

УДК 577.15: 541.128

РОЛЬ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ Arg243 И His239 В ПРОЦЕССЕ УЗНАВАНИЯ ПОВРЕЖДЕННОГО НУКЛЕОТИДА УРАЦИЛ-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗОЙ ЧЕЛОВЕКА SMUG1*

© 2020 Д.А. Яковлев^{1,2}, И.В. Алексеева¹, Н.А. Кузнецов^{1**}, О.С. Федорова^{1**}

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

² Новосибирский государственный университет, факультет естественных наук, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 03.02.2020

После доработки 17.03.2020

Принята к публикации 19.03.2020

Урацил-ДНК-гликозилаза человека SMUG1 удаляет из ДНК остатки урацила и некоторые другие неканонические или поврежденные основания. Несмотря на функциональную важность SMUG1, для нее до сих пор не получены рентгеноструктурные данные. Ранее нами проведено гомологичное моделирование структуры SMUG1 и сделан вывод о роли некоторых аминокислотных остатков в процессе узнавания поврежденных нуклеотидов и их удаления из ДНК. В настоящей работе методом «остановленного потока» в режиме реального времени по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp фермента и 2-аминопурина и флуорофоров, обеспечивающих резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), в ДНК изучена кинетика конформационных переходов в белке и ДНК-субстратах в ходе ферментативного процесса. Установлен кинетический механизм взаимодействия и рассчитаны кинетические параметры образования и распада интермедиатов реакции. Полученные результаты позволили уточнить роль а.о. His239 и Arg243 в процессе узнавания поврежденного нуклеотида и удаления повреждения при катализе урацил-ДНК-гликозилазой человека SMUG1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: репарация ДНК, урацил-ДНК-гликозилаза человека SMUG1, флуоресценция, конформационная динамика, метод «остановленного потока».

DOI: 10.31857/S0320972520050085

ВВЕДЕНИЕ

Урацил – одно из наиболее распространенных повреждений ДНК, которое образуется при спонтанном [1–3] или ферментативном [4, 5] дезаминировании цитозина, а также при ошибочном включении остатка уридина во время репликации [6]. Урацил в ДНК человека узнается и удаляется несколькими ДНК-гликозилазами: урацил-ДНК-*N*-гликозилазой (UNG2), тимин-ДНК-гликозилазой (TDG), специфичной к одноцепочечной ДНК монофункциональной

ДНК-гликозилазой (SMUG1) и метил-СрG-связывающим доменом 4 (MBD4) [7, 8]. Несмотря на то, что все урацил-ДНК-гликозилазы катализируют гидролиз *N*-гликозидной связи с урацилом, они обладают индивидуальными отличиями, связанными со способностью ферментов узнавать одноцепочечные ДНК-субстраты, мисматчи T/G [9–13] или некоторые окисленные основания, такие как 5-гидроксиметилурацил, 5-формилурацил и 5-гидроксиурацил, которые являются природными производными 5-метилцитозина и образуются в процессе эпигенетической регуляции [14].

Одной из актуальных проблем в области репарации ДНК остается выяснение механизмов, обеспечивающих высокоточное узнавание поврежденных оснований. В последние годы активно проводили исследования различных ДНК-гликозилаз, направленные на выяснение того, каким образом происходит поиск и узнавание единичных повреждений гетероциклических оснований ДНК среди огромного числа немодифицированных оснований [15]. Анализ литературных данных показывает [16], что раз-

Принятые сокращения: SMUG1 – специфичная к одноцепочечной ДНК монофункциональная ДНК-гликозилаза; AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; F – (2*R*,3*S*)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофуран; aPu – 2-аминопурин, FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; BHQ1 – тушитель флуоресценции «black hole quencher»; FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции; PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле, WT – диккий тип.

* Статья на английском языке опубликована в режиме открытого доступа на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 5, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

личные ДНК-гликозилазы, имеющие совершенно разную структуру ДНК-связывающего центра, активного центра и аминокислотных остатков, участвующих в специфическом узнавании поврежденного нуклеотида и катализе, тем не менее обладают общими особенностями при взаимодействии с субстратами. Так, большая часть ДНК-гликозилаз, для которых в настоящее время установлена структура, изгибают ДНК и выворачивают поврежденный либо комплементарный к нему нуклеотид из двойной спирали ДНК. При этом, как правило, поврежденный нуклеотид располагается в кармане активного центра фермента, где происходит его окончательная верификация. В образовавшуюся полость в дуплексе ДНК встраиваются некоторые аминокислотные остатки фермента, которые выталкивают поврежденный нуклеотид из спирали ДНК и стабилизируют внеспиральное положение нуклеотида. Далее происходит гидролиз *N*-гликозидной связи между поврежденным гетероциклическим основанием и остатком рибозы и образование апуринового/апиридинового сайта (AP-сайта).

В настоящее время наиболее обоснованным механизмом узнавания поврежденных нуклеотидов ДНК-гликозилазами на начальных этапах взаимодействия является модель, в соответствии с которой фермент поочередно вставляет

в двойную спираль ДНК между основаниями аминокислотный остаток – сенсор повреждения или «клин» (wedge amino acid) [17]. Эта модель узнавания повреждений была значительно развита в исследованиях с применением одномолекулярных кинетических методов (single-molecule kinetics) [18–21] и предстационарных кинетических методов [22], которые позволили в реальном времени визуализировать движение фермента по молекуле ДНК при поиске поврежденного нуклеотида и изучить динамику конформационных перестроек фермента и ДНК как на начальных, так и на последующих стадиях узнавания повреждения и их каталитического превращения.

