

УДК 577.151.4

КАТАЛИТИЧЕСКИ КОМПЕТЕНТНЫЕ КОНФОРМАЦИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА 8-ОКСОГУАНИН-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА*

© 2020 А.В. Попов^{1**}, А.В. Юдкина^{1,2}, Ю.Н. Воробьев¹, Д.О. Жарков^{1,2**}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия;
электронная почта: arorov@niboch.nsc.ru, dzharkov@niboch.nsc.ru

² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 15.04.2019

После доработки 09.11.2019

Принята к публикации 09.11.2019

Фермент 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаза (OGG1) в эукариотических клетках отвечает за удаление из ДНК 8-оксогуанина (охоG) – одного из самых часто встречающихся окисленных азотистых оснований. Фермент последовательно катализирует гидролиз *N*-гликозидной связи (ДНК-гликозилазная активность) и разрыв цепи ДНК с 3'-стороны от повреждения по механизму β-элиминирования (лиазная активность). Также фермент проявляет лиазную активность в отношении субстратов, содержащих апурин-апиридиноновые (AP-) сайты – остатки дезоксирибозы без азотистого основания. Фермент OGG1 высокоспецифичен к основанию напротив повреждения: он удаляет охоG и расщепляет AP-сайты напротив C, но не напротив A. Активность фермента также заметно снижается при аминокислотных заменах, стерически препятствующих связыванию охоG, вывернутого из спирали ДНК в активный центр фермента. Ранее молекулярно-динамическими методами была исследована конформационная динамика таких мутантных вариантов белка OGG1 человека в комплексе с субстратной ДНК, содержащей пару охоG:C, и выдвинуто предположение, что активность фермента зависит от заселенности определенных популяций конформеров каталитических остатков Lys249 и Asp268. В настоящей работе проведено молекулярно-динамическое исследование белка OGG1 человека в комплексе с ДНК, содержащей пару охоG:A, и мутантных вариантов белка OGG1 в комплексе с ДНК, содержащей пару AP:C. Показано, что низкая активность фермента сопровождается снижением заселенности популяций с остатками Lys249 и Asp268, расположенными оптимально для катализа. Для мутантных вариантов белка OGG1 экспериментально измерены константы скорости отдельных стадий реакции и показано, что их относительные значения согласуются с результатами моделирования. Таким образом, заселенность популяций каталитически компетентных конформеров остатков Lys249 и Asp268 в активном центре фермента служит решающим фактором активности фермента OGG1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: повреждение ДНК, репарация ДНК, 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилаза, субстратная специфичность.

DOI: 10.31857/S0320972520020062

Окисление макромолекул в клетках аэробных организмов происходит со значительной частотой под действием активных форм кислорода, возникающих как побочные продукты нормального метаболизма, а также в результате воздействия ионизирующей радиации [1, 2]. Окислительные повреждения митохондриальной и ядерной ДНК напрямую связаны с болез-

нями и старением. Активные формы кислорода могут вызывать разрывы сахарофосфатного остов, образование апурин-апиридиноновых (AP-) сайтов (остатков дезоксирибозы без азотистого основания) и предмутагенное повреждение гетероциклических оснований [1–3].

Одно из наиболее часто встречающихся в природе поврежденных азотистых оснований – 8-оксогуанин (охоG). Наличие кетогруппы при C8 приводит к тому, что свободный нуклеозид 8-оксо-2'-дезоксигуанозин (охоdG) предпочтительно существует в *син*-конформации, в отличие от канонических пуриновых дезоксирибонуклеозидов [4]. Эта конформация также стабилизируется при образовании хугстенонской пары с А, а в паре с С охоdG принимает *анти*-конформацию, близкую к канонической паре G:C

Принятые сокращения: AP-сайт – апурин-апиридиноновый сайт; OGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза; охоG – 8-оксогуанин; охоdG – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин; МД – молекулярная динамика; WT – дикий тип.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ19-116, 06.01.2020.

** Адресат для корреспонденции.

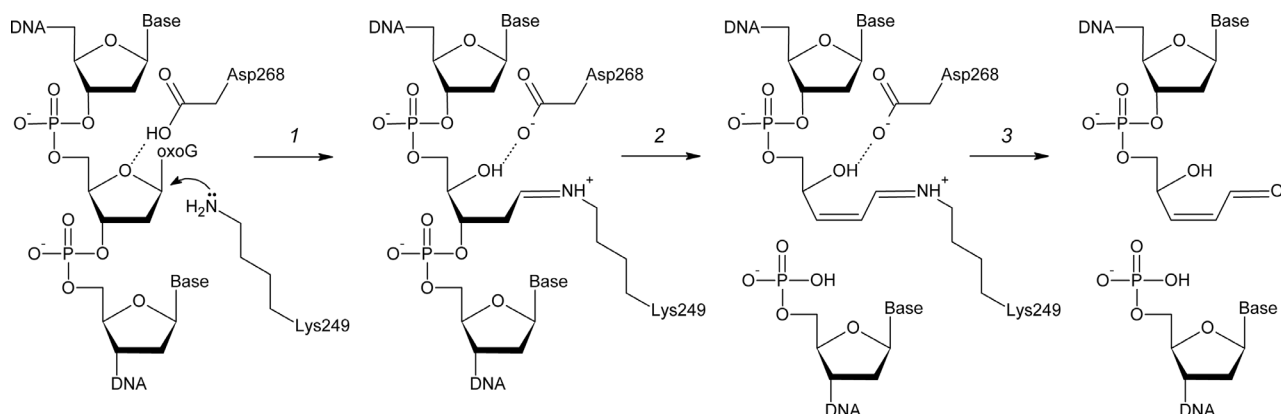


Рис. 1. Механизм расщепления поврежденной ДНК ферментом OGG1. Депротонированная ϵ -аминогруппа остатка Lys249 атакует атом C1' с образованием ковалентного интермедиата – основания Шиффа (1). Происходит расщепление остова ДНК по механизму β -элиминирования (2), после чего основание Шиффа гидролизуется с высвобождением фермента и образованием конечного продукта – одноцепочечного разрыва ДНК, содержащего на 3'-конце α,β -ненасыщенный γ -гидроксиальдегид (3)

[5–7]. Формирование устойчивой пары *охоG:A* объясняет мутагенность этого повреждения с преимущественным образованием трансверсий $G \rightarrow T$ [8, 9]. Уровень эндогенного *охоG* в ДНК составляет ~ 1 *охоG* на 10^6 G, и показана возможность его повышения в несколько раз при генотоксическом стрессе [10]. Еще более многочисленны в ДНК AP-сайты, которые образуются в результате спонтанного гидролиза *N*-гликозидной связи, а также возникают как интермедиаты в процессе эксцизионной репарации оснований [3]. Число AP-сайтов, присутствующих в любой момент времени в клетках человека, составляет ~ 1 на 10^5 оснований [11].

За удаление *охоG* из генома человека и других эукариот отвечает 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1, КФ 3.2.2.23) – фермент, гидролизующий *N*-гликозидную связь в нуклеотидах *охоG* в составе ДНК [12–15]. Фермент OGG1 также катализирует β -элиминирование с разрывом связи C3'–O3' как после удаления основания *охоG*, так и в спонтанно возникших AP-сайтах (рис. 1). У бактерий такую же функцию выполняет фермент Fpg, последовательность которого, однако, не гомологична последовательности полипептида OGG1 [16, 17]. Расщепление гликозидной связи ферментом OGG1 проходит по механизму нуклеофильного замещения с образованием ковалентного интермедиата (основания Шиффа) между ϵ -аминогруппой абсолютно консервативного остатка Lys249 и C1' поврежденного нуклеотида [18, 19]. Еще один абсолютно консервативный остаток, Asp268, по всей видимости, участвует в координации или протонировании остатка дезоксирибозы [20, 21] (рис. 1).

