуплексом, содержащим 8-охоG. Согласно полученным данным, боковая группа Trp315 частично занимает собой активный центр фермента, тем самым препятствуя попаданию в активный центр поврежденного основания. Результатом такого взаимодействия становится сближение 8-охоG и гистидина His270. Такие изменения дестабилизируют активный центр фермента. Ароматическое кольцо Trp315 вступает в стэкинг-взаимодействия с Phe319, уменьшая пространство, необходимое 8-охоG для взаимодействия с активным центром. Достаточно стабильного состояния структура достигает в случае, когда 8-охоG находится в стэкинге с Phe319 и Trp315, формируя тройной сэндвич.

Таким образом, замена Gln315 на Trp препятствовала полностью выворачиванию 8-охоG из двойной спирали и точному связыванию в активном центре, что вело к снижению N-гликозилазной и последующей AP-лиазной активности. Анализ кинетических кривых флуоресценции остатков триптофанов белка для формы hOGG1 Q315W продемонстрировал, что отсутствуют изменения, характерные для фермента дикого типа и мутантных форм с заменой C253I и C253L

2. Узнавание ДНК-субстратов апуриновой/апириmidиновой эндонуклеазой человека APE1. Структурные и динамические особенности

Ранее уже было показано, что фермент APE1 участвует как в репарации BER, так и в репарации по пути NIR. В случае пути NIR фермент APE1 расщепляет фосфодиэфирную связь с 5'-стороны от поврежденных дезоксирибонуклеотидов с образованием на 3'-конце разрыва – гидроксильной группы, а на 5'-конце – фосфатной (Saparbaev et al, 2004, NAR, 32, 73-81). Также известно, что для каталитического гидролиза фосфодиэфирной связи AP-ДНК ферментом APE1 необходимы ионы магния, а именно, задействованы два иона Mg^{2+} . Сама реакция протекает по кислотно-основному $S_N2(P)$ механизму. Регистрация структурной динамики узнавания субстратов

апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазой человека APE1 входила в задачи исследования.

2.1. Предстаационарная кинетика взаимодействия APE1 с AP- и F-содержащими субстратами

Кинетику превращения AP- и F-содержащих ДНК-субстратов, а также сравнение с взаимодействием с ДНК-дуплексом без поврежденных оснований (NS-лиганд) под действием APE1 исследовали в условиях однооборотной реакции по изменению флуоресценции остатков Tgr в сравнении с неспецифическим субстратом без повреждений (NS-лиганд). Кинетические кривые интенсивности флуоресценции Tgr на Рис. 12 для субстрата AP (Рис. 12А) имеют четыре перехода: снижение флуоресценции, участок, близкий к линейному, увеличение флуоресценции и выход на плато (линейный участок). Характер кривых имеет сходство с кривыми кинетики взаимодействия Frg с субстратом AP (Рис. 2Б), однако динамика реакций значительно отличается в соответствии со специфичностью субстратов. На ранних временах снижение флуоресценции Tgr APE1 (1–5 мс) соответствует начальному взаимодействию фермент-субстрат, с узнаванием специфического повреждения и переходом далее (5 мс - 0,04 с) в каталитически-компетентное состояние. На следующей стадии реакции (0,2–1 с), где сигнал флуоресценции возрастает, субстрат процессируется до продукта. Линейный участок соответствует финальной фазе реакции (1–5 с), когда продукт диссоциирует из комплекса с ферментом.

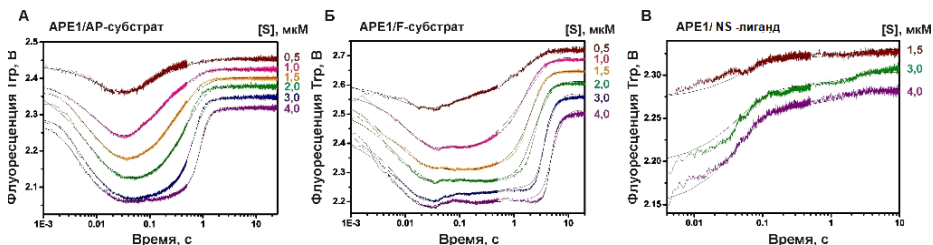
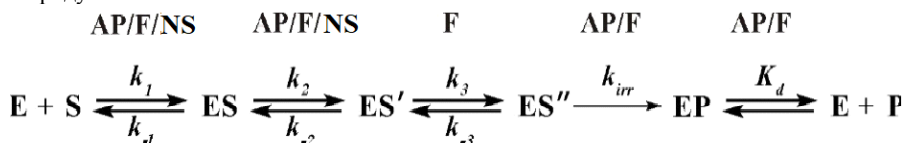


Рис. 12. Кинетика взаимодействия природной формы APE1 с различными субстратами. (А) - AP-субстрат, (Б) - F-субстрат и (В) – ДНК дуплекс, не содержащий повреждений (NS-лиганд). Кривые отражают изменение флуоресценции остатков Tgr в белке (1,5 мкМ) при взаимодействии с ДНК субстратами (0,5 – 4,0 мкМ).

При анализе кривых взаимодействия с F-субстратом (Рис. 12Б) можно видеть два характерных отличия по сравнению с AP-субстратом. Во-первых, различается продолжительность стадии 3, а во-вторых, после стадии 3 можно выделить дополнительную стадию 4. Таким образом, конформационные изменения при взаимодействии с химически стабильным субстратом F происходят медленнее. Дополнительная фаза возрастания флуоресцентного сигнала в случае F-субстрата наблюдалась в интервале 0,03–0,2 с, что соответствует одной из стадий изомеризации фермент-субстратного комплекса

на пути к каталитически активному состоянию. С учетом дополнительной стадии, обобщенный механизм, описывающий превращение AP- и F- ДНК-субстратов в продукт ферментом APE1 включает как минимум пять стадий, и их можно описать следующими превращениями (Схема 2).

Схема 2. Молекулярно-кинетический механизм реакции, катализируемой природной формой белка APE1 при взаимодействии с субстратами AP, F и NS-лигандом. E – фермент, S – субстрат, ES, ES', ES'' – промежуточные фермент-субстратные комплексы, EP – комплекс фермента с продуктом, P – продукт реакции, k_i, k_{-i} – константы скорости промежуточных стадий, K_d – равновесная константа диссоциации комплекса фермента с продуктом.



Начальные стадии узнавания субстрата ферментом (Стадии 1-3, константы k_1, k_2 и k_3) и структурные превращения в комплексе субстрата, и фермента, ведут к переходу в каталитически активную структуру ES''. Стадия 4, на которой происходит образование продукта, является необратимой, поскольку соответствует гидролизу фосфодиэфирной связи в ДНК с образованием комплекса EP, после чего фермент диссоциирует из комплекса с продуктом. Программный пакет DynaFit позволил рассчитать константы скорости реакций Схемы 2.

Наибольшие различия в форме кинетических кривых взаимодействия APE1 с ДНК были отмечены в реакции с неповрежденной ДНК (NS-лиганд). Эти взаимодействия соответствуют двум первым обратимым стадиям Схемы 2. На ранних временах (до 0,1 с) происходит рост интенсивности флуоресценции (Рис. 12В), тогда как в случае специфических субстратов, наблюдается падение интенсивности флуоресценции (Рис. 12 А,Б). Рассчитанная величина константы равновесия K_a для AP-содержащей ДНК почти на 3 порядка выше, чем для неспецифического лиганда NS (Таблица 5). Можно заключить, что изменение структуры APE1 при связывании с неповрежденной ДНК не сопровождается формированием каталитически активной структуры фермента.

Таблица 5. Значения констант скорости и констант равновесия для элементарных стадий процессов, соответствующих Схеме 2 и описывающих взаимодействия APE1 с ДНК-субстратами.