В настоящее время структура ДНК-гликозилазы человека SMUG1 неизвестна. Ранее нами с помощью гомологичного моделирования [23] на основе структур с GmeSMUG1 из *Geobacter metallireducens* (Protein Data Bank [PDB] ID 5H98 и 5H9I) [24] и xSMUG1 из *Xenopus laevis* (PDB 1OE4 и 1OE5) [10] получена модель структуры фермента человека в свободном состоянии и в комплексе с ДНК, содержащей уридин (рис. 1). Было показано, что 11 а.о. (239–249) SMUG1 человека формируют интеркалирующую петлю, которая может служить «клином», проникающим в двойную спираль ДНК в области поврежденного нуклеотида [10, 25]. При этом функционально важными а.о. интеркалирующей петли могут являться Arg243, который занимает пространство внутри спирали ДНК, образовавшееся после выворачивания урацила, и His239, способный образовывать контакты и с урацилом, расположенным в активном центре, и с фосфатной группой ДНК. Мутационный анализ показал [23, 25], что His239 необходим для протекания каталитического гидролиза *N*-гликозидной связи.

Кроме того, ранее [26] методом «остановленного потока» с регистрацией изменения интенсивности флуоресценции остатков триптофана, входящих в состав фермента, и 2-аминопурина (aPu) или FRET-пары флуорофор/тушитель (6-карбоксифлуоресцеин (FAM) и тушитель флуоресценции «black hole quencher» (BHQ1)), обеспечивающих резонансный перенос энергии флуоресценции, расположенных в модельных ДНК-субстратах, был предложен кинетический механизм взаимодействия SMUG1 дикого типа (WT) с поврежденной ДНК (схема 1). Показано, что взаимодействие SMUG1 с ДНК включает, как минимум, две стадии (1 и 2) связывания ДНК и узнавания поврежденного нуклеотида, которые приводят к образованию каталитически компетентного комплекса. В этом комплексе происходит необратимая ста-

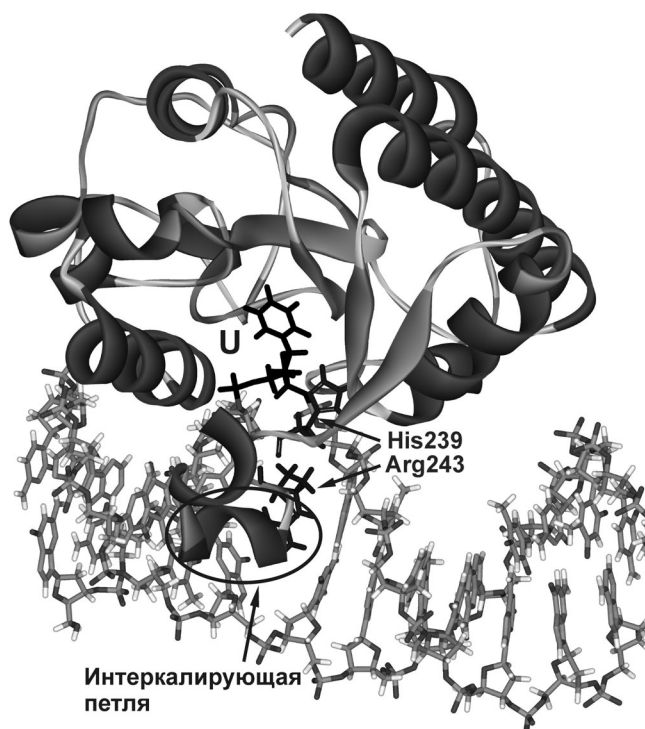


Рис. 1. Модель структуры SMUG1 человека в комплексе с ДНК, содержащей уридин

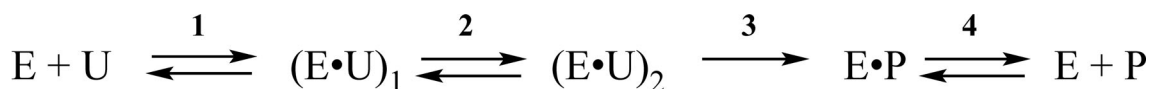


Схема 1. Кинетический механизм, характеризующий стадии взаимодействия SMUG1 WT человека с поврежденной ДНК [26]. E – SMUG1; U – ДНК-субстрат, содержащий уридин; (E · U)_n – различные фермент-субстратные комплексы, образующиеся в ходе узнавания урацила; E · P – комплекс фермента с продуктом реакции P

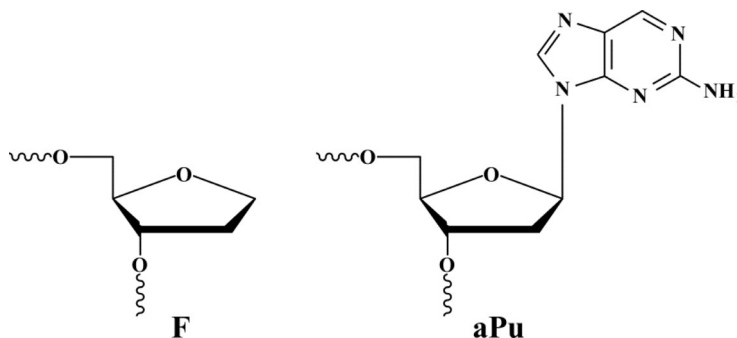
дия (3) каталитического гидролиза *N*-гликозидной связи с урацилом. Последняя стадия кинетического механизма (4) характеризует равновесный процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции.