Структура OGG1 человека установлена для белка в свободном виде, в комплексе с ДНК, содержащей *охоG*, AP-сайт или неповрежденное основание G, и в комплексах, моделирующих конформеры, возникающие в ходе реакции [20–29] (PDB-коды: 1EBM, 1FN7, 1HU0, 1KO9, 1LWW, 1LWV, 1LWY, 1M3H, 1M3Q, 1N39, 1N3A, 1N3C, 1YQK, 1YQL, 1YQM, 1YQR, 215W, 2NOB, 2NOE, 2NOF, 2NOH, 2NOI, 2NOL, 2NOZ). Однако любые статичные структуры не дают полного понятия о конформационных ансамблях промежуточных ДНК-белковых комплексов в ходе узнавания повреждения. Такую информацию может дать метод молекулярной динамики (МД). Ранее с его помощью был изучен процесс выворачивания поврежденного основания из ДНК ферментом OGG1 [26, 30, 31], поведение основания в активном центре фермента после гидролиза *N*-гликозидной связи [24] и искажения, вносимые в структуру предкаталитического комплекса аминокислотными заменами, стерически блокирующими центр связывания *охоG* в молекуле фермента [32]. В последнем исследовании было показано, что можно выделить четыре стабильных конформации активного центра, отличающиеся положением и ориентацией каталитических аминокислотных остатков Lys249 и Asp268. Одна из них превалирует в комплексе белка OGG1 дикого типа с ДНК, содержащей пару *охоG:C*, а остальные преимущественно заселены в неактивных или малоактивных мутантных вариантах белка. В настоящей работе для анализа каталитической компетентности разных конформаций активного центра проведено моделирование фермента OGG1 дикого типа в комплексе с ДНК, содержащей пару

охоG:A, из которой охоG удаляется примерно на два порядка хуже по сравнению с оптимальным субстратом охоG:C. Также проведено моделирование фермента дикого типа и мутантных вариантов с заменами, стерически блокирующими центр связывания охоG, в комплексе с ДНК с парой AP:C. Показано, что активность фермента и в этих случаях коррелирует с заселенностью одной из конформаций, которую, таким образом, можно считать каталитически компетентной.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка моделей. Третичная структура комплекса ДНК-гликозилазы OGG1 человека с ДНК (PDB-код 1EVM) включает в себя двуцепочечную ДНК длиной 15 п.н. (рис. 2, а) с парой охоG:C. Основание охоG вывернуто в активный центр фермента и находится в *анти*-конформации [20]. В исходной структуре отсутствуют восемь N-концевых аминокислотных остатков, не включенных в модель, и внутренний участок Gly80–Lys82, который брали из структуры свободного белка OGG1 (PDB-код 1K09 [23]). Таким образом была получена модель WT-охоG:C. Для получения модели WT-охоG:A атомную структуру нуклеозида dA выравнивали со структурой dC по атомам O4', C1' и N1/N9 с использованием алгоритма Кабша [33] и встраивали в модель вместо dC. Аналогичным образом осуществляли аминокислотные замены: обратную замену Q249K вместо инактивирующей мутации

K249Q [20], а также C253I, C253L и Q315W. В соответствии с известным механизмом реакции и опубликованными данными моделирования методом QM/MM некоторые аминокислотные остатки моделировали в нестандартных зарядовых состояниях: Cys253 в виде тиолат-аниона, Lys249 с нейтральной ε-аминогруппой и Asp268 с нейтральной карбоксильной группой [20, 21, 26]. Замену охоG на AP-сайт проводили удалением атомов основания и заменой азота, образующего гликозидную связь, на атом кислорода. Восстановление недостающих атомов водорода и боковых цепей аминокислотных остатков и проверку моделей на отсутствие ошибок построения проводили в автоматическом режиме в программе BioPASED [34].

Молекулярная динамика и анализ траекторий. Точечные заряды и другие параметры силового поля для аминокислотных остатков в нестандартных зарядовых состояниях базировались на соответствующих параметрах из пакета AMBER 99 [35]. Параметры для охоG были взяты из работы Perlow-Poehnelt et al. [36], для AP-сайта — предоставлены проф. К. Симмерлингом (Университет штата Нью-Йорк, Стони-Брук, США). Все подготовленные структуры оптимизировали в течение 500 шагов в программе BioPASED методом сопряженных градиентов (алгоритм Флетчера) до достижения значений градиента потенциальной энергии порядка 10^{-1} ккал/моль и значений изменения координат порядка 10^{-4} Å и затем в течение 150 пс методом МД с постепенным разогревом от 50 до 300 К. Шаг интегрирования составлял 1 фс. Моделирование про-

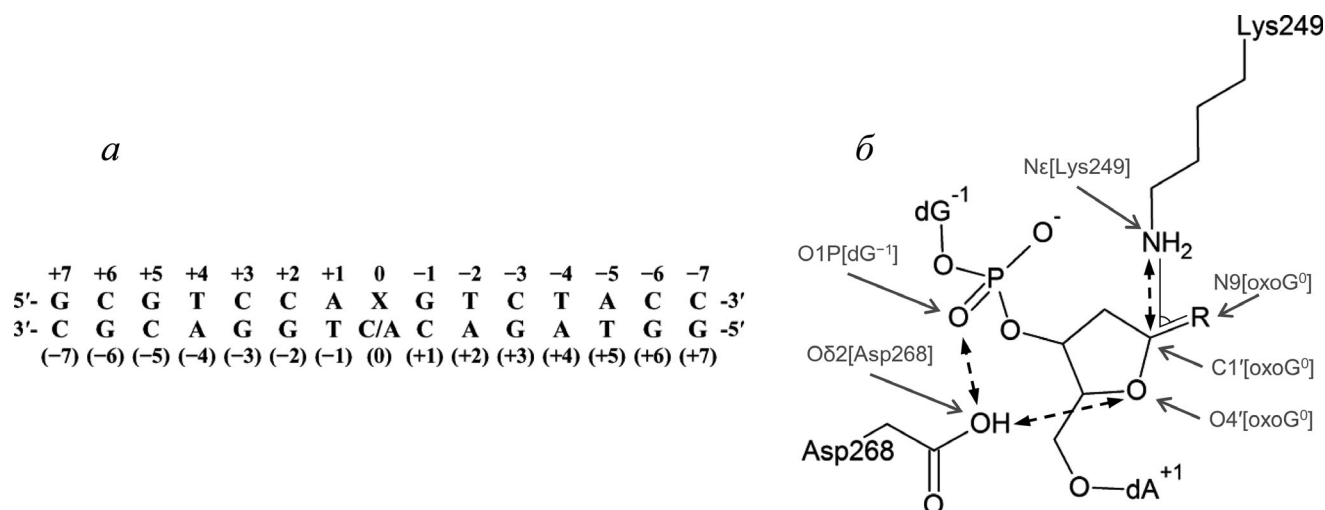


Рис. 2. а – Последовательность и нумерация нуклеотидов ДНК-субстрата, использованного для моделирования (X⁰ – охоG или AP-сайт); б – критические расстояния и углы в активном центре фермента OGG1, образованные каталитическими остатками Lys249 и Asp268. R – охоG для субстрата, содержащего охоG, или OH для субстрата, содержащего AP-сайт. Обозначены атомы, между которыми измеряются критические расстояния и углы

водили в рамках канонического NVT-ансамбля. В качестве модели сольватации выбрали модель неявного растворителя, позволяющую реализовать более эффективную выборку в конформационном пространстве благодаря отсутствию динамического трения явных молекул воды [37]. Структуры моделировали в программе BioPASED, использующей силовое поле, производное от ff99SB [34], в течение 10 нс с учетом водородных связей (множитель 2,5) и искусственными ограничениями потенциала силового поля для тяжелых атомов, введенными для стабилизации комплекса белок–ДНК: 0,001 ккал/Å² для атомов белка, 0,25 ккал/Å² для атомов крайних нуклеотидов ДНК и 0,0025 ккал/Å² для остальных атомов ДНК. Для нейтрализации отрицательного заряда системы использовали метод масштабирования зарядов фосфатных групп с множителем 0,2 [38, 39]. Запись координат системы осуществляли каждые 2 пс.

Полученные траектории анализировали с помощью программы MDTRA [40]. Для визуализации траекторий и структур использовали программы VMD [41], RasMol [42] и PyMol («Schrödinger», США). Траектория для модели WT-охоG:C была получена ранее в идентичных условиях [32] и использована для сравнительного анализа без изменений. Анализ времени стабилизации траекторий методом обратного кумулятивного усреднения [43] и кластеризацию моделей проводили при помощи скриптов на языке R, для построения дендрограмм использовали пакет iTOL [44].

Олигонуклеотиды и ферменты. В работе использовали полинуклеотидкиназу фага T4 («Биосан», Новосибирск) и урацил-ДНК-гликозилазу из *E. coli* («New England Biolabs», США). Выделение рекомбинантного белка OGG1 дикого типа и его мутантных вариантов и определение концентрации активной формы фермента было описано ранее [32]. Для исследования активности фермента использовали синтезированные в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН олигодезоксирибонуклеотиды: OG23 5'-СТСТСССТТХСТССТТТСССТТ-3' (X = охоG); U23 5'-СТСТСССТТХСТССТТТСССТТ-3' (X = Ura); C23 5'-AGAGGAAAGGAGCGAAGGGA-GAG-3'. Для получения субстрата в цепи OG23 и U23 вводили радиоактивную метку с использованием γ [³²P]-АТФ и полинуклеотидкиназы по стандартной методике [45] и проводили отжиг с двукратным молярным избытком цепи C23. Субстрат с цепью U23 затем обрабатывали в течение 30 мин при 37 °С урацил-ДНК-гликозилазой в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ этилендиаминтет-

раацетат натрия и 1 мМ дитиотреитол, и немедленно использовали для проведения реакции.