Константы	ДНК-субстраты		
	AP-субстрат	F-субстрат	NS-лиганд
$k_1, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$(8,9 \pm 0,5) \times 10^7$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^8$	$(7,4 \pm 0,5) \times 10^5$
k_{-1}, c^{-1}	$6,0 \pm 0,7$	$14,6 \pm 0,2$	$17,4 \pm 0,6$

k_2, c^{-1}	$3,2 \pm 0,1$	$5,6 \pm 0,2$	$0,17 \pm 0,01$
k_{-2}, c^{-1}	$1,8 \pm 0,1$	$28,6 \pm 0,3$	$0,76 \pm 0,02$
k_3, c^{-1}		$6,6 \pm 0,3$	
k_{-3}, c^{-1}		$0,15 \pm 0,01$	
k_{irr}, c^{-1}	$3,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	
K_d, M	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-6}$	$(5,5 \pm 0,2) \times 10^{-6}$	
K_a, M^{-1}	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^7$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^8$	$(5,2 \pm 0,2) \times 10^4$

Сравнение значений константы ассоциации K_a , отражающей сродство фермента к субстрату, равных $(4,1 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ и $(1,3 \pm 0,1) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ для AP- и F-субстратов, свидетельствует о том, что оба комплекса с ферментом стабильные и сродство APE1 к обоим типам повреждения достаточно высокое. Анализ величин констант скорости образования продукта в комплексе с ферментом, отражающих скорость разрыва фосфодиэфирной связи (k_{irr}) показал, что для химически стабильного F-субстрата это значение было ниже. Наиболее вероятное объяснение таких различий заключается в наличии дополнительной стадии конформационного перехода $ES' \leftrightarrow ES''$ в случае субстрата F, описываемого константами k_3 и k_{-3} . Уже было показано ранее (Mol C.D. et al., 2000) что на предкаталитических стадиях образования комплекса APE1 с AP-субстратами, положительно заряженные поверхности специфических петель фермента внедряются между основаниями, находящимися в стэкинге, изгибают и перекручивают ДНК. Такое локальное изменение структуры спирали ДНК способствует “выворачиванию” AP-сайта и позиционированию в гидрофобной полости активного центра. Неповрежденные основания, соседние с AP-сайтом, таким образом оказываются дистанцированы, а весь комплекс становится каталитически активным. Для каталитического расщепления субстрата F критически важен дополнительный конформационный переход фермента, представляющий собой тонкую стерическую адаптацию боковых радикалов аминокислот, формирующих гидрофобную полость, к F аналогу AP. Конформация белка APE1 в свободном состоянии отличается от его конформации при взаимодействии со специфическими субстратами или неповрежденной ДНК и определяет высокую селективность фермента к AP-сайтам.

2.2. Конформационная динамика AP- и F-содержащих ДНК-субстратов в комплексе с APE1

Анализа динамики AP и F-содержащих субстратов при взаимодействии с APE1 изучали в дуплексе ДНК, одна из цепей которого содержала флуоресцентный аналог аденозина 2-aPu. Поскольку положение 2-aPu относительно повреждения могло влиять на параметры взаимодействия с ферментом, оба варианта дуплексов были проанализированы: с 5' относительно AP/F - ((2-aPu)AP/F), либо с 3'-стороны (AP/F (2-aPu)) (Таблица 1). Такие субстраты позволяют судить об изменении конформации ДНК при

взаимодействию с ферментом по изменению флуоресценции 2-аминопурина, на основании

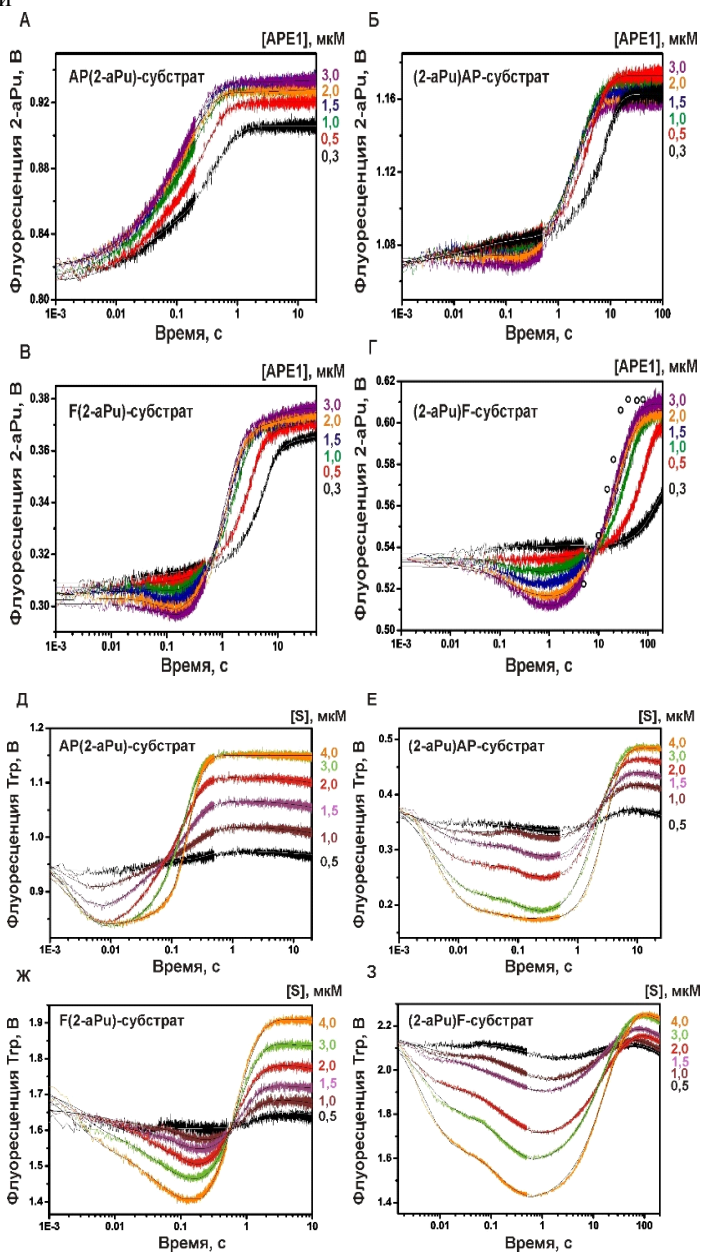


Рис. 13. Регистрация изменений интенсивности флуоресценции остатков 2-аминопурина в ДНК-субстрате (**А-Г**) и флуоресценции остатком Тгр фермента (**Д-З**) в процессе взаимодействия с АРЕ1. Субстраты и их концентрации указаны на рисунках. Доля расщепленного субстрата (%), определенная разделением в ПААГ обозначена кругами (○) (Г).

того, что увеличение флуоресценции отражает переход 2-аPu из гидрофобного окружения в гидрофильное. Изменения интенсивности флуоресценции 2-аPu при взаимодействии с АРЕ1 проводили в условиях однооборотной реакции (Рис. 13 А-Г). Анализ изменения флуоресценции 2-аPu в составе субстратов показал, что положение 2-аPu относительно повреждения влияло на характер регистрируемых кривых флуоресценции и на скорость протекания процессов, причем это различие было сильнее выражено для АР-субстратов. Увеличение интенсивности флуоресценции можно отнести к процессу освобождения продуктов реакции – расщепленных фрагментов ДНК, из комплекса с ферментом АРЕ1. Для субстрата АР можно выделить три стадии конформационных изменений: образование комплекса, процессинг субстрата и выход продукта из комплекса. Результаты анализа разделения продуктов реакции в ПААГ (экспериментальные точки отмечены кружочками (○) на Рис. 13Г) продемонстрировали соответствие динамики накопления продуктов динамике изменения флуоресценции субстрата (2-аPu)АР.