Анализ флуоресцентных данных, характеризующих конформационные переходы как молекулы SMUG1, так и ДНК в ходе каталитического цикла свидетельствует о том, что на первой стадии взаимодействия (1) происходит перемещение интеркалирующей петли фермента, которое сопровождается частичным плавлением ДНК-дуплекса вблизи поврежденного нуклеотида. По-видимому, образование контактов на этой стадии взаимодействия также индуцирует частичное выворачивание поврежденного основания из ДНК-дуплекса. Вторая стадия (2) характеризует процесс встраивания аминокислотных остатков, входящих в интеркалирующую петлю фермента. Ранее при исследовании конформационной динамики ДНК-субстрата методом FRET и кинетики накопления продукта

N-гликозилазной реакции методом электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE) нами было показано, что мутантная форма SMUG1, содержащая замену H239A, каталитически неактивна, тогда как мутант R243A полностью сохраняет свою активность [23]. Для уточнения функции остатков Arg243 и His239 в процессе специфического узнавания поврежденного нуклеотида и катализе в настоящем исследовании был проведен комплексный предстационарный кинетический анализ конформационных изменений в мутантных формах SMUG1 (R243A и H239A) и в ДНК-субстрате, а также в продукте его превращения. Для этого проводили регистрацию изменений интенсивности флуоресценции остатков Trp в молекуле фермента и aPu, расположенного с 3'-стороны от апуринового/апиримидинового сайта в ДНК, или FRET-пары, введенной на 3'- и 5'-концы ДНК-дуплекса. Эти данные позволили более детально проследить конформационные переходы белка и ДНК в процессе взаимодействия. Итогом

Таблица 1. Последовательности дезоксирибоолигонуклеотидов и структуры модифицированных нуклеотидов F и aPu

Сокращенное название	Последовательность
X-субстрат/лиганд	5'-GCTCA(X)GTACAGAGCTG-3'
X = U/F	3'-CGAGT G CATGTCTCGAC-5'
X-aPu-субстрат/лиганд	5'-GCTCA(X)(aPu)TACAGAGCTG-3'
X = U/F	3'-CGAGT G C ATGTCTCGAC-5'
FRET-X-субстрат/лиганд	5'-FAM-GCTCA(X)GTACAGAGCTG-3'
X = U/F	3'-CGAGT G CATGTCTCGAC-BHQ1-5'



* F – стабильный аналог AP-сайта, (2*R*,3*S*)-2-(гидрокси-метил)-3-гидрокси-тетрагидрофуран; aPu – 2-аминопурин.

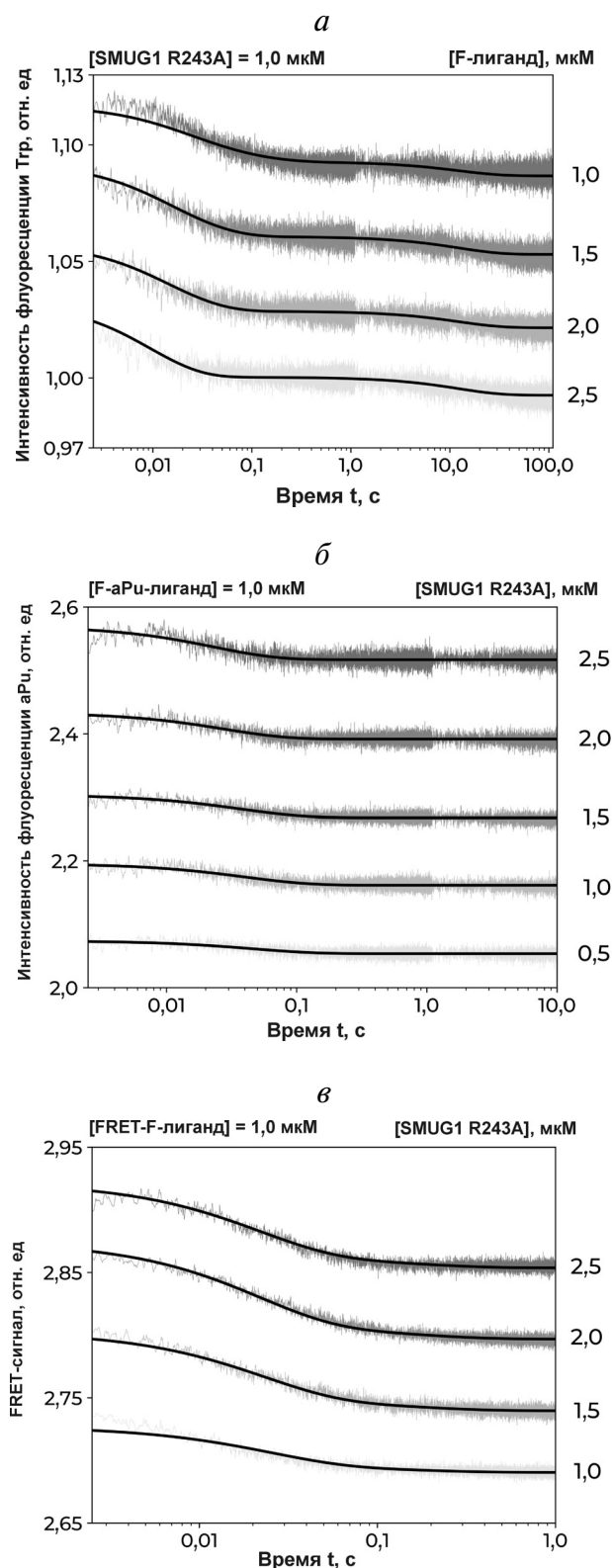


Рис. 2. Взаимодействие R243A SMUG1 с ДНК-дуплексами, содержащими F-сайт. Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp белка (а), интенсивности флуоресценции остатков aPu, расположенных с 3'-стороны от F-сайта (б) и FRET-сигнала (в). Концентрации фермента и ДНК указаны на рисунке