Определение кинетических параметров реакций, катализируемых ферментом OGG1. Стандартная реакционная смесь содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 1 мМ этилендиаминтетраацетат натрия, 1 мМ дитиотреитол, 0,1 мг/мл БСА. Для определения активности фермента OGG1 и его мутантных вариантов использовали 50 нМ субстрат и 1–1000 нМ фермент, реакцию проводили в течение 10 мин при 37 °С. В случае субстрата охоG:C реакцию останавливали добавлением NaOH до концентрации 100 мМ, после чего пробы прогревали в течение 2 мин при 95 °С, нейтрализовали добавлением эквимольного количества HCl и добавляли равный объем денатурирующего раствора: 80%-ный (v/v) формамид, 20 мМ этилендиаминтетраацетат натрия, 0,1%-ный (w/v) ксиленианол и 0,1%-ный (w/v) бромфеноловый синий. В случае субстрата AP:C реакцию останавливали добавлением равного объема денатурирующего раствора. Продукты реакции анализировали методом электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 8 М мочевины [45]. Константы скорости реакции k_{ex} и k_{AP} определяли в условиях кинетики одного оборота при 13 °С и концентрациях субстрата 10 нМ и фермента 200 нМ, а константу k_{cl} – в условиях кинетики фазы всплеска при 37 °С и концентрациях субстрата 100 нМ и фермента 5 нМ, как описано ранее [46, 47]. Статистическую достоверность различий между кажущимися константами скорости для разных вариантов оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конформационная динамика активного центра фермента OGG1 в комплексе с субстратом охоG:A. В предыдущих работах по моделированию МД комплекса OGG1–ДНК было выявлено, что фермент дикого типа отличается от малоактивных или вовсе неактивных мутантных вариантов C253I, C253L и Q315W по заселенности определенных конформаций активного центра [32] (рис. 2, б). В активном центре фермента OGG1 присутствуют каталитические остатки Lys249, который осуществляет нуклеофильную атаку по атому C1', и Asp268, который удерживает атом O4' поврежденного нуклеотида. Как показывает моделирование методом QM/ММ, оба остатка преимущественно существуют в нейтральном зарядовом состоянии [20, 21, 26]. Для активного центра фермента дикого типа характерны значения угла Nζ[Lys249]–C1'[охоG]–N9[охоG] в области 75°, оптималь-

ные для нуклеофильной атаки в направлении C1'→N9, а также присутствие протонированной карбоксильной группы Asp268 вблизи O4' и отсутствие ее альтернативной связи с фосфатом с 3'-стороны от поврежденного нуклеотида [32]. Замены C253I, C253L и Q315W уменьшают объем активного центра и вызывают его искажение при связывании охoG. В результате популяции конформеров, характерных для белка дикого типа, значительно снижается (C253I) или полностью исчезает (C253L, Q315W), и преимущественно заселяются конформации с альтернативной связью Asp268 и поворотом Lys249 на ~35° от оптимального угла атаки [32]. Схожие изменения выявляются в статичных структурах и в МД других мутантных вариантов (R46Q, R131Q, R154H, Q315F) со стерически заблокированным активным центром [28, 48], а также в МД при связывании охoG в каталитически неблагоприятной *син*-конформации [49].

Остается неясным, насколько изменения конформации активного центра, выявленные для трех мутантных вариантов белка, отражают особенности снижения активности фермента OGG1 в других случаях. Для ответа на этот вопрос было проведено исследование МД белка OGG1 дикого типа в комплексе с ДНК, содержащей пару охoG:A (WT-охoG:A), в сравнении с ранее построенной моделью с парой охoG:C (WT-охoG:C). Фермент OGG1 демонстрирует высокую специфичность к основанию напротив повреждения, предпочитая удалять охoG из пар охoG:C, но не из охoG:A [19, 50]. Нуклеозид dA моделировали в *анти*-конформации, в которой он существует в паре охoG:A в ДНК [5, 6], поскольку из-за тесного окружения белком основания напротив охoG его вращение вокруг N-гликозидной связи стерически затруднено. Анализ RMSD тяжелых атомов методом обратного кумулятивного усреднения [43] показал, что обе траектории стабилизируются приблизительно к 5 нс, поэтому далее для анализа конформаций в активном центре использовали последние 5 нс.

Модель WT-охoG:A показала низкое отклонение позиций тяжелых атомов, не превышающее 1,6 Å (рис. 3, а, б). Как и в модели WT-охoG:C, основание охoG было вывернуто в карман, образуемый остатками Phe319 и Cys253, и удерживалось водородными связями с Gln315 и Gly42. Модели WT-охoG:A и WT-охoG:C не отличались по своим взаимодействиям с основанием охoG (рис. 4, а).

Контакты аминокислотных остатков Asn149, Arg154 и Arg204 с противоположной цепью ДНК осуществлялись в моделях WT-охoG:C и WT-охoG:A похожим образом (рис. 4, б, в). В модели WT-охoG:C комплементарный цитозин C⁽⁰⁾ обра-

зовывал водородную связь Oδ1[Asn149]...N⁴[C⁽⁰⁾], а атомы Nη1 и Nη2 остатков Arg154 и Arg204 находились в положениях, позволяющих в разных комбинациях образовывать водородные связи с O² и N3 C⁽⁰⁾ (рис. 4, б). В модели WT-охoG:A на протяжении всей траектории наблюдалась связь Oδ1[Asn149]...N⁶[A⁽⁰⁾], а гуанидиновая группа Arg204 взаимодействовала с N3 и N1 основания A⁽⁰⁾ либо за счет катион-π-взаимодействий (рис. 4, в). Боковой радикал Arg154 в модели WT-охoG:A отклонялся от A⁽⁰⁾ и образовывал связи с ДНК с 5'-стороны от него. Однако в целом можно сказать, что белок OGG1 может стабильно взаимодействовать как с C, так и с A напротив охoG. Маловероятно, что дестабилизация взаимодействий с основанием напротив повреждения служит причиной низкой активности фермента OGG1 по отношению к субстратам охoG:A.

Иная картина была выявлена при анализе конформаций каталитических остатков в активном центре (рис. 4, г, д). Расстояние Nζ[Lys249]—C1'[охoG] в модели WT-охoG:A держалось на ~0,25 Å больше, чем в охoG:C. Угол Nζ[Lys249]—C1'[охoG]—N9[охoG] также стабильно отличался (105° в модели WT-охoG:A против 75° в модели WT-охoG:C). Карбоксильная группа Asp268 в обеих моделях находилась вблизи O4'. Это позволяет сделать вывод, что решающим параметром, снижающим активность фермента OGG1 при наличии A напротив повреждения, служит неблагоприятная ориентация аминогруппы Lys249.

Конформационная динамика активного центра фермента OGG1 в комплексе с субстратами, содержащими AP-сайт. Аминоокислотные замены, которые стерически затрудняют связывание охoG в предназначенном для этого кармане в структуре белка OGG1, приводят к искажению активного центра в области каталитических остатков Lys249 и Asp268 и инактивации фермента [28, 32, 48]. Замещение охoG на AP-сайт должно приводить к появлению дополнительного свободного пространства для объемных заместителей, образующих стенки активного центра. Можно ожидать, что активность мутантных вариантов на таком субстрате должна снижаться в меньшей степени. Для проверки этой гипотезы было проведено моделирование МД комплексов такой ДНК с ферментом дикого типа (модель WT-AP) и тех же самых мутантных вариантов (модели C253I-AP, C253L-AP и Q315W-AP). Напротив повреждения во всех случаях находилось основание C. Все модели в целом уравнивались к 7–7,5 нс (рис. 3, в–к). Среднеквадратичное отклонение позиций тяжелых атомов остова белка и ДНК не превышало 1,8 Å. Одна-

ко из-за отсутствия oхoG активный центр фермента был более мобильным (рис. 3, ж–к).

В структуре комплекса WT-охоG:C и основанных на ней моделях МД вывернутое из ДНК осно-

вание oхoG зажато между ароматическим кольцом остатка Phe319 и боковым радикалом остатка Cys253 и стабилизировано водородными связями O[Gly42]...N7[охоG⁰], Oε1[Gln315]...N1[охоG⁰] и