Сравнение кривых флуоресценции для субстратов АР и F выявило фазу снижения флуоресценции для субстратов F, которая отсутствовала при реакции с АР субстратами (Рис. 13В, Г). Наиболее вероятно эта стадия (времена до 1 с) соответствует изменению конформации субстрата F, ведущей не только к попаданию поврежденного основания в активный центр АРЕ1 с принятием комплексом каталитически-компетентной структуры, но и локализацией 2-аPu в более гидрофобном окружении. В то же время, аналогично взаимодействию с субстратами АР, происходит замедление выхода продукта для варианта, когда 2-2-аPu находится с 5' стороны от поврежденного сайта.

Для всех используемых субстратов были рассчитаны значения прямых и обратных констант скорости (Таблица 6).

Таблица 6. Влияние положения остатков 2-аPu в ДНК-субстратах на скорость конформационных переходов в субстратах при взаимодействии с природной формой АРЕ1. Представлены константы скорости отдельных стадий, полученные с учетом регистрации флуоресценции остатков 2-аPu или Тгр фермента в реакции.

Константа	Величина							
	определена по флуоресценции 2-аPu				определена по флуоресценции Тгр			
	АР(2-аPu)	(2-аPu)АР	F(2-аPu)	(2-аPu)F	АР(2-аPu)	(2-аPu)АР	F(2-аPu)	(2-аPu)F
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$4,8 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$

k_{-1}, c^{-1}	3,1	7,0	38	11	54	61	47	77
k_2, c^{-1}			7,5	1,3		9,3	12	13
k_{-2}, c^{-1}			2,1	0,56		1,1	0,71	1,9
k_{irr}, c^{-1}	7,1	0,50	1,5	0,08	5,7	0,37	2,8	0,08
K_d, M	$2,0 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-7}$	$4,1 \times 10^{-6}$
K_a, M^{-1}	$1,6 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$

Можно видеть, что 5' расположение 2-aPu относительно повреждения вело к снижению значения константы ассоциации K_a , относительно комплексов с субстратами, где 2-aPu было с 3' стороны от повреждения. Исходя из значений K_a для комплексов с аналогичным положением 2-aPu, стабильность комплексов с APE1 для субстратов AP была выше, чем для субстратов F. Значение константы скорости стадии гидролиза фосфодиэфирной связи k_{irr} было максимальным для AP(2-aPu)-субстрата. Эффективность превращения ДНК-субстратов под действием hAPE1 увеличивается в ряду:



Для подтверждения обнаруженных эффектов, для всех образцов также регистрировали изменение флуоресценции Trp фермента (Рис. 13 Д-3). С учетом данных электрофоретического разделения продуктов реакции можно говорить о том, что позиция 2-aPu существенно влияет как минимум на две первые стадии взаимодействия фермента с субстратом, а сам фермент обладает большим сродством к субстратам AP/F (2-aPu). То, что нарушение структуры ДНК при введении остатка 2-aPu влияет на каталитическую активность APE1, но не ингибирует ее (активность), свидетельствует о пластичности ДНК-белкового комплекса и огромном потенциале структурной регуляции таких взаимодействий.

2.3. Роль консервативного остатка Asn212 во взаимодействии APE1 со специфическими субстратами

Замены отдельных аминокислот в активном центре фермента позволяют выявлять наиболее существенные для катализа структурные особенности аминокислотных остатков. Известно, что в активный центр APE1 сформирован остатками Asp70, Glu96, Tyr171, Asn174, Asp210, Asn212, и His309. В данном исследовании были получены мутантные формы APE1, в которых Asn212 был заменен на аланин (N212A) либо аспарат (N212D). Активность ферментов тестировали по образованию продуктов расщепления субстрата, визуализированных разделением в ПААГ. Вариант N212A не обладал каталитической активностью. Поэтому, для анализа отдельных стадий взаимодействия со специфическими субстратами использовали форму N212D.

На Рис. 14А, Б представлены кинетические кривые взаимодействия мутантной формы N212D APE1 с ДНК субстратами с AP- и F сайтами, отражающие изменение флуоресценции Trp фермента, а на Рис.14 В, С - отражающие изменение флуоресценции 2-аPu субстрата в варианте AP/F(2-аPu), т.е. когда 2-аPu находится с 3' положения относительно AP или F сайта. Если сравнивать полученные кинетические кривые для N212D и для природной формы APE1 (Рис. 12 А, Б), то можно заключить, что формы кривых взаимодействия с соответствующими субстратами природной и мутантной формы APE1 достаточно схожи, особенно для субстрата F. Тем не менее, динамика процессов отличается существенно: образование продукта в случае мутантной формы белка происходит позднее. Вид кривых изменения флуоресценции 2-аPu субстрата для мутантной формы белка (Рис. 14 В, Г) существенно отличался от таковых для природной формы APE1 (Рис. 13 А,В). И в случае детекции флуоресценции Trp, и в случае 2-аPu, продолжительность одного оборота реакции составляла около 1000 с для формы N212D.

В таблице 7 приведены рассчитанные кинетические параметры взаимодействия N212D с AP/ F-субстратами и их сравнение с таковыми для фермента APE1 дикого типа.

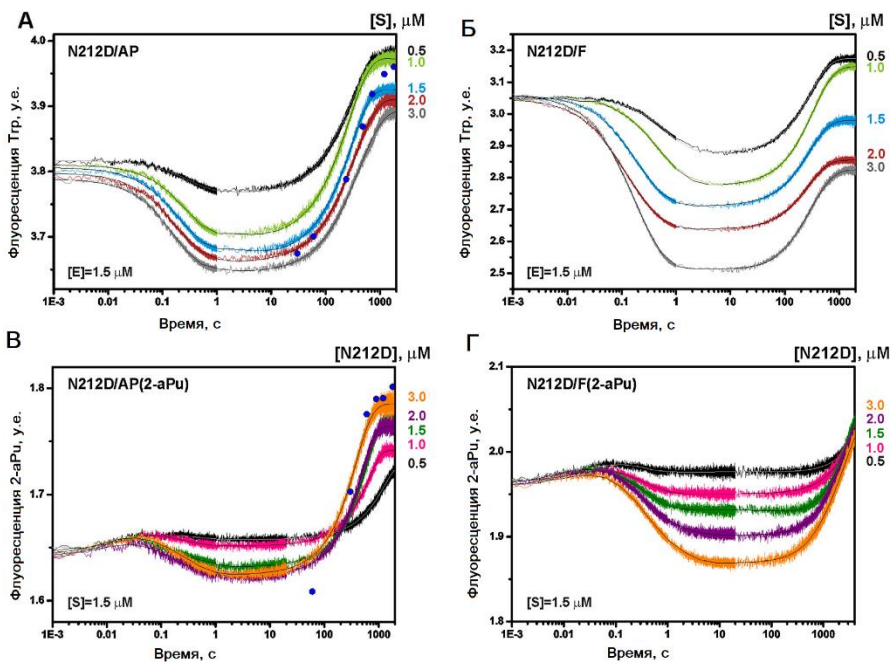


Рис. 14. Взаимодействие APE1^{N212D} с AP- и F-субстратами. Конформационные переходы в молекулах фермента и ДНК-субстратов регистрировали по изменению интенсивности

флуоресценции остатков Trp (А, Б) и 2-аPu (В, Г). Субстраты и их концентрации указаны на рисунках.

Константа k_{irr} , характеризующая скорость гидролиза фосфодиэфирной связи для природной формы фермента APE1 почти на три порядка выше, чем для мутантной формы N212D. Анализируя результаты компьютерного моделирования комплекса APE1^{N212D} с субстратом, можно сделать заключение, что вариант белка APE1 N212D сохраняет способность изгибать сахаро-фосфатный остов ДНК так, чтобы оставалась возможность нуклеофильной атаки фосфатной группы молекулой воды. Молекула воды, в свою очередь, активируется аминокислотными остатками Asp210 и Asp212.

Структурные изменения в APE1^{N212D}, приводящие к снижению каталитической активности были определены методом МД для фермента в комплексе с субстратом F(2-аPu) при температуре 300 К.