представленной работы является уточнение роли функционально значимых остатков His239 и Arg243 в процессе узнавания поврежденного основания и его удаления при катализе ДНК-гликозилазой человека SMUG1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы реактивы: акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, ДТТ, мочевины, ЭДТА, ацетонитрил, глицерин, Tris-(гидрокси-метил)-аминометан («Sigma-Aldrich», США).

ДНК-субстраты. Субстраты и лиганды фермента представляли собой 17-ти звенные дуплексы, состоящие из дезоксирибоолигонуклеотидов, представленных в табл. 1. Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионно-обменной колонке PRP-X500 (3,9 × 300 мм; размер частиц 12–30 мкм; «Hamilton Company», США) и последующей обращено-фазовой хроматографии (Nucleoprep 100–20 C₁₈ 10 × 250 мм, «Macherey-Nagel», Германия). Гомогенность препаратов проверяли методом электрофореза в 20%-ном (w/v) PAGE в денатурирующих условиях.

Фермент SMUG1. Мутантные формы фермента SMUG1, содержащие замену R243A или H239A, были выделены из клеток *Escherichia coli* штамма Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET28с, несущей ген урацил-ДНК-гликозилазы человека, как описано ранее [23, 26]. Все эксперименты по исследованию ферментативной реакции проводили в буферном растворе: 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 7% (v/v) глицерин при 25 °С.

Изучение кинетики процесса методом «остановленного потока». Флуоресцентные кинетические кривые были получены на спектромет-

Таблица 2. Константы скорости и равновесия, соответствующие Схеме 2, описывающей взаимодействие SMUG1 R243A с ДНК, содержащей F-сайт

Константа	Флуорофор		
	Trp	aPu	FRET
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}\cdot\text{c}^{-1}$	35 ± 8	14 ± 4	6 ± 2
k_{-1}, c^{-1}	0,5 ± 0,3	5,4 ± 1,0	30 ± 7
k_2, c^{-1}	(1,1 ± 0,8) × 10 ⁻²	–	0,4 ± 0,1
k_{-2}, c^{-1}	(7 ± 2) × 10 ⁻²	–	6 ± 2

* Различия статистически достоверны при $p < 0,05$.



Схема 2. Кинетический механизм, характеризующий образование комплекса SMUG1 R243A с продуктом реакции F, зарегистрированный по изменению интенсивности флуоресценции Trp и FRET-сигнала

ре остановленной струи SX.20 («Applied Photophysics», Великобритания), как описано ранее [27–30]. Белок SMUG1 содержит 4 остатка Trp и 4 остатка Tyr. Возбуждение флуоресценции SMUG1 проводили при 290 нм, регистрацию флуоресценции – при длинах волн > 320 нм, фильтр WG-320 («Schott», Германия). В этих условиях основной вклад в флуоресценцию белка обеспечивается остатками Trp (>90%). При использовании субстратов, содержащих остатки aPu, возбуждение флуоресценции проводили при длине волны 310 нм, а регистрацию – при длинах волн > 370 нм, фильтр LG-370 («Cognition», США). Для анализа эффективности флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET) пары FAM/BHQ1 флуоресценцию красителя FAM возбуждали светом с длиной волны 494 нм. Регистрация флуоресценции красителя FAM проводилась при длинах волн > 515 нм с использованием светофильтра OG-515 («Schott», Германия). Мертвое время прибора составляло 1,0 мс. Каждую кинетическую кривую строили, как минимум, по результатам трех независимых измерений.

Анализ кинетических данных. Для определения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстратами, и расчета констант скорости конформационных переходов в ходе всех элементарных стадий данной схемы получали набор кинетических кривых для разных концентраций фермента или субстрата. Количественную обработку результатов экспериментов проводили с помощью программы DynaFit («BioKin», США) [31] путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы, как описано ранее [32–34].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Взаимодействие SMUG1 R243A со стабильным аналогом продукта N-гликозилазной реакции. Для изучения конформационных изменений SMUG1 R243A в процессе взаимодействия с продуктом гидролиза N-гликозидной связи был использован модельный ДНК-дуплекс, содержащий тетрагидрофурановый аналог AP-сайта (F-лиганд, табл. 1). Взаимодействие фермента с

аналогом продукта приводит к двухфазному уменьшению интенсивности флуоресценции остатков Trp в течение времени $t \leq 100$ с (рис. 2, а). Падение сигнала на начальном участке кинетических кривых, в течение 30–50 мс, по-видимому, соответствует образованию первичных неспецифических контактов с ДНК. Затем происходит небольшое снижение интенсивности флуоресценции во временном интервале $t \leq 10$ с. Конформационные изменения фермента при взаимодействии SMUG1 R243A с F-лигандом были описаны с помощью кинетической схемы 2, содержащей две обратимые стадии. Полученные константы скорости приведены в табл. 2.