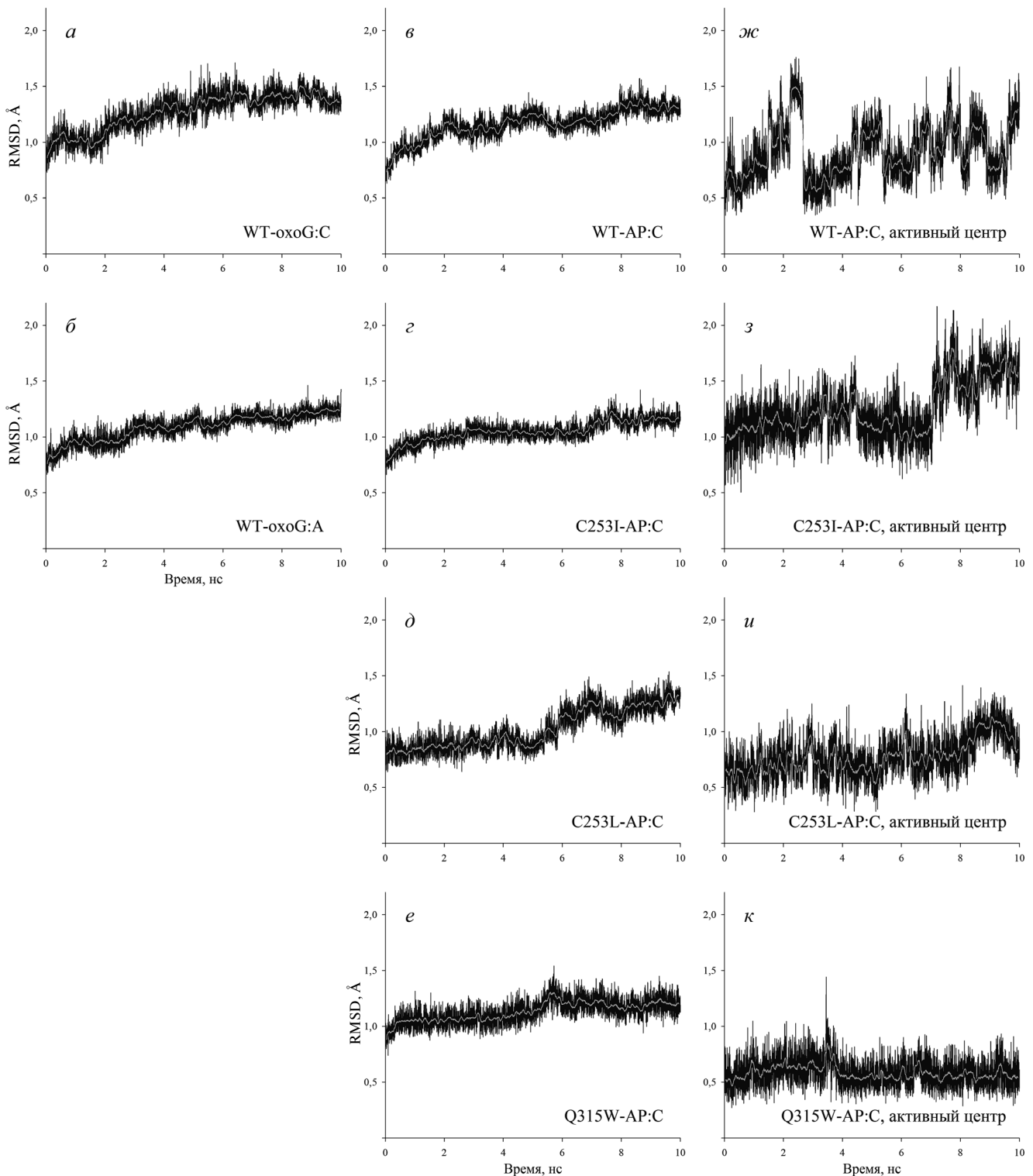


Рис. 3. Среднеквадратичное отклонение положений атомов в ходе моделирования. Расчет проводили по всем тяжелым атомам (C, N, O и P) полипептидного и нуклеотидного остова (*a–e*) или по всем тяжелым атомам остатков Lys249, Asp268 и AP⁰ (*ж–к*). Названия моделей приведены на графиках. Светлыми линиями показаны графики скользящего среднего по 50 точкам

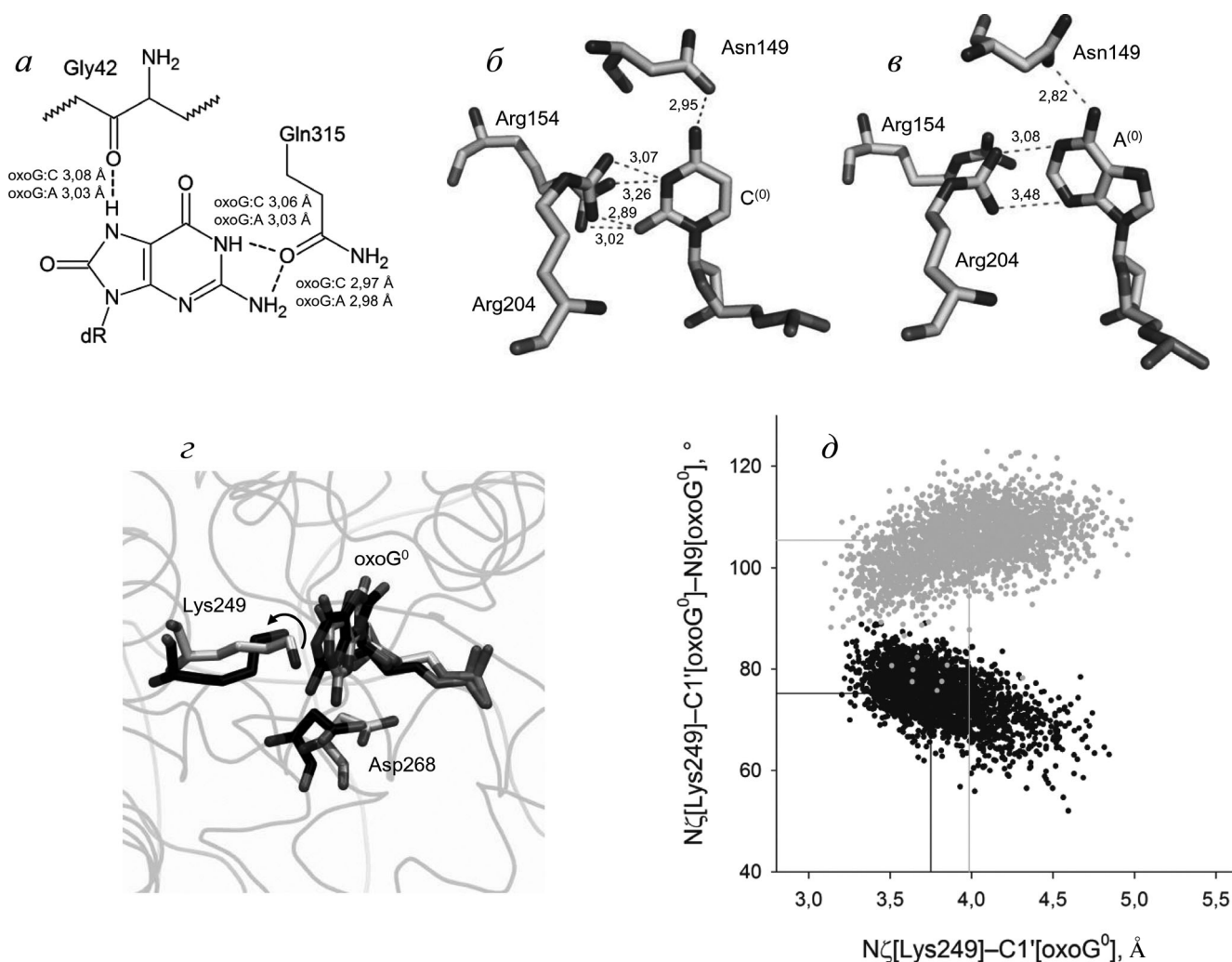


Рис. 4. Структура и динамика активного центра фермента OGG1 в комплексе с субстратом *охоG:A*. *a* – Схема взаимодействия аминокислотных остатков белка OGG1 с основанием *охоG*. Указаны средние значения расстояний между атомами N и O, образующими водородную связь, в ходе МД; *б* – взаимодействия белка OGG1 с основанием C напротив повреждения, выявленные методом рентгеноструктурного анализа в структуре 1EVM [20]; *в* – взаимодействия белка OGG1 с основанием A напротив повреждения, выявленные в ходе МД. Указаны расстояния в ангстремах, соответствующие возможному образованию водородной связи; *г* – репрезентативные структуры из траекторий WT-*охоG:C* (атомы углерода показаны черным цветом) и WT-*охоG:A* (атомы углерода показаны белым), иллюстрирующие взаимное расположение каталитических остатков Lys249 и Asp268 и поврежденного нуклеотида *охоG⁰*. Стрелкой отмечен поворот ε-аминогруппы остатка Lys249; *д* – значения расстояния Nζ[Lys249]–C1'[*охоG⁰*] и угла Nζ[Lys249]–C1'[*охоG⁰*]–N9[*охоG⁰*] для моделей белка OGG1 в комплексе с субстратом *охоG:C* (черные точки) и *охоG:A* (серые точки). Линии соответствующих цветов отмечают медианные значения распределений

$O\epsilon 1[Gln315] \dots N^2[охоG^0]$ (рис. 4, *a*). Во всех моделях, содержащих AP-сайт, эти взаимодействия отсутствуют, и остатки активного центра проявляют значительно большую подвижность. Остатки Leu253 и Ile253 в моделях C253L-AP и C253I-AP выдвигаются в активный центр, однако, не находя преграды в виде *охоG*, не приводят к его деформации (рис. 5, *a*). Контакты с противоположной цепью ДНК, не содержащей AP-сайта, в целом соответствовали тем, что наблюдались в модели WT-*охоG:C*.