Таблица 7. Кинетические параметры взаимодействия N212D APE1 AP- и F-субстратами.

	Флуоресценция Trp			Флуоресценция 2-аPu	
	N212D/AP	N212D/F	wt APE1/AP	N212D/AP	N212D/F
$k_1, M^{-1}c^{-1}$	$2,3 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$8,9 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$7,8 \times 10^7$
k_{-1}, c^{-1}	7,6	4,9	6,0	62	61
K_1, M^{-1}	$3,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
k_2, c^{-1}	6,7	5,0	3,2	4,8	2,3
k_{-2}, c^{-1}	2,3	3,7	1,8	0,68	0,35
K_2	2,9	1,4	1,8	7,1	6,6
k_3, c^{-1}	0,0058	0,0049	3,2	0,005	н/д
k_{irr}, c^{-1}	$5,8 \times 10^{-3}$	$6,9 \times 10^{-3}$	5,7	$5,0 \times 10^{-3}$	
Kd, M	$1,2 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^{-6}$	н/д
Ka, M^{-1}	$6,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$4,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$8,3 \times 10^7$

На Рис. 15 представлен общий вид комплекса APE1^{wt}□DNA и его увеличенная часть, показывающая локализацию ключевых аминокислот и иона Mg²⁺ в активном центре.

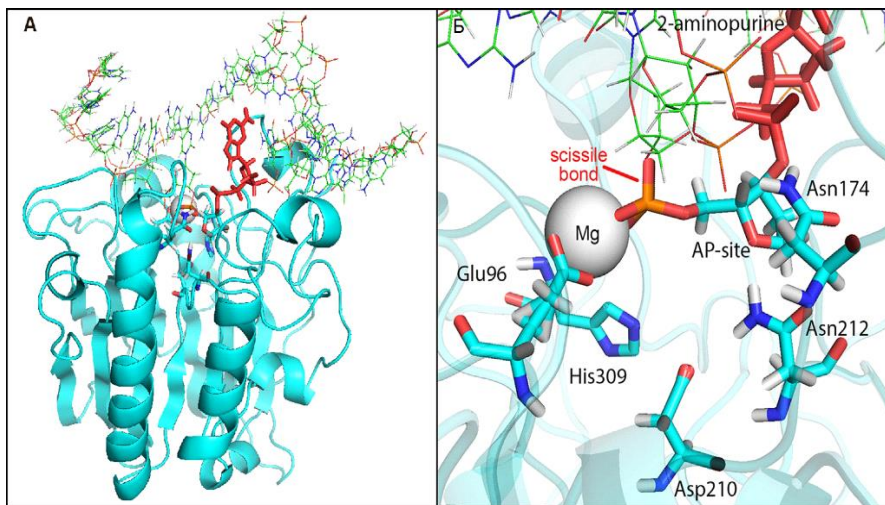


Рис. 15. (А) Общий вид комплекса APE1 с ДНК-дуплексом. Основание 2-aPu показано красными балками; F-сайт показан в виде модели балки, окрашенной в соответствии с типом атомов (голубой - углерод; синий - азот; красный - кислород; коричневый - атомы фосфора). (Б) Локализация остатков активного сайта. Ион Mg^{2+} показан в виде серой сферы СРК, аминокислотные остатки Glu96, Asn174, Asp210, Asn212 и His309, образующие активный сайт, показаны в виде балок, окрашенных в соответствии с типом атома. Остальная часть белка показана в виде полупрозрачной схематической модели.

Анализ MD-траекторий для мутанта N212D APE1 показал значительное искажение геометрии активного сайта. На рис. 16Б показано положение F-сайта и ключевых аминокислот в мутанте по сравнению с APE1 дикого типа (Рис. 16А). Координация иона Mg^{2+} в комплексе N212D APE1 с F-содержащим субстратом была значительно нарушена. Расстояние между координационной карбоксильной группой Glu96 и ионом металла увеличилось на $1,6\text{\AA}$ по сравнению с ее положением в APE1wt. Когда Asn212 заменен на Asp, имидазольное кольцо His309 поворачивается вокруг связи $C\alpha-C\beta$, что приводит к увеличению расстояния между атомом N1 и фосфатом ДНК-мишени с $3,8\text{\AA}$ до $9,4\text{\AA}$.

Таким образом, моделирование методом молекулярной динамики показывает, что сайт-мишень в ДНК-субстрате надежно закреплен в активном центре APE1^{wt} посредством нековалентных взаимодействий со специфическими аминокислотами и ионом Mg^{2+} , который действует в качестве "зажима" между ферментом и ДНК.

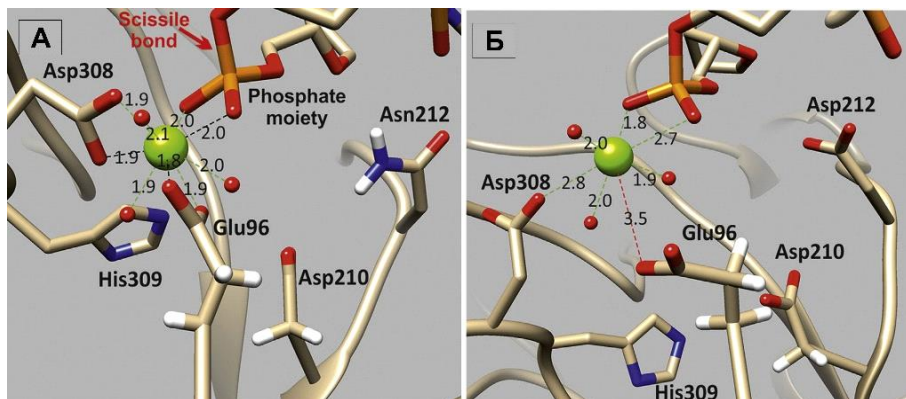


Рис. 16. Молекулярное моделирование взаимодействия WT APE1 (А) и N212D (Б) с субстратом F(2-aPu). В обеих структурах ион Mg^{2+} (зеленый) координирован двумя карбоксильными группами Glu96 и Asp308, 5'-фосфатами и молекулами H_2O .

3. Кинетические закономерности взаимодействия эндонуклеазы *Arp1* из *Saccharomyces cerevisiae* с ДНК-субстратами

Белок *Arp1* из *S. cerevisiae* является гомологом бактериальной AP-эндонуклеазы *Nfo* и осуществляет репарацию ДНК у дрожжей. *Arp1* из *S. cerevisiae* несет следующие каталитические активности: 1) AP-эндонуклеазную активность, благодаря которой поврежденная цепь ДНК гидролизует с 5'-конца AP-сайта; 2) 3'-фосфодиэстеразную активность, за счет которой вырезаются 3'-концевые блокирующие группы ДНК такие, как α,β -ненасыщенные альдегиды, 4-гидрокси-2-пентеналь (3'-dRP), 3'-фосфогликолят (3'-pg) или 3'-фосфат (3'-P), 3) 3'-тирозил-ДНК-фосфодиэстеразную активность, удаляющую ковалентно связанную топоизомеразу 1 (3'-Topo1); 4) эндонуклеазную активность, благодаря которой фосфодиэфирная связь расщепляется с 5'-стороны от окисленных оснований ДНК, таких как DHU и формадинопиримидины (FaryA и FaryG); 5) 3'→5'-экзонуклеазную активность, которая удаляет 3'-концевой нуклеотид.

Для исследования конформационной динамики ДНК-субстрата при взаимодействии с *Arp1* в ходе каталитического цикла, использовали 12-звенные дуплексы ДНК, где поврежденное основание было фланкировано 2-aPu либо с 3'-, либо с 5'-стороны. Кроме фермента дикого типа, использовали фермент с заменой His83 на Ala.