Природа процессов, происходящих на этих стадиях взаимодействия, была выяснена с помощью анализа изменений флуоресценции остатка aPu, расположенного с 3'-стороны от F-сайта (F-aPu-лиганд, табл. 1). Этот флуорофор чувствителен к изменениям диэлектрической проницаемости среды, и интенсивность его флуоресценции уменьшается при формировании гидрофобного микроокружения [35]. Смешивание фермента с F-aPu-лигандом также вызывает падение интенсивности флуоресценции остатка aPu на временах < 200 мс (рис. 2, б), что свидетельствует об образовании вокруг aPu гидрофобного окружения, например, за счет взаимодействия ДНК с а.о. интеркалирующей петли. Полученные кинетические кривые описывали схемой 3, константы скорости приведены в табл. 2.

При этом кинетические кривые, полученные при регистрации сигнала FRET в процессе взаимодействия SMUG1 R243A с FRET-F-лигандом, характеризуются уменьшением сигнала в начальной области до $t \approx 100$ –200 мс (рис. 2, в). Падение сигнала FRET свидетельствует об

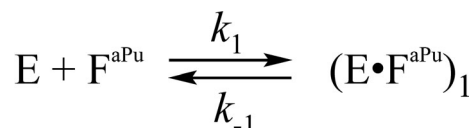


Схема 3. Кинетический механизм, описывающий образование комплекса SMUG1 R243A с продуктом N-гликозилазной реакции, зарегистрированный по изменению интенсивности флуоресценции aPu

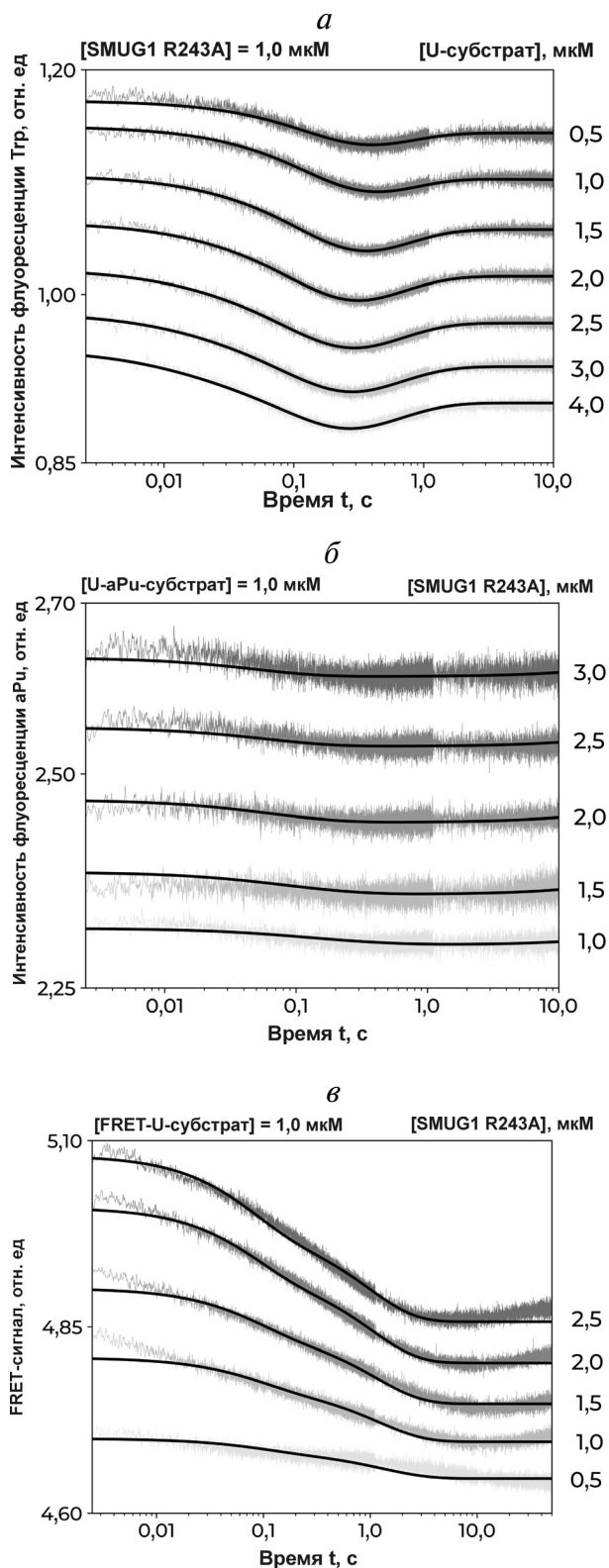


Рис. 3. Взаимодействие R243A SMUG1 с ДНК-дуплексами, содержащими уридин. Изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp белка (а), интенсивности флуоресценции остатков aPu, расположенных с 3'-стороны от уридина (б) и FRET-сигнала (в). Концентрации фермента и ДНК указаны на рисунке

уменьшении расстояния между флуорофорами, которое может происходить при изгибании молекулы ДНК при связывании с ферментом. Анализ кинетических кривых показал, что этот процесс можно описать двухстадийным равновесным механизмом (схема 2), константы скорости приведены в табл. 2.