Несмотря на отсутствие деформации активного центра, в моделях с AP-сайтом каталитически важные аминокислотные остатки Lys249 и Asp268 фиксировались вблизи поврежденного нуклеотида хуже, чем в модели WT-*охоG:C*, что согласуется с меньшей активностью фермента в отношении AP-субстратов [19]. Это было в большей степени характерно для мутантных вариантов фермента: в моделях C253I-AP и C253L-AP остаток Asp268 часто взаимодействовал с O1P[dG⁻¹], теряя контакт с O4' AP-сайта в

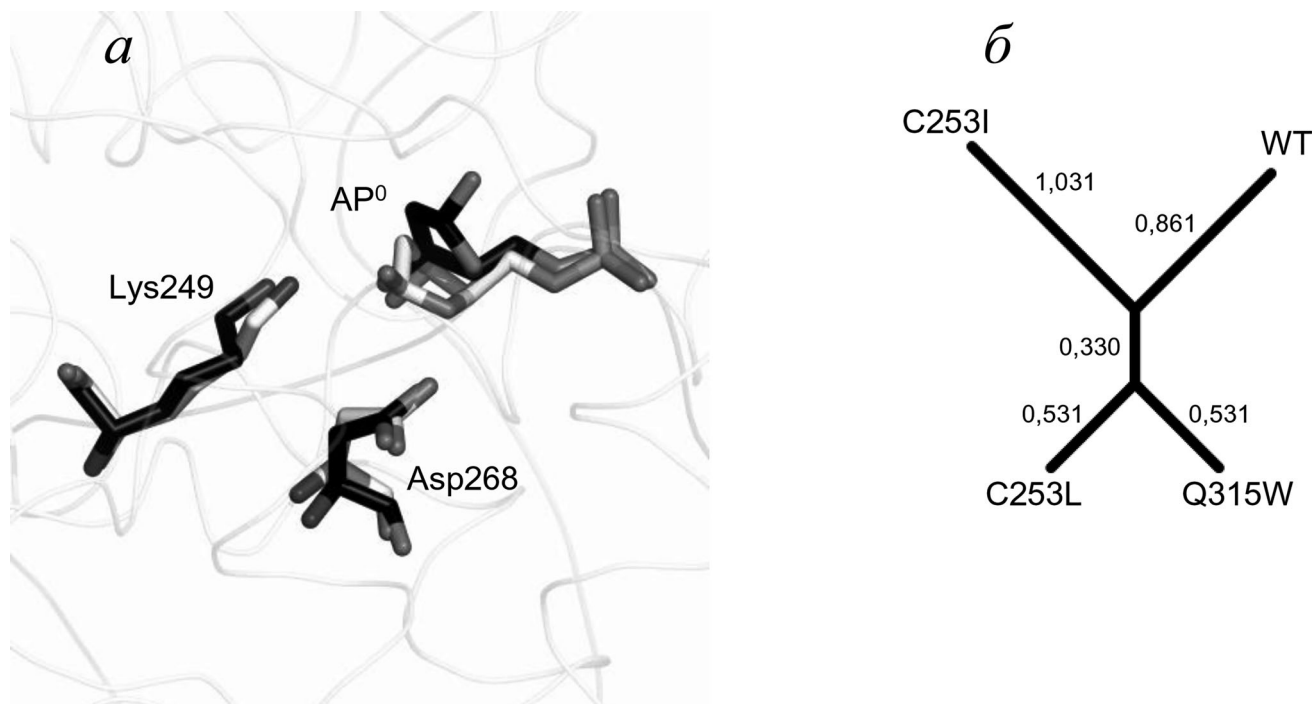


Рис. 5. Структура и динамика активного центра фермента OGG1 в комплексе с субстратом AP:C. *a* – Репрезентативные структуры из траекторий WT-AP (атомы углерода показаны белым цветом) и C253I-AP (атомы углерода показаны черным), иллюстрирующие взаимное расположение каталитических остатков Lys249, Asp268 и AP-сайта; *б* – кластеризация моделей по значениям расстояний $N\zeta[\text{Lys249}] - C1'[\text{AP}^0]$, $O\delta2[\text{Asp268}] - O4'[\text{AP}^0]$ и $O\delta2[\text{Asp268}] - O1P[\text{dG}^{-1}]$ в пространстве Махаланобиса. Числа соответствуют длинам ветвей дендрограммы

последние 2–2,5 нс. Вариант Q315W-AP демонстрировал более стабильную динамику, в целом соответствующую поведению модели дикого типа. Угол атаки аминогруппы Lys249 в случае AP-сайта не играет критической роли, т.к. из-за эпимеризации полуацетальный гидроксил при атоме C1' не имеет однозначной пространственной ориентации. Однако каталитически значимым остается расстояние $N\zeta[\text{Lys249}] - C1'[\text{AP}^0]$, которое вследствие повышенной мобильности активного центра сильно флуктуировало во всех моделях, содержащих AP-сайт [32]. Таким образом, для анализа были выбраны три каталитически значимых расстояния: $N\zeta[\text{Lys249}] - C1'[\text{AP}^0]$, $O\delta2[\text{Asp268}] - O4'[\text{AP}^0]$ и $O\delta2[\text{Asp268}] - O1P[\text{dG}^{-1}]$. Для минимизации эффектов избыточной подвижности остатков в отсутствие азотистого основания рассматривались более стабильные последние 2,5 нс динамики. Распределение популяций этих расстояний показало, что благоприятная для катализа конформация складывается главным образом в модели дикого типа (рис. 6, *a–в*), где расстояние между атомом C1' AP-сайта и аминогруппой Lys249 лежит в области $< 3,5$ Å. В модели C253I-AP (рис. 6, *г–е*) при общем увеличении этого расстояния ($\sim 5,5$ Å) возникала стабильная водородная связь между

Asp268 и фосфатной группой dG^{-1} , поэтому предположительно активность этого мутанта в отношении субстратов, содержащих AP-сайт, будет снижена в наибольшей степени. Популяция конформаций модели C253L-AP распадалась на два выраженных кластера по ориентации Asp268 (рис. 6, *ж–и*), а в модели Q315W-AP, напротив, была довольно компактной (рис. 6, *к–м*). Расстояние $N\zeta(\text{Lys249}) - C1'[\text{AP}^0]$ в обоих случаях составляло в среднем $4,5$ Å. Таким образом, расположение каталитически важной аминогруппы Lys249 в активном центре фермента OGG1 оказывается решающим и в случае субстратов, содержащих AP-сайт.

На основе трех указанных физических расстояний была проведена кластеризация моделей для определения их схожести друг с другом (рис. 5, *б*). Для оценки дистанции между моделями использовали расстояние между центрами распределений в евклидовом пространстве, расстояние Махаланобиса (расстояние между центрами распределений с учетом корреляции между переменными) и расстояние Ходжеса–Лемана (медиана попарных расстояний между всеми точками двух выборок). Во всех случаях модели C253L-AP и Q315W-AP были ближе всего друг к другу, а модель C253I-AP отстояла дальше всего

от них и от модели дикого типа. В целом результаты моделирования позволяют предположить, что в отношении субстратов, содержащих AP-сайт, активность мутантных вариантов будет выше, чем в отношении субстратов с ohoG, а ак-

тивность вариантов C253L и Q315W – выше, чем активность C253I.

Кинетические параметры реакции, катализируемой мутантными вариантами фермента OGG1. Для оценки влияния замен аминокислотных ос-