3.1. Роль остатка His83 эндонуклеазы Apn1 в каталитическом гидролизе AP-сайта

Ранее считалось, что His83 в Apn1 координирует один из трех ионов Zn^{2+} (Zn1) в активном сайте Apn1, подобно His69 в EndoIV (Jilani A., Biochemistry 2003). Позднее было сделано предположение, что замена His83 на Ala может снизить активность Apn1 вследствие слабой координации ионов Zn^{2+} , участвующих в ферментативном катализе (Morris L.P., DNA Repair 2012). Для проверки этой гипотезы нами была получена мутантная форма H83A Apn1, в которой His83 был заменен на Ala. Исследование расщепления AP-сайта мутантом H83A Apn1 в процессе BER показало, что замена His83 на Ala влияет на образование каталитического комплекса и дальнейший распад поврежденной нити ДНК. Катализ с участием H83A Apn1 зависит не только от расположения относительно AP-сайта в ДНК, но и от характера повреждения. Методы компьютерного моделирования позволили рассчитать общий вид комплекса Apn1 дикого типа с (2-aPu)F ДНК-дуплексом (Рис. 17). Можно видеть положение аминокислотных остатков в активном сайте и их взаиморасположение относительно ионов Zn^{2+} .

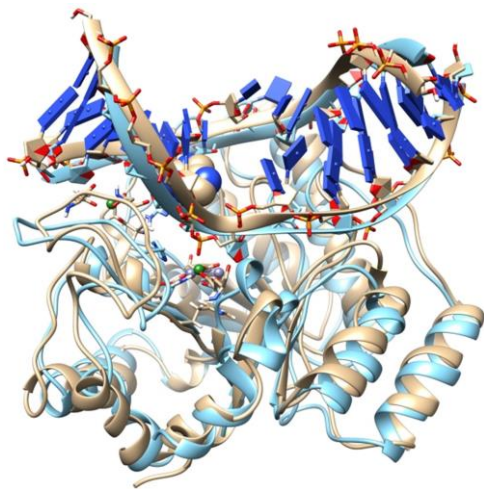


Рис. 17. Моделирование методом МД взаимодействия формы H83A Apn1 с ДНК-субстратом. Комплекс с одним ионом Zn^{2+} (голубые ленты, Zn^{2+} - фиолетовые сферы) и двумя ионами Zn^{2+} (серо-коричневые ленты, Zn^{2+} - зеленые сферы).

Локализация аминокислотных остатков в активном центре приведена на рисунке 18. Ионы Zn^{2+} показаны зеленым, His83, His123, Glu158, Asp192, His195, His229, Asp242, His244 и Glu274, образующие активный центр, показаны в виде палочек, окрашенных в соответствии с типом атомов (хаки - углерод; синий - азот; красный - кислород; коричневый, фосфор). RMSD для всех атомов в ДНК составляет 3,7 Å.

Все три иона Zn^{2+} были вовлечены в катализ: Zn1 и Zn2 взаимодействовали с атомами кислорода фосфатной группы, расположенных вблизи расщепляемой связи, и притягивали к ним электронную плотность, способствуя расщеплению

фосфодиэфирной связи. Когда образовывался продукт расщепления, ион Zn_3 , по-видимому, взаимодействовал с 5'-областью содержащей AP-сайт - цепью продукта ДНК, стабилизируя уходящую группу. Ион Zn_3 координируется с Asp242 и смещается на 4,6 Å ближе к 5'-концу F-содержащей ДНК (Рис. 18). Моделирование структуры H83A Apn1 с тремя ионами Zn^{2+} показало, что наиболее существенные изменения произошли для иона Zn_3 . Замена положительно заряженного His83 на неполярный Ala привела к ослаблению координации Zn_1 , за которым последовало небольшое смещение иона металла относительно его первоначального местоположения.

Результат смещения Zn_1 означает, что Glu274 теперь должен координировать оба иона Zn_1 и Zn_2 вместо одного Zn_2 , координируемого в WT Apn1 (рис. 18Б). Полученные данные доказывают, что сниженная ферментативная активность H83A Apn1 является результатом уменьшенного количества ионов Zn^{2+} в активном центре.

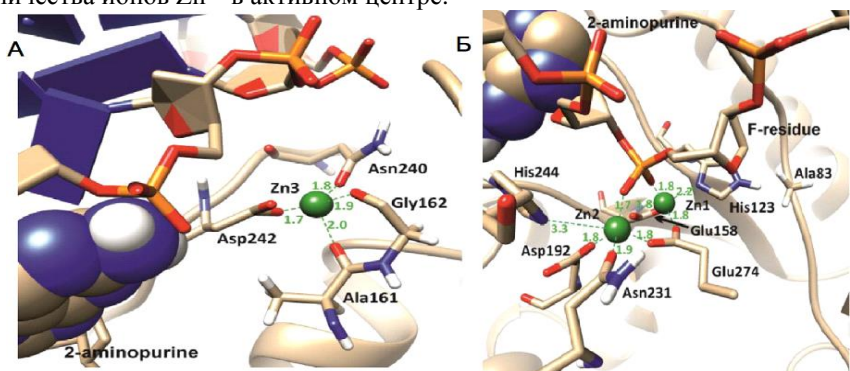


Рис. 18. Молекулярная динамика положения остатков аминокислот в активном центре комплекса H83A Apn1 с ДНК. Геометрия координации металлов Zn_3 (А) показана для МД-моделирования с двумя ионами Zn^{2+} ; геометрия координации Zn_1 и Zn_2 (Б) показана для МД-моделирования с тремя ионами Zn^{2+} . Ионы цинка показаны зелеными сферами, остаток 2-аPu показан сферами СПК, F-сайт, Glu158, Asp192, Glu274 аминокислотные остатки, формирующие активный сайт, показаны в виде палочек (хаки - углерод; синий - азот; красный - кислород; коричневый, атомы фосфора).

Таким образом, именно His83 правильно координирует ионы Zn^{2+} активного центра, играя решающую роль в каталитической стадии разрезания. Полученные результаты могут быть полезны для разработки новых противогрибковых и противомаларийных агентов.

4. Установление структуры NEIL2 человека методом HDX-MS

hNEIL2 (эндонуклеаза VIII-подобный белок 2) человека относится к структурному суперсемейству «спираль-два поворота-спираль» (H2TH) ДНК-

гликозилаз. Этот фермент проявляет уникальную специфичность к окисленным пиримидинам в ДНК-субстратах, отличных от канонической В-формы: одноцепочечным ДНК, G-квадруплексам, петлям, шпилькам и межцепочечным сшивкам. Структура hNEIL2 не была установлена, поскольку протяженная неупорядоченная петля препятствует кристаллизации. Наиболее близким гомологом hNEIL2 с изученной структурой является NEIL2 опоссума (oNEIL2). Показано, что структуры ДНК-связанных H2TH ДНК-гликозилаз представляют закрытый комплекс, с каталитическими остатками, принадлежащими к различным доменам, точно расположенными для удержания вывернутого вырезаемого нуклеотида и осуществления нуклеофильной атаки на его С1' атом. Предполагалось, что структуры свободных ДНК-гликозилаз данного семейства демонстрируют вращение домена, что ведет к открытой конформации, в которой каталитический сайт разобщен из-за больших расстояний между его остатками, принадлежащими к разным доменам, однако регистрация открытой конформации свободного фермента в растворе была недоступна и вопрос о структуре свободного hNEIL2 оставался открытым.