Таким образом, процесс взаимодействия SMUG1 R243A с аналогом продукта реакции F включает как минимум две обратимые стадии. Анализ формы кинетических кривых (рис. 2) и значений констант скорости (табл. 2) показывает, что образование первичного комплекса сопровождается конформационными изменениями фермента (стадия 1, Trp, $t \leq 30\text{--}50$ мс), затем происходит изменение микроокружения в области остатка aPu (стадия 1, aPu, $t < 100$ мс). Такое последовательное изменение конформации фермента и ДНК субстрата свидетельствует о том, что этот процесс, вероятнее всего, связан с перемещением интеркалирующей петли и ее взаимодействием с ДНК-дуплексом в области поврежденного нуклеотида и, возможно, сопровождается выворачиванием F-сайта в активный центр фермента. Образование контактов между ДНК-связывающим центром и ДНК-дуплексом также индуцирует изгибание молекулы субстрата на временах $t < 100\text{--}200$ мс (стадия 1, FRET). Последующие более медленные процессы (стадия 2, FRET и Trp), зарегистрированные по изменению интенсивности флуоресценции Trp и FRET-сигнала, по-видимому, свидетельствует о дополнительных перестройках конформации фермента и аналога продукта, содержащего остаток F.

Из полученных значений следует, что каждый из флуорофоров регистрирует разные этапы конформационных перестроек, протекающих во взаимодействующих молекулах. Наиболее медленной стадией является стадия 2, наблюдаемая по флуоресценции Trp, которая, скорее всего, относится к адаптации структуры hSMUG1 к структуре F-содержащего ДНК-лиганда, моделирующего продукт N-гликозилазной реакции.

Взаимодействие SMUG1 R243A с ДНК, содержащей уридин. Полный ферментативный цикл был изучен с использованием модельных ДНК-субстратов, содержащих уридин (табл. 1). В ходе ферментативной реакции происходит связывание фермента с субстратом, формирование каталитически компетентного комплекса, гидролиз N-гликозидной связи и диссоциация фермента с продуктом.

Кинетические кривые, характеризующие изменение интенсивности флуоресценции Trp (рис. 3, а), содержат фазу падения интенсивности флуоресценции при $t \approx 0,3$ с и фазу роста с

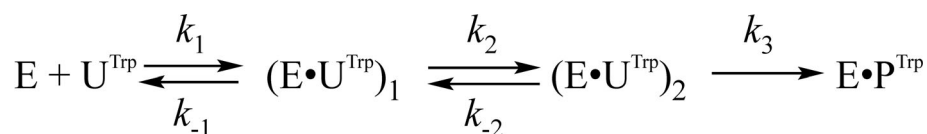


Схема 4. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействие SMUG1 R243A с U-субстратом

выходом на плато к $t \approx 5$ с. Сравнение этих кинетических кривых с кривыми, полученными для процесса связывания с продуктом (рис. 2, а), показывает, что начальный участок при образовании каталитического комплекса с U-субстратом имеет похожие изменения в интенсивности флуоресценции Trp. Поэтому фазу роста интенсивности флуоресценции Trp на временах $\sim(0,5-10)$ с, отсутствующую в случае F-лиганда, можно отнести к процессу гидролиза N-гликозидной связи и диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Ранее для фермента SMUG1 WT было показано [26], что диссоциация комплекса фермент–продукт является скоростью-лимитирующей стадией ферментативного процесса. Поэтому в наблюдаемом временном диапазоне (0,5–10 с) скорее всего не происходит процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Действительно, анализ кинетических кривых показал, что они описываются кинетической схемой 4, включающей две обратимые стадии связывания, за которыми следует необратимая каталитическая стадия, приводящая к образованию комплекса фермента с продуктом (табл. 3).

Кинетика конформационных изменений в ДНК, полученная при регистрации интенсивности флуоресценции aPu в U-aPu-субстрате (рис. 3, б), на начальном участке до 100 мс аналогична кинетике взаимодействия SMUG1 с аналогом продукта (рис 2, б). Такая согласованность конформационных изменений свидетельствует о том, что процесс гидролиза N-гликозидной связи не требует серьезного изменения геометрии субстрата. При этом в случае U-aPu-субстрата происходит незначительное увеличение интенсивности флуоресценции на более поздних временах ≤ 10 с, которое может характеризовать медленный процесс диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции. Полученные кинетические кривые описывали схемой 5, что позволило оценить значение константы скорости распада комплекса фермента с продуктом реакции k_{off} (табл. 3).

При регистрации FRET-сигнала в процессе взаимодействия SMUG1 R243A с FRET-U-субстратом (рис. 3, в) были получены кинетические кривые, содержащие снижение флуоресценции FAM на временах >10 с. При этом падение сигнала FRET можно разделить на две фа-

Таблица 3. Константы скорости и равновесия, соответствующие взаимодействию SMUG1 R243A с ДНК, содержащей уридин

Константа	SMUG1 R243A			SMUG1 WT*		
	Trp	aPu	FRET	Trp	aPu	FRET
$k_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$	22 ± 5	8 ± 3	1,2 ± 0,2	115 ± 20	130 ± 60	140 ± 20
k_{-1}, c^{-1}	2,2 ± 0,6	0,19 ± 0,07	8 ± 1	760 ± 90	240 ± 30	410 ± 20
$K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	10	41,6	0,16	0,15	0,54	0,34
k_2, c^{-1}	9 ± 3	–	1,7 ± 0,3	30 ± 8	15 ± 8	3,6 ± 0,8
k_{-2}, c^{-1}	0,8 ± 0,1	–	0,64 ± 0,06	11,5 ± 0,8	25 ± 6	9,7 ± 0,2
K_2	11,1	–	2,66	2,6	0,6	0,37
k_3, c^{-1}	2,0 ± 0,3	–	–	1,7 ± 0,2	–	0,6 ± 0,1
k_{-3}, c^{-1}	–	–	–	–	–	0,11 ± 0,02
K_3	–	–	–	–	–	5,4
$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	–	$(8 \pm 3) \times 10^{-3}$	–	–	–	–
$K_1 \times K_2 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	111	–	0,43	0,39	0,32	–
$K_1 \times K_2 \times K_3 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	–	–	–	–	–	0,68

* Данные из работы Kuznetsova et al. [26].