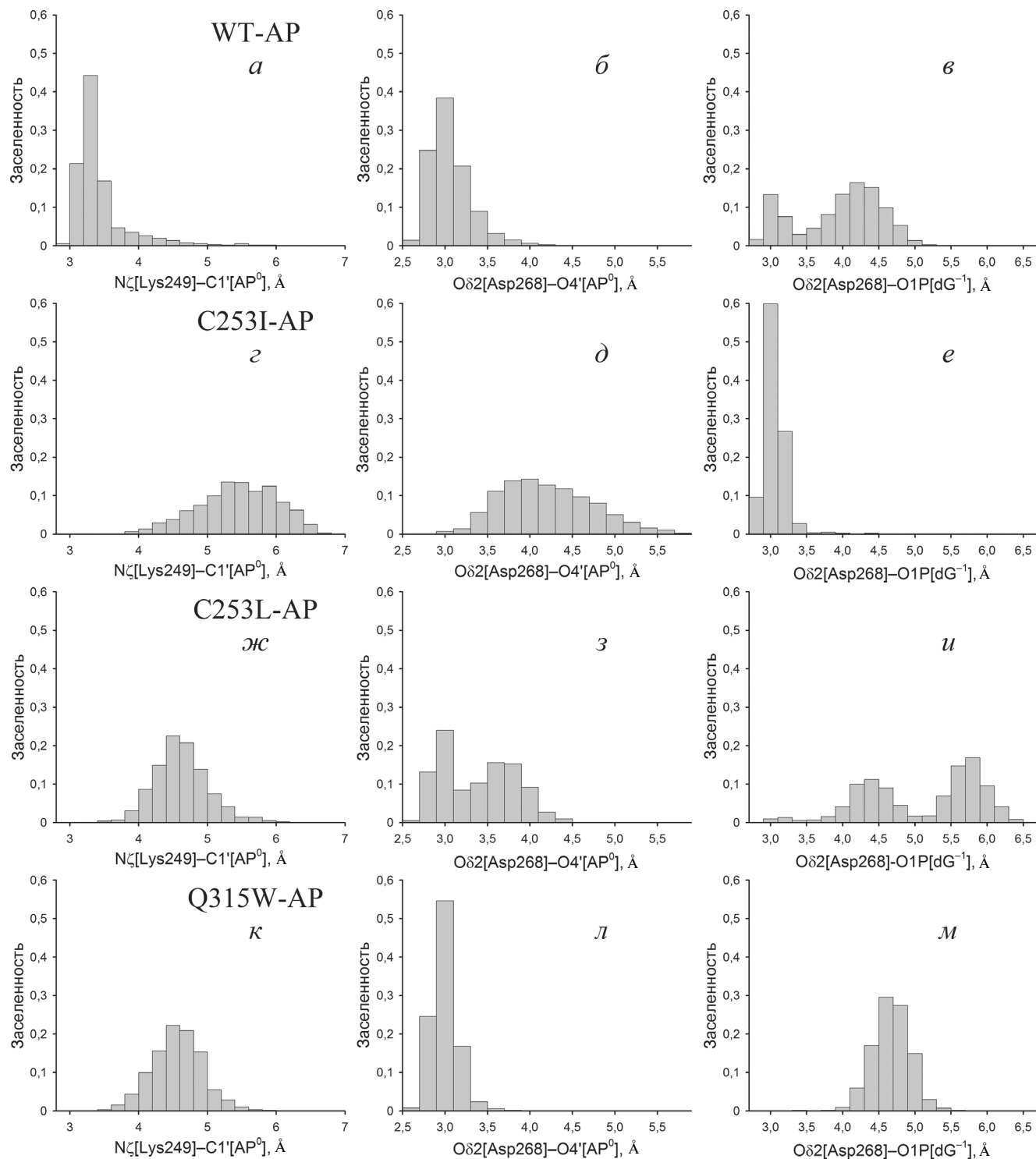


Рис. 6. Гистограммы распределения значений расстояний $N\zeta[\text{Lys249}]–C1'[\text{AP}^0]$ (а, г, ж, к), $O\delta2[\text{Asp268}]–O4'[\text{AP}^0]$ (б, д, з, л) и $O\delta2[\text{Asp268}]–O1P[dG^{-1}]$ (в, е, и, м) для моделей WT-AP (а–в), C253I-AP (г–е), C253L-AP (ж–и) и Q315W-AP (к–м)

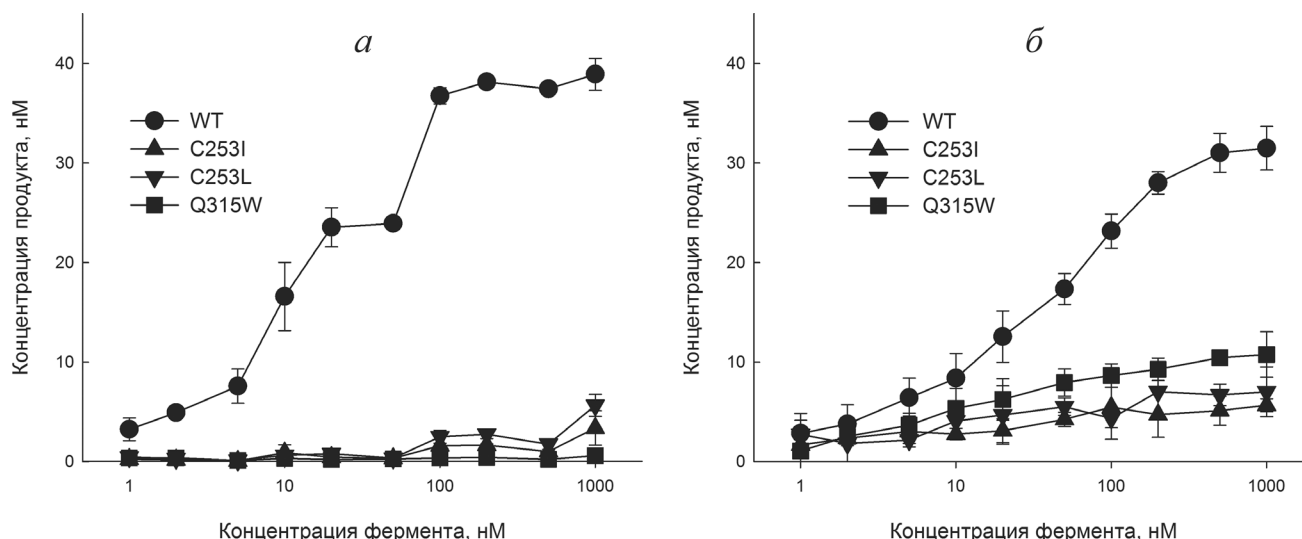
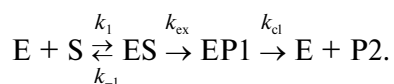


Рис. 7. Активность вариантов фермента OGG1. *а* – Расщепление субстрата, содержащего пару охoG:C; *б* – расщепление субстрата, содержащего пару AP:C. Графики построены по данным трех независимых экспериментов

татков в активном центре фермента OGG1 на его активность были получены и выделены в чистом виде варианты белка, несущие замены C253I, C253L и Q315W. Как и ожидалось, они обладали заметно сниженной активностью по отношению к удалению охoG из ДНК (рис. 7, *а*; табл. 1).

Фермент OGG1 последовательно катализирует реакцию гидролиза *N*-гликозидной связи и β -элиминирования, при этом второй этап реакции протекает намного медленнее первого [19, 46, 47, 51]. В связи с этим в литературе кинетический механизм действия фермента OGG1 обычно описывают двухступенчатой схемой, в которой скорость реакции лимитируется последней стадией:



Константа k_{ex} в данном случае отражает скорость гидролиза *N*-гликозидной связи, а кон-

станта k_{cl} представляет собой комбинированный параметр скорости β -элиминирования и распада фермент-субстратного комплекса. Для фермента дикого типа измеренные значения k_{ex} и k_{cl} составляли $(9,7 \pm 0,9) \times 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ и $(0,5 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ соответственно, что согласуется с литературными данными. Замены C253I и C253L примерно на порядок снижали значение k_{ex} (табл. 1), а замена Q315W приводила к полной инактивации фермента. Такие последствия вполне ожидаемы для мутаций, мешающих связыванию охoG в активном центре фермента. Влияние замен на k_{cl} было менее выраженным, однако эта константа также снижалась примерно в 5 раз (табл. 1). Очевидно, конформационные искажения, возникающие из-за стерических взаимодействий охoG с объемными группами, влияют и на эффективность реакции β -элиминирования. Интересно, что в качестве возможного акцептора для уходящего в реакции β -элиминирования протона при C2' ряд авторов рассматривает само основание охoG, удерживаемое в активном центре фермента в анионной

Таблица 1. Значения кажущихся констант скоростей последовательных стадий реакции расщепления ферментом OGG1 ДНК-субстрата, содержащего пару охoG:C

Варианты фермента	$k_{ex}, \text{ мин}^{-1}$	$k_{ex} (\text{мутант}) : k_{ex} (\text{WT})$	$k_{cl}, \text{ мин}^{-1}$	$k_{cl} (\text{мутант}) : k_{cl} (\text{WT})$
OGG1 WT	$(9,7 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	1	$(0,5 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	1
C253I	$(0,90 \pm 0,05) \times 10^{-2}$	$0,09 \pm 0,01$	$(0,11 \pm 0,06) \times 10^{-2}$	$0,2 \pm 0,1$
C253L	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	$0,13 \pm 0,01$	$(0,11 \pm 0,07) \times 10^{-2}$	$0,2 \pm 0,1$
Q315W	нет реакции	–	нет реакции	–

форме после первой стадии реакции [24]. В таком случае эффективность β -элиминирования может снижаться не только за счет конформационных искажений дезоксирибозы в активном центре, но и из-за снижения сродства свободного охoG к белку OGG1.

При наличии в ДНК-субстрате AP-сайта активность мутантных вариантов была также снижена, но в меньшей степени, чем в случае субстрата с охoG (рис. 7, б; табл. 2). Реакция в этом случае сводится только к процессу β -элиминирования, причем, очевидно, акцептором протона не может выступать выщепленное основание охoG. Кажущаяся константа k_{AP} , определенная методом кинетики одного оборота, в этом случае имеет физический смысл константы скорости реакции β -элиминирования, не осложненной высвобождением продукта. Замены C253I, C253L и Q315W оказывали небольшое влияние на значение k_{AP} , снижая его примерно вдвое (табл. 2), что согласуется с отсутствием необходимости связывания основания в активном центре. Для фермента дикого типа и вариантов C253I и C253L эти значения были в 2,4–5,0 раз выше, чем k_{cl} для охoG-субстратов, что свидетельствует о вкладе как β -элиминирования, так и распада фермент-субстратного комплекса в комбинированную константу k_{cl} при наличии поврежденного основания в субстрате.