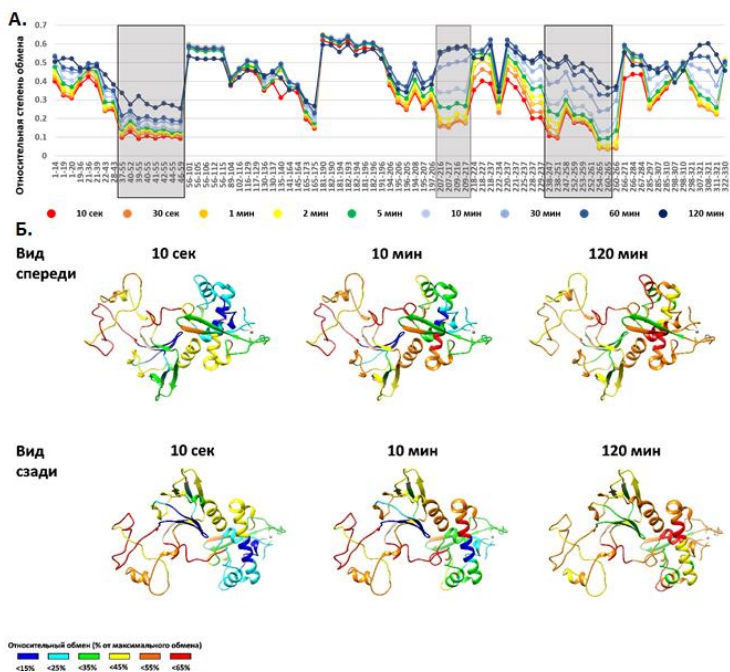


Рис. 19. Динамика обмена H/D в hNEIL2. (А) Значения относительного обмена, определенные в каждой временной точке и наложенные на позиции в пептиде (от N-конца к С-концу). Измерение в промежутке 10 с - 120 мин. Серые прямоугольники ограничивают

пептиды, соответствующие EX1 кинетике. (Б) Полученная из MD структура hNEIL2, окрашенная в соответствии с относительным обменом дейтерия.

Для исследования конформационно-динамических особенностей существования hNEIL2 в растворе применяли комбинацию метода масс-спектрометрии с водородно-дейтериевым обменом и методов компьютерного моделирования. Для определения расположения высоко- и низкоподвижных сайтов в структуре hNEIL2 в растворе использовали метод HDX-MS. Реакцию H/D обмена проводили путем инкубирования белка в буфере с дейтериевой водой ($pD=7,6$), с последующим протеолитическим расщеплением белка пепсином и регистрацией полученных пептидов масс-спектрометрическим методом анализа. Уровень покрытия последовательности белка пептидами составил 96.7%, неустановленной осталась только область со 176 по 181 аминокислоту.

На начальных этапах реакции степень обмена водорода на дейтерий для разных пептидов существенно различалась (Рис. 19). Согласно полученным данным, наиболее быстрый и интенсивный обмен происходил в уникальном для hNEIL2 фрагменте – неструктурированной петле $\beta 3/\beta 4$ в области 56-129 а.о. Другим фрагментом с быстрым замещением дейтерием водородов амидных групп была область с 181 по 196 а.о., которая соответствует линкеру между N-концевым и C-концевым доменами, хорошо организованным и структурированным в oNEIL2 и mvNEIL2/3.

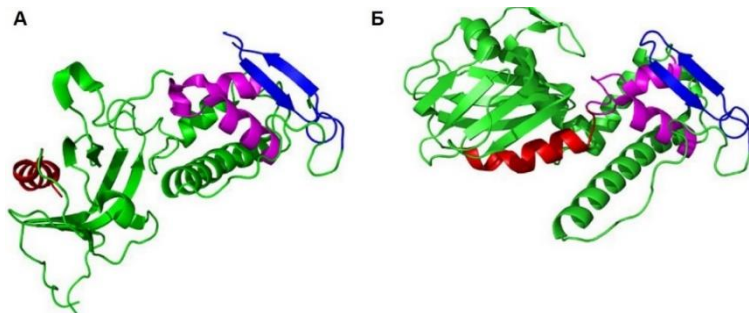


Рис. 20. Структура открытой (А) и закрытой (Б) формы hNEIL2

Интерпретация экспериментов HDX значительно облегчается структурными и данными МД. Поскольку структура hNEIL2 не установлена, были построены две модели по гомологии, одна из которых основана на "открытой" структуре oNEIL2 (Рис. 20А), другая - на "закрытой" структуре mvNEIL2/3(Рис. 20Б).

На основании данных HDX-MS/MD показано, что в свободном состоянии в растворе белок hNEIL2 предпочтительно находится в открытой конформации.

Указанный комплексный подход позволил провести анализ конформационных изменений белка hNEIL2 и показал, что характерная для NEIL2 позвоночных область, содержащая протяженную инсерцию в N-концевом домене и отсутствующая в других ДНК-гликозилазах, в растворе находится в неструктурированном состоянии.

Можно заключить, что hNEIL2 является конформационно подвижным белком, что может быть связано с его участием в репарации неканонических структур ДНК и/или вовлечением в функциональные и регуляторные белок-белковые взаимодействия.

Заключение

На основании полученных данных о конформационных переходах в ферментах, ДНК-субстратах (лигандах) установлены кинетические механизмы обнаружения и превращения поврежденных сайтов ДНК для эукариотических ферментов репарации: AP-эндонуклеаз APE1 человека и Apn1 из *Saccharomyces cerevisiae* (как природных форм, так и функциональных мутантов), принадлежащих к двум разным семействам ExoIII и Endo IV; для ДНК-гликозилаз Fpg и OGG1 (природных форм и функциональных мутантов); для эндонуклеаз NEIL2 и Cas9. Для решения задач работы методологически применяли подход с регистрацией изменений в спектрах оптического поглощения в реальном времени методом «остановленного потока»; идентифицировали короткоживущие фермент-субстратные комплексы и интермедиаты масс-спектрометрическим методом.

В работе применен комплексный подход, включающий изучение кинетических характеристик взаимодействия между ферментом и субстратом, моделирование комплексов по методу молекулярной динамики и использования масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена для получения динамических структур. Используемый подход позволил достаточно подробно на структурном уровне описать динамическую подвижность изучаемых комплексов. Структурные основы узнавания в белково-нуклеиновых комплексах были изучены с применением масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена.

Белково-нуклеиновые комплексы участвуют во множестве различных ферментативных путей, где жесткая регуляция их каталитической активности имеет решающее значение для развития и поддержания биохимии клетки. Ранее в работах коллег были выявлены удивительные примеры пластичности таких комплексов, позволяющие им принимать различные конформации в ответ на взаимодействие со специфическими регуляторными доменами или белками. В нашей работе для ограниченного числа белковых комплексов показано похожее поведение.

Полученные нами данные позволяют заключить, что структурно-динамические механизмы работы ферментов репарации, принадлежащих к различным структурным семействам: ExoIII (APE1), Endo IV (Apn1), Endo III

(OGG1), Endo VIII (NEIL2, Fpg), возможно описать сравнимым количеством стадий (регистрируемых как по изменению флуоресценции фермента, так и по флуоресценции субстрата) пластичного изменения структуры всего белково-нуклеинового комплекса.

Результаты, полученные в представленной работе позволяют по-новому оценить природу механизмов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами и глубже понять фундаментальные основы процессов, обеспечивающих узнавание в белково-нуклеиновых комплексах.

ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой завершенное систематическое исследование, по результатам которого выявлены общие закономерности и различия в работе ряда ферментов репарации и геномного редактирования, механизмы узнавания и процессинга различных субстратов. В работе был применен комплексный методологический подход, включающий изучение кинетических характеристик взаимодействия между ферментом и субстратом, моделирование комплексов по методу молекулярной динамики (МД) и использование масс-спектрометрии водородно-дейтериевого обмена (HDX-MS) для получения динамических структур. Полученные результаты позволяют описать процессы узнавания в белково-нуклеиновых комплексах с позиции динамической пластичности компонентов таких комплексов.