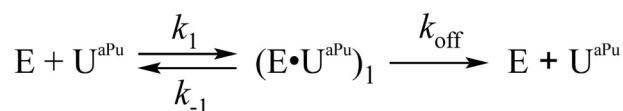


Схема 5. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействие SMUG1 R243A с U-aPu-субстратом

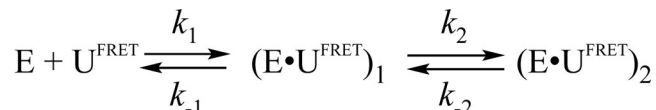


Схема 6. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействие SMUG1 R243A с FRET-U-субстратом

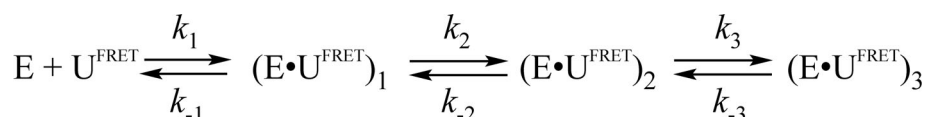


Схема 7. Кинетический механизм, характеризующий взаимодействие SMUG1 H239A с FRET-U-субстратом

зы: быстрое снижение до $t \approx 100$ мс, как и в случае FRET-F-лиганда, и последующую медленную фазу до $t \approx 3$ с. Можно предположить, что кривые FRET не отражают каталитический процесс, так как кривые изменения интенсивности флуоресценции aPu показывают, что гидролиз *N*-гликозидной связи не требует дополнительных конформационных изменений ДНК. Полученные кинетические кривые описывали схемой 6, содержащей две равновесные стадии связывания ДНК (табл. 3).

Следует отметить, что начальные участки кинетических кривых схожи в случае F-лигандов и U-субстратов независимо от использованного флуорофора (рис. 2 и 3). Этот факт указывает на то, что процесс образования фермент-

субстратного комплекса включает идентичные стадии и не зависит от природы поврежденного нуклеотида.

Взаимодействие SMUG1 H239A с ДНК, содержащей уридин. Как было показано ранее [23], активность мутантной формы SMUG1 H239A по отношению к U-содержащей ДНК значительно ниже, чем активность фермента дикого типа или мутантной формы R243A. Тем не менее процесс образования фермент-субстратного комплекса был зарегистрирован по изменению сигнала FRET в ходе взаимодействия SMUG1 H239A с FRET-U-субстратом в течение 100 с (рис. 4). Поскольку анализ активности методом электрофореза в PAGE свидетельствует о накоплении лишь незначительного количества продукта за

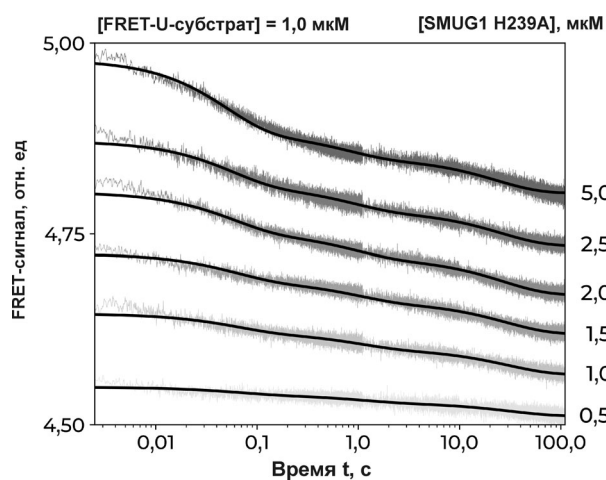


Рис. 4. Взаимодействие SMUG1 H239A с FRET-U-субстратом. Концентрации фермента и ДНК указаны на рисунке

Таблица 4. Константы скорости и равновесия, соответствующие взаимодействию SMUG1 H239A с ДНК, содержащей уридин

Константа	FRET
$k_1 \times 10^{-6}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	$1,2 \pm 0,5$
k_{-1}, c^{-1}	12 ± 5
$K_1 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,1
k_2, c^{-1}	2 ± 1
k_{-2}, c^{-1}	$0,8 \pm 0,7$
K_2	2,5
k_3, c^{-1}	$0,04 \pm 0,01$
k_{-3}, c^{-1}	$0,023 \pm 0,007$
K_3	1,74
$K_1 \times K_2 \times K_3 \times 10^{-6}, M^{-1}$	0,43

этот период, то можно сделать вывод о том, что процессы, наблюдаемые методом «остановленного потока», соответствуют связыванию ДНК. Как видно из рис. 4, кинетические кривые характеризуются трехфазным уменьшением FRET-сигнала, которое было описано схемой 7, содержащей три обратимые стадии (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из анализа модельных структур фермента SMUG1 WT и его комплекса с ДНК [23, 26] следует, что аминокислотные остатки His239 и Arg243 должны изменять свои конформации для встраивания в ДНК и образования контактов с вывернутым поврежденным основанием (рис. 1). Однако при этом мутация H239A не должна приводить к значительным нарушениям сети контактов белок-ДНК, как и замена R243A, несмотря на потерю возможности образования нескольких водородных связей с ДНК. При этом мутантная форма SMUG1 R243A сохраняла каталитическую активность, а мутант H239A почти полностью терял активность [23].