Как видно из рис. 7 и табл. 1 и 2, активность мутантных вариантов фермента OGG1 в отношении AP-субстратов была выше, чем в отношении охoG-субстратов. Это согласуется с данными по активности других бифункциональных ДНК-гликозилаз, для которых замены в активном центре зачастую полностью подавляют ДНК-гликозилазную активность, но практически не затрагивают AP-лиазную активность, несмотря на участие в катализе одних и тех же аминокислотных остатков [52, 53]. Такая разница в последствиях аминокислотных замен обычно объясняется частичным внеспиральным расположением AP-сайта и пластичностью активного центра ферментов. Также можно заметить, что относительная активность разных мутантных вариантов фермента OGG1 в отношении охoG- и AP-субстратов различалась: для охoG-субстратов активность мутантных вариантов можно расположить в порядке C253L \geq C253I \gg Q315W, а для AP-субстратов – в порядке Q315W $>$ C253L \geq C253I. Для обоих субстратов константы скорости для C253L и C253I достоверно не отличались друг от друга. В случае Q315W с AP-субстратом значение k_{AP} было достоверно выше, чем для C253I ($p < 0,01$). Относительная активность достаточно хорошо согласуется с заселенностью популяций кон-

Таблица 2. Значения кажущейся константы скорости реакции расщепления ферментом OGG1 ДНК-субстрата, содержащего пару AP:C

Варианты фермента	k_{AP} , мин ⁻¹	$k_{AP}(\text{мутант}) : k_{AP}(\text{WT})$
OGG1 WT	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	1
C253I	$(0,48 \pm 0,05) \times 10^{-2}$	$0,40 \pm 0,05$
C253L	$(0,55 \pm 0,09) \times 10^{-2}$	$0,46 \pm 0,08$
Q315W	$(0,71 \pm 0,07) \times 10^{-2}$	$0,59 \pm 0,08$

формеров, выгодных для катализа, что можно считать частичным экспериментальным подтверждением результатов МД.

Таким образом, молекулярно-динамическое исследование белка OGG1 в комплексе с различными субстратными ДНК позволяет предположить, что заселенность популяций каталитически компетентных конформеров остатков Lys249 и Asp268 служит одним из главных факторов, определяющих его ферментативную активность. В этом отношении ДНК-гликозилаза OGG1 человека оказывается схожей с бактериальной 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазой Fpg, несмотря на отсутствие гомологии этих белков на уровне как первичной, так и третичной структуры. В случае Fpg основными параметрами активного центра, способствующими эффективному катализу, оказываются конформации остатков Pro1 и Glu2, выполняющих те же функции, что и Lys249 и Asp268 у фермента OGG1 [54, 55]. Результаты работы согласуются с сообщениями в литературе о том, что и мутации, препятствующие продуктивному связыванию охoG в кармане внутри белковой глобулы OGG1, и связывание охoG в неблагоприятной ориентации вызывают конформационные изменения, которые распространяются более чем на 10 Å и достигают каталитических аминокислотных остатков [48, 49]. Определение критических для катализа расстояний и углов позволяет использовать геометрию активного центра для предсказания активности природных вариантов белка OGG1, что может оказаться важным для предсказания индивидуального риска развития онкологических заболеваний и ответа опухолей на химио- и радиотерапию, повреждающую ДНК. Исследования в этом направлении в данный момент продолжаются.

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 18-74-00052 (моделирование, ферментативная кинетика) и частично проектами базового бюджетного

финансирования ПФНИ ГАН 2013–2020 № АА-АА-А17-117020210023-1 (синтез олигонуклеотидов, выделение части белков) и Минобрнауки России (проект 6.5773.2017/ВУ, анализ данных).

Благодарности. Расчеты выполняли на суперкомпьютерном кластере НКС-30Т Сибирского суперкомпьютерного центра СО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Von Sonntag, C. (2006) *Free-radical-induced DNA damage and its repair: a chemical perspective*, Springer, Berlin–Heidelberg.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed., Oxford University Press, Oxford.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., and Ellenberger, T. (2006) *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C.
- Culp, S.J., Cho, B.P., Kadlubar, F.F., and Evans, F.E. (1989) Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**, 416–422, doi: 10.1021/tx00012a010.
- Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A.P., and Patel, D.J. (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn)•dA(anti) alignment at lesion site, *Biochemistry*, **30**, 1403–1412, doi: 10.1021/bi00219a034.
- McAuley-Hecht, K.E., Leonard, G.A., Gibson, N.J., Thomson, J.B., Watson, W.P., Hunter, W.N., and Brown, T. (1994) Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs, *Biochemistry*, **33**, 10266–10270, doi: 10.1021/bi00200a006.
- Lipscomb, L.A., Peek, M.E., Morningstar, M.L., Verghis, S.M., Miller, E.M., Rich, A., Essigmann, J.M., and Williams, L.D. (1995) X-Ray structure of a DNA decamer containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 719–723, doi: 10.1073/pnas.92.3.719.
- Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, **349**, 431–434, doi: 10.1038/349431a0.
- Grollman, A.P., and Moriya, M. (1993) Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within, *Trends Genet.*, **9**, 246–249, doi: 10.1016/0168-9525(93)90089-Z.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage), Gedik, C.M., and Collins, A. (2005) Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study, *FASEB J.*, **19**, 82–84, doi: 10.1096/fj.04-1767fje.
- Atamna, H., Cheung, I., and Ames, B.N. (2000) A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 686–691, doi: 10.1073/pnas.97.2.686.
- Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., Barbey, R., de Oliveira, R., and Boiteux, S. (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5197–5202, doi: 10.1073/pnas.93.11.5197.
- Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O., and Grollman, A.P. (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7429–7434, doi: 10.1073/pnas.94.14.7429.
- Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S., and Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of *hOGG1*, a human homolog of the *OGG1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8010–8015, doi: 10.1073/pnas.94.15.8010.
- Roldan-Arjona, T., Wei, Y.-F., Carter, K.C., Klungland, A., Anselmino, C., Wang, R.-P., Augustus, M., and Lindahl, T. (1997) Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8016–8020, doi: 10.1073/pnas.94.15.8016.
- Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.-H., Laval, J., Grollman, A.P., and Nishimura, S. (1991) 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4690–4694, doi: 10.1073/pnas.88.11.4690.
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., and Dizdaroglu, M. (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization, *Biochemistry*, **31**, 106–110, doi: 10.1021/bi00116a016.
- Nash, H.M., Lu, R., Lane, W.S., and Verdine, G.L. (1997) The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, *hOgg1*: direct identification, ablation and chemical reconstitution, *Chem. Biol.*, **4**, 693–702, doi: 10.1016/S1074-5521(97)90225-8.
- Zharkov, D.O., Rosenquist, T.A., Gerchman, S.E., and Grollman, A.P. (2000) Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase, *J. Biol. Chem.*, **275**, 28607–28617, doi: 10.1074/jbc.M002441200.
- Bruner, S.D., Norman, D.P.G., and Verdine, G.L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA, *Nature*, **403**, 859–866, doi: 10.1038/35002510.
- Norman, D.P.G., Chung, S.J., and Verdine, G.L. (2003) Structural and biochemical exploration of a critical amino acid in human 8-oxoguanine glycosylase, *Biochemistry*, **42**, 1564–1572, doi: 10.1021/bi026823d.
- Norman, D.P.G., Bruner, S.D., and Verdine, G.L. (2001) Coupling of substrate recognition and catalysis by a human base-excision DNA repair protein, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 359–360, doi: 10.1021/ja003144m.
- Bjoras, M., Seeberg, E., Luna, L., Pearl, L.H., and Barrett, T.E. (2002) Reciprocal “flipping” underlies substrate recognition and catalytic activation by the human 8-oxo-guanine DNA glycosylase, *J. Mol. Biol.*, **317**, 171–177, doi: 10.1006/jmbi.2002.5400.
- Fromme, J.C., Bruner, S.D., Yang, W., Karplus, M., and Verdine, G.L. (2003) Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 204–211, doi: 10.1038/nsb902.
- Chung, S.J., and Verdine, G.L. (2004) Structures of end products resulting from lesion processing by a DNA glyco-