1. Получены кинетические и структурные параметры взаимодействия формамидопиримидин-ДНК гликозилазы Fpg из *E. coli* с субстратами различной степени специфичности.
 - Кинетический анализ взаимодействия Fpg с олигонуклеотидным дуплексом, содержащим AP-сайт или его нерасщепляемый аналог, выявил наличие четырех стадий взаимодействия фермента с субстратом в интервале 2 мс – 10 с. Указанные стадии отражают связывание фермента с ДНК и узнавание повреждения с взаимной корректировкой структур биополимеров для достижения каталитически компетентной конформации комплекса.
 - Показано, что основание, находящееся напротив 8-охоG влияет на эффективность вырезания этого модифицированного основания. Предпочтение белка Fpg к основанию, напротив 8-охоG убывает в ряду $C > T > A \approx G$.
2. Проведено структурно-функциональное исследование процесса узнавания ДНК-субстратов с помощью 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека hOGG1.
 - Выявлено, что взаимодействие hOGG1 с субстратом, содержащим AP-сайт, происходит в некаталитическом режиме с очень низким уровнем реакции β -элиминирования, наблюдаемым в течение первых 1000 с реакции.

- Показано, что отрыв протона от атома C2'AP-сайта гликозилазой hOGG1 является необходимой стадией для инициирования β -элиминирования, которая катализируется анионной формой поврежденного основания непосредственно после разрыва гликозидной связи. Скорость β -элиминирования 8-охоG в 2 раза выше в присутствии 8-BrG. 8-BrG влияет на скорость β -элиминирования, а не на динамику взаимодействия фермента и ДНК-субстрата до стадии расщепления.
 - Обнаружено, что замены Cys253Leu и Cys253Ile преимущественно влияют на каталитическую эффективность hOGG1, а не на его аффинность к ДНК-продукту или способность изгибать ДНК в предкаталитическом комплексе. Способность мутантного hOGG1 распознавать и отщеплять поврежденные основания может быть обусловлена внутренней пластичностью глобулы белка и энергетической выгодой выворачивания 8-охоG из спирали для комплекса ДНК с ферментом.
 - Показано, что аминокислотная замена Gln315Trp в hOGG1 препятствует полному выворачиванию 8-охоG из двойной спирали и его эффективному связыванию в активном сайте фермента, что приводит к уменьшению как N-гликозилазной так и AP-лиазной активности hOGG1.
 - Показано, что синтетический остаток охоG-Clamp, расположенный в ДНК-дуплексе рядом с окисленным основанием 8-охоG, препятствует процессу выщепления остатка 8-охоG.
3. Впервые предложен и детально охарактеризован кинетический механизм реакции, катализируемой APE1 человека в процессе NIR.
- Показано, что расположение остатка 2-аPu в ДНК с 3'-стороны от повреждения не влияет на скорость расщепления ДНК с помощью APE1, а иногда даже увеличивает эффективную скорость реакции. Показано, что скорость оборота фермента APE1 зависит от характера повреждения ДНК-субстрата. Этот факт подтверждает важную роль структурной пластичности ДНК-субстрата в катализе.
 - Моделирование по методу МД показывает, что сайт-мишень в ДНК-субстрате надежно закреплен в активном сайте APE1 посредством взаимодействий со специфическими аминокислотами и ионом Mg^{2+} , который действует в качестве «захвата» между ферментом и ДНК.
 - Геометрия активного сайта APE1 нарушается при взаимодействии с ДНК-субстратом, содержащим аддукт бенз[a]пирена с гуанином, причем более значительно в случае, когда BPDE-dG находится в транс-конформации и BPDE-dG интеркалирует в комплекс APE1-ДНК вблизи расщепленной фосфодиэфирной связи, чем в случае цис-изомера.
4. На основании данных моделирования по гомологии впервые предложена 3D-структура фермента Ape1 из *Saccharomyces cerevisiae*.

- Установлено, что остаток His83, координирующий ионы Zn^{2+} в активном центре, играет решающую роль в каталитической стадии разрезания ДНК-субстрата.
 - Показано, что Arp1 специфичен к широкому спектру модифицированных оснований. Для восстановления поврежденной геномной ДНК альтернативный путь NIR может привлекать Arp1 в случае функционального отказа ДНК-гликозилазы.
5. Впервые предложена 3D-структура эндонуклеазы NEIL2 человека в растворе.
- На основании данных HDX-MS/MD показано, что в свободном состоянии в растворе белок hNEIL2 предпочтительно находится в открытой конформации, а характерная для hNEIL2 позвоночная область, содержащая протяженную петлю в N-концевом домене и отсутствующая в других ДНК-гликозилазах, находится в неструктурированном состоянии.
6. Определены ключевые стадии и термодинамические характеристики взаимодействия эндонуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes* с дцДНК-субстратом, определяющие скорость реакции расщепления ДНК.
- Предложена динамическая 3D-структура комплекса эндонуклеазы Cas9 *S. pyogenes* на основе HDX-MS и данных МД.
 - Показано, что в случае коротких дуплексов с неканоническими парами стадия узнавания и связывания ферментом Cas9 дцДНК субстратов определяет скорость реакции, а не термодинамические параметры, влияющие на «расплетание» ДНК.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.014.2:

1. Zhdanova P.V., Ishchenko A.A., Chernonosov A.A., Zharkov D.O., **Koval V.V.** Dynamics and conformational changes in human NEIL2 DNA glycosylase analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Journal of Molecular Biology* –2022. –V. 434. –N. 2. –P. 167334. Объем 1.72 печатного листа. Вклад автора 55 %. IF=5.6 (Web of Science)
2. Zhdanova P.V., Chernonosov A.A., Prokhorova D.V., Stepanov G.A., Kanazhevskaya L.Y., **Koval V.V.** Probing the dynamics of streptococcus pyogenes Cas9 endonuclease bound to the sgRNA complex using hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences* –2022. –V. 23. –N. 3. –P. 1129. Объем 1.28 печатного листа. Вклад автора 55 %. IF=5.6 (Web of Science)
3. Baranova S.V., Zhdanova P.V., Lomzov A.A., **Koval V.V.**, Chernonosov A.A. Structure- and content-dependent efficiency of Cas9-assisted DNA cleavage in genome-editing systems. *International Journal of Molecular Sciences* –2022. –V. 23. –N. 22. –P. 13889. Объем 1.30 печатного листа. Вклад автора 60 %. IF=5.6 (Web of Science)
4. Zhdanova P.V., Lomzov A.A., Prokhorova D.V., Stepanov G.A., Chernonosov A.A., **Koval V.V.** Thermodynamic swings: how ideal complex of Cas9-RNA/DNA forms. *International Journal of Molecular Sciences* –2022. –V. 23. –N. 16. –P. 8891. Объем 1.45 печатного листа. Вклад автора 55 %. IF=5.6 (Web of Science)
5. Rechkunova N.I., Zhdanova P.V., Lebedeva N.A., Maltseva E.A., **Koval V.V.**, Lavrik O.I. Structural features of DNA polymerases β and λ in complex with benzo[a]pyrene-adducted DNA cause a difference in lesion tolerance. *DNA Repair* –2022. –V. 116. –P. 103353. Объем 1.44 печатного листа. Вклад автора 35 %. IF=3.8 (Web of Science)
6. Zhdanova P.V., Ishchenko A.A., Chernonosov A.A., Zharkov D.O., **Koval V.V.** Dataset for dynamics and conformational changes in human NEIL2 protein analyzed by integrative structural biology approach. *Data in Brief* –2021. –V. 40. –P. 107760. Объем 0.60 печатного листа. Вклад автора 55 %. IF=1.2 (Scopus)
7. Dyakonova E.S., **Koval V.V.**, Lomzov A.A., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Apurinic/apryrimidinic endonuclease Apn1 from *Saccharomyces cerevisiae* is recruited to the nucleotide incision repair pathway: kinetic and structural features. *Biochimie* –2018. –V. 152. –P. 53-62. Объем 1.64 печатного листа. Вклад автора 40 %. IF=3.9 (Web of Science)
8. Dyakonova E.S., **Koval V.V.**, Lomzov A.A., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Data on PAGE analysis and MD simulation for the interaction of endonuclease Apn1 from *Saccharomyces cerevisiae* with DNA substrates containing modified bases 5,6-dihydrouracil and 2-aminopurine. *Data in Brief* –2018. –V. 20. –P. 1515-1524. Объем 0.61 печатного листа. Вклад автора 40 %. IF=1.2 (Scopus)