- sylase/lyase, *Chem. Biol.*, **11**, 1643–1649, doi: 10.1016/j.chembiol.2004.09.014.
26. Banerjee, A., Yang, W., Karplus, M., and Verdine, G.L. (2005) Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA, *Nature*, **434**, 612–618, doi: 10.1038/nature03458.
 27. Banerjee, A., and Verdine, G.L. (2006) A nucleobase lesion remodels the interaction of its normal neighbor in a DNA glycosylase complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15020–15025, doi: 10.1073/pnas.0603644103.
 28. Radom, C.T., Banerjee, A., and Verdine, G.L. (2007) Structural characterization of human 8-oxoguanine DNA glycosylase variants bearing active site mutations, *J. Biol. Chem.*, **282**, 9182–9194, doi: 10.1074/jbc.M608989200.
 29. Lee, S., Radom, C.T., and Verdine, G.L. (2008) Trapping and structural elucidation of a very advanced intermediate in the lesion-extrusion pathway of hOGG1, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 7784–7785, doi: 10.1021/ja800821t.
 30. Crenshaw, C.M., Nam, K., Oo, K., Kutchukian, P.S., Bowman, B.R., Karplus, M., and Verdine, G.L. (2012) Enforced presentation of an extrahelical guanine to the lesion recognition pocket of human 8-oxoguanine glycosylase, hOGG1, *J. Biol. Chem.*, **287**, 24916–24928, doi: 10.1074/jbc.M111.316497.
 31. Li, H., Endutkin, A.V., Bergonzo, C., Fu, L., Grollman, A.P., Zharkov, D.O., and Simmerling, C. (2017) DNA deformation-coupled recognition of 8-oxoguanine: conformational kinetic gating in human DNA glycosylase, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 2682–2692, doi: 10.1021/jacs.6b11433.
 32. Lukina, M.V., Popov, A.V., Koval, V.V., Vorobjev, Y.N., Fedorova, O.S., and Zharkov, D.O. (2013) DNA damage processing by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase mutants with the occluded active site, *J. Biol. Chem.*, **288**, 28936–28947, doi: 10.1074/jbc.M113.487322.
 33. Kabsch, W. (1976) A solution for the best rotation to relate two sets of vectors, *Acta Crystallogr. A*, **32**, 922–923, doi: 10.1107/S0567739476001873.
 34. Попов А.В., Воробьев Ю.Н. (2010) Программа GUI-BioPASED для моделирования молекулярной динамики биополимеров с графическим пользовательским интерфейсом, *Молекулярная биология*, **44**, 735–742, doi: 10.1134/S0026893310040217.
 35. Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E., III, Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M. et al. (2012) *AMBER 12*, University of California, San Francisco.
 36. Perlow-Poehnelt, R.A., Zharkov, D.O., Grollman, A.P., and Broyde, S. (2004) Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase: distinguishing interactions within the active site, *Biochemistry*, **43**, 16092–16105, doi: 10.1021/bi048747f.
 37. Vorobjev, Y.N. (2011) Advances in implicit models of water solvent to compute conformational free energy and molecular dynamics of proteins at constant pH, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **85**, 281–322, doi: 10.1016/B978-0-12-386485-7.00008-9.
 38. Manning, G.S. (1978) The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides, *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 179–246, doi: 10.1017/s0033583500002031.
 39. Ravishanker, G., Auffinger, P., Langley, D.R., Jayaram, B., Young, M.A., and Beveridge, D.L. (1997) Treatment of counterions in computer simulations of DNA, *Rev. Comput. Chem.*, **11**, 317–372, doi: 10.1002/9780470125885.ch6.
 40. Попов, А.В., Воробьев, Ю.Н., and Zharkov, D.O. (2013) MDTRA: a molecular dynamics trajectory analyzer with a graphical user interface, *J. Comput. Chem.*, **34**, 319–325, doi: 10.1002/jcc.23135.
 41. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33–38, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
 42. Sayle, R.A., and Milner-White, E.J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all, *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 374–376, doi: 10.1016/S0968-0004(00)89080-5.
 43. Yang, W., Bitetti-Putzer, R., and Karplus, M. (2004) Free energy simulations: use of reverse cumulative averaging to determine the equilibrated region and the time required for convergence, *J. Chem. Phys.*, **120**, 2618–2628, doi: 10.1063/1.1638996.
 44. Letunic, I., and Bork, P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees, *Nucleic Acids Res.*, **44**, W242–W245, doi: 10.1093/nar/gkw290.
 45. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
 46. Sidorenko, V.S., Nevinsky, G.A., and Zharkov, D.O. (2007) Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease, *DNA Repair*, **6**, 317–328, doi: 10.1016/j.dnarep.2006.10.022.
 47. Sidorenko, V.S., Mechetin, G.V., Nevinsky, G.A., and Zharkov, D.O. (2008) Ionic strength and magnesium affect the specificity of *Escherichia coli* and human 8-oxoguanine-DNA glycosylases, *FEBS J.*, **275**, 3747–3760, doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06521.x.
 48. Anderson, P.C., and Daggett, V. (2009) The R46Q, R131Q and R154H polymorphs of human DNA glycosylase/β-lyase hOgg1 severely distort the active site and DNA recognition site but do not cause unfolding, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9506–9515, doi: 10.1021/ja809726e.
 49. Sowlati-Hashjin, S., and Wetmore, S.D. (2018) Structural insight into the discrimination between 8-oxoguanine glycosidic conformers by DNA repair enzymes: a molecular dynamics study of human oxoguanine glycosylase 1 and formamidopyrimidine-DNA glycosylase, *Biochemistry*, **57**, 1144–1154, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01292.
 50. Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T., and Seeberg, E. (1997) Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites, *EMBO J.*, **16**, 6314–6322, doi: 10.1093/emboj/16.20.6314.
 51. Kuznetsov, N.A., Koval, V.V., Zharkov, D.O., Nevinsky, G.A., Douglas, K.T., and Fedorova, O.S. (2005) Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3919–3931, doi: 10.1093/nar/gki694.
 52. Zharkov, D.O., Golan, G., Gilboa, R., Fernandes, A.S., Gerchman, S.E., Kycia, J.H., Rieger, R.A., Grollman, A.P., and Shoham, G. (2002) Structural analysis of an *Escherichia coli* endonuclease VIII covalent reaction intermediate, *EMBO J.*, **21**, 789–800, doi: 10.1093/emboj/21.4.789.
 53. Li, H., Endutkin, A.V., Bergonzo, C., Campbell, A.J., de los Santos, C., Grollman, A., Zharkov, D.O., and Simmerling, C. (2016) A dynamic checkpoint in oxidative lesion discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 683–694, doi: 10.1093/nar/gkv1092.
 54. Sowlati-Hashjin, S., and Wetmore, S.D. (2014) Computational investigation of glycosylase and β-lyase activity facilitated by proline: applications to FPG and comparisons to hOgg1, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 14566–14577, doi: 10.1021/jp507783d.
 55. Попов, А.В., Endutkin, А.В., Воробьев, Ю.Н., and Zharkov, D.O. (2017) Molecular dynamics simulation of the opposite-base preference and interactions in the active site of formamidopyrimidine-DNA glycosylase, *BMC Struct. Biol.*, **17**, 5, doi: 10.1186/s12900-017-0075-y.

CATALYTICALLY COMPETENT CONFORMATIONS OF THE ACTIVE SITE OF HUMAN 8-OXOGUANINE-DNA GLYCOSYLASE*

A. V. Popov^{1**}, A. V. Yudkina^{1,2}, Yu. N. Vorobjev¹, and D. O. Zharkov^{1,2**}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: apopov@niboch.nsc.ru, dzharkov@niboch.nsc.ru*

² *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Received April 15, 2019
Revised November 9, 2019
Accepted November 9, 2019

8-Oxoguanine-DNA *N*-glycosylase (OGG1) is a eukaryotic DNA repair enzyme responsible for the removal of 8-oxoguanine (oxoG), one of the most abundant oxidative DNA lesions. OGG1 catalyzes two consecutive reactions, i.e., *N*-glycosidic bond hydrolysis (DNA glycosylase activity) and DNA strand cleavage 3' to the lesion by β -elimination (lyase activity). The enzyme also possesses the lyase activity on substrates containing apurinic/aprimidinic (AP) sites (base-free deoxyribose moieties). OGG1 is highly specific to a base opposite the lesion, efficiently excising oxoG and cleaving AP sites located opposite C but not opposite A. The enzyme activity is also profoundly decreased by amino acid substitutions that sterically interfere with binding of oxoG, everted from the DNA helix, in the enzyme active center. Earlier, the molecular dynamics approach was used to study conformational dynamics of such human OGG1 mutants complexed with substrate DNA containing oxoG:C pair. It was suggested that the enzyme activity depends on population density of certain conformers of two OGG1 catalytic residues, Lys249 and Asp268. Here we report the results of the molecular dynamics study of human OGG1 complexed with DNA containing oxoG:A pair and OGG1 mutants complexed with DNA containing AP:C pair. We found that low enzyme activity is associated with a decrease in the populations of certain conformers of Lys249 and Asp268 with optimal configuration for catalysis. The experimentally measured rate constants for OGG1 mutants show a good agreement with the models. We conclude that the population density of catalytically competent conformations of Lys249 and Asp268 in the OGG1 active site is the major determinant of its enzymatic activity.

Keywords: DNA damage, DNA repair, 8-oxoguanine-DNA *N*-glycosylase, substrate specificity