9. Starostenko L.V., Rechkunova N. I., Lebedeva N. A., Lomzov A.A., **Koval V.V.**, Lavrik O.I. Processing of the abasic sites clustered with the benzo[a]pyrene adducts by the base excision repair enzymes. *DNA Repair* – 2017. –V. 50. –P. 43-53. Объем 1.29 печатного листа. Вклад автора 35 %. IF=3.8 (Web of Science)
10. Lukina M. V., **Koval V. V.**, Lomzov A. A., Zharkov D. O., Fedorova O. S. Global DNA dynamics of 8-oxoguanine repair by human OGG1 revealed by stopped-flow kinetics and molecular dynamic simulation. *Molecular BioSystems* –2017. –V. 13. –P. 1954–1966. Объем 1.78 печатного листа. Вклад автора 45 %. IF=2.9 (Web of Science)
11. Dyakonova, E.S., **Koval, V.V.**, Lomzov, A.A., Ishchenko, A.A., Fedorova, O.S. The role of His-83 of yeast apurinic/apyrimidinic endonuclease Ape1 in catalytic incision of abasic sites in DNA. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* –2015. –V. 1850. –P. 1297-1309. Объем 2.14 печатного листа. Вклад автора 40 %. IF=3.0 (Web of Science)
12. **Koval V.V.**, Knorre D.G., Fedorova O.S. Structural features of the interaction between human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1 and DNA. *Acta Naturae* –2014. –V. 6. –N. 3 –P. 52-65. Объем 1.67 печатных листа. Вклад автора 65 %. IF=2.0 (Web of Science)
13. Kanazhevskaya L.Y., **Koval V.V.**, Lomzov A.A., Fedorova O.S. The role of Asn-212 in the catalytic mechanism of human endonuclease APE1: Stopped-flow kinetic study of incision activity on a natural AP site and a tetrahydrofuran analogue. *DNA Repair* –2014. –V. 21. –P. 43-54. Объем 1.81 печатного листа. Вклад автора 55 %. IF=3.8 (Web of Science)
14. Lukina M.V., Popov A.V., **Koval V.V.**, Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Zharkov D.O. DNA damage processing by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase mutants with the occluded active site. *Journal of Biological Chemistry* –2013. – V. 288. –N. 40. –P. 28936–28947. Объем 1.53 печатного листа. Вклад автора 35 %. IF=5.157 (Web of Science)
15. Kanazhevskaya L.Yu., **Koval V.V.**, Vorobjev Yu.N., Fedorova O.S. Conformational dynamics of abasic DNA upon interactions with AP endonuclease I revealed by stopped-flow fluorescence analysis. *Biochemistry* – 2012. –V. 51. –N. 6. –P. 1306-1321. Объем 2.25 печатного листа. Вклад автора 45 %. IF=2.9 (Web of Science)
16. Dyakonova E.S., **Koval V.V.**, Ishchenko A.A., Sapparbaev M.K., Kaptein R., Fedorova O.S. Kinetic mechanism of the interaction of *Saccharomyces cerevisiae* AP-endonuclease 1 with DNA substrates. *Biochemistry Moscow* – 2012. –V. 77. –N. 10. –P. 1162–1171. Объем 1.04 печатного листа. Вклад автора 45 %. IF=2.824 (Web of Science)
17. Timofeyeva N.A., **Koval V.V.**, Ishchenko A.A., Sapparbaev M. K., Fedorova O.S. Kinetic mechanism of human apurinic/apyrimidinic endonuclease action in nucleotide incision repair. *Biochemistry Moscow* –2011. –V. 76. –P. 273–281. Объем 1.05 печатного листа. Вклад автора 40 %. IF=0,75 IF=2.824 (Web of Science)
18. Timofeyeva N.A., **Koval V.V.**, Ishchenko A.A., Sapparbaev M.K., Fedorova O.S. Lys98 Substitution in human AP endonuclease 1 affects the kinetic mechanism of enzyme action in base excision and nucleotide incision repair

- pathways. PLoS ONE –2011. –V. 6. –P. e24063. Объем 1.43 печатного листа. Вклад автора 45 %. IF=3.752 (Web of Science)
19. Lukzen N.N., Ivanov K.L., **Koval V.V.** Kinetic analysis of the search for damaged DNA bases by repair enzymes: theoretical investigation of diffusion-controlled steps. Russian Chemical Bulletin, International Edition 2011. –V. 60, –N. 12. –P. 2621—2624. Объем 0.36 печатного листа. Вклад автора 55 %. IF=1.704 (Web of Science)
 20. Kanazhevskaya L.Y., **Koval V.V.**, Zharkov D.O., Strauss P.R., Fedorova O.S. Conformational transitions in human AP endonuclease 1 and its active site mutant during abasic site repair. Biochemistry – 2010. –V. 49. –N. 30. –P.6451-6461. Объем 1.67 печатного листа. Вклад автора 40 %. IF=3.162 (Web of Science)
 21. Timofeyeva N.A., **Koval V.V.**, Knorre D.G., Zharkov D.O., Saparbaev M K., Ishchenko A.A., Fedorova O.S. Conformational dynamics of human AP endonuclease in base excision and nucleotide incision repair pathways. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics –2009. –V. 26. –P. 637-652. Объем 1.25 печатного листа. Вклад автора 45 %. IF=5.235 (Web of Science)
 22. Kuznetsov N.A., **Koval V.V.**, Zharkov D.O., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Kinetic conformational analysis of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase. Journal of Biological Chemistry –2007. –V. 282. –N. 2. –P. 1029–1038. Объем 1.38 печатного листа. Вклад автора 40 %. IF=5.157 (Web of Science)
 23. Kuznetsov N.A., **Koval V.V.**, Zharkov D.O., Vorobjev Yu.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Pre-steady-state kinetic study of substrate specificity of *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Biochemistry –2007. –V. 46. –N. 2. –P. 424-435. Объем 1.51 печатного листа. Вклад автора 45 %. IF=2.9 (Web of Science)
 24. Kuznetsov N.A., **Koval V.V.**, Zharkov D.O., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase. Nucleic Acids Research –2005. –V. 33. –N. 12. –P. 3919-3931. Объем 1.64 печатного листа. Вклад автора 55 %. IF=14.9 (Web of Science)
 25. **Koval V.V.**, Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Douglas K.T., Nevinsky G.A., Fedorova O.S. Pre-steady-state kinetics shows differences in processing of various DNA lesions by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Nucleic Acids Research –2004. –V. 32. –P. 926-935. Объем 1.38 печатного листа. Вклад автора 60 %. IF=14.9 (Web of Science)
 26. Fedorova O.S., Nevinsky G.A., **Koval V.V.**, Ishchenko A.A., Vasilenko N.L., Douglas K.T. Stopped-flow kinetic studies of the interaction between *Escherichia coli* Fpg protein and DNA substrates. Biochemistry –2002. –V. 41. –N. 5. –P. 1520-1528. Объем 1.11 печатного листа. Вклад автора 60 %. IF=2.9 (Web of Science)

Иные публикации по теме диссертации:

1. Федорова О.С., **Коваль В.В.**, Кузнецов Н.А. Способ определения активности 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека. Патент РФ № 2321637. Приоритет от 07.06.2006. Объем 0.44 печатного листа. Вклад автора 35 %.

Коваль Владимир Васильевич

автореферат диссертации на соискание
ученой степени доктора химических наук

Подписано в печать 12.02.2024 г. Печать офсетная.
Бумага офсетная. Формат 60x84 1/16. Усл. печ. 2 л.
Тираж 150 экз. Заказ № 127

Отпечатано в типографии «АЛЕКСПРЕСС»
ИП Малыгин Алексей Михайлович
630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 6/1, оф. 104
Тел.: (383) 217-43-46