В настоящей работе функции аминокислотных остатков His239 и Arg243 были проанализированы путем регистрации конформационных изменений в ферменте и модельных ДНК-субстратов в процессе их взаимодействия. Для выявления конформационных изменений SMUG1 R243A и H239A во время связывания ДНК использовали модельные ДНК-дуплексы, содержащие уридин или F-сайт.

В случае SMUG1 R243A взаимодействие каталитически активной формы фермента с ДНК-субстратом, содержащим уридин, или с ДНК-

продуктом, содержащим F-сайт, было зарегистрировано по изменению интенсивности флуоресценции Trp белка, остатка 2-аминопурина или FRET-пары FAM/BHQ1 (рис. 2 и 3). В то же время сравнительный анализ конформационной динамики мутантной формы SMUG1 H239A с пониженной каталитической активностью показал, что во время взаимодействия с ДНК-продуктом не происходит изменения какого-либо флуоресцентного сигнала (Trp, aPu или FRET). При этом образование фермент-субстратного комплекса с ДНК, содержащей уридин, удалось зарегистрировать только при детектировании сигнала FRET (рис. 4).

В совокупности, экспериментальные данные, характеризующие конформационные переходы мутантных форм SMUG1 R243A, H239A и ДНК в ходе каталитического цикла, и данные, полученные для фермента дикого типа [26], позволили предложить схему поэтапного изменения конформаций белка и ДНК в ходе специфического связывания ДНК и катализа (табл. 5). Общий кинетический механизм включает две обратимые стадии, характеризующие образование каталитически-компетентного комплекса, которые были зарегистрированы с использованием всех трех типов флуорофоров, что свидетельствует о взаимных конформационных изменениях как в ферменте, так и в ДНК-субстрате. При этом первичное связывание, по-видимому, включает перемещение интеркалирующей петли фермента, локальное плавление ДНК вблизи поврежденного нуклеотида и выворачивание повреждения из ДНК-дуплекса. Кроме того, движение интеркалирующей петли, вероятно, связано с встраиванием в ДНК-дуплекс аминокислотного остатка — «сensors

Таблица 5. Общий механизм ферментативного процесса, катализируемого SMUG1, сформулированный на основании данных, полученных в настоящей работе путем регистрации флуоресценции Trp, aPu и FRET, а также с помощью метода PAGE в работе Kuznetsova et al. [26]

Тип регистрации	Стадии взаимодействия SMUG1 WT с поврежденной ДНК (схема 1)			
	стадия 1	стадия 2	стадия 3	стадия 4
Trp	конформационные изменения в области интеркалирующей петли	заполнение полости аминокислотными остатками	каталитическая реакция	нд*
aPu	локальное плавление дуплекса и выворачивание уридина	заполнение полости аминокислотными остатками	нд	нд
FRET	образование первичного комплекса	изгибание ДНК	нд	перестройка комплекса
PAGE	нд	нд	каталитическая реакция	диссоциация комплекса фермент-продукт

* нд — Стадия в кинетической схеме не может быть зарегистрирована с помощью данного типа регистрации.

повреждения», который отвечает за начальные стадии узнавания поврежденного нуклеотида. Этим остатком, по-видимому, является Arg243, что не противоречит выводам, сделанным в работе Iakovlev et al. [23]. На второй стадии формируется каталитически активный комплекс, в котором а.о. интеркалирующей петли полостью встраиваются в ДНК и образуют все возможные контакты с вывернутым нуклеотидом, включая контакты His239 с фосфатными группами. Каталитическая реакция протекает на третьей стадии взаимодействия. Ранее было показано, что для фермента дикого типа скорость-лимитирующей стадией ферментативного процесса выступает диссоциация комплекса фермента с продуктом [26]. Так как замена R243A уменьшает количество водородных связей с ДНК, то это дестабилизирует как фермент-субстратный комплекс, так и комплекс фермента с продуктом реакции, за счет чего увеличивается скорость оборота фермента. Сравнение значений констант скорости отдельных стадий, полученных ранее [26] по флуоресценции Trp в случае SMUG1 WT с данными для мутанта R243A (табл. 3) показывает, что их каталитическая активность примерно одинакова: $k_3 = 1,7 \text{ с}^{-1}$ и $2,0 \text{ с}^{-1}$ для WT и R243A соответственно. Однако скорости 1-й и 2-й стадий, ха-

рактеризующих связывание и узнавание субстрата, в случае SMUG1 WT существенно больше, чем в случае мутантной формы R243A. Аналогичный вывод можно сделать и по данным, полученным для флуоресцентных меток aPu и FRET, как в случае мутанта R243A, так и H239A. При этом сродство фермента к ДНК-субстрату не меняется. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что а.о. Arg243 принимает участие в узнавании поврежденного нуклеотида, но не важен для протекания каталитической стадии, тогда как His239 необходим как для узнавания поврежденного нуклеотида, так и для катализа.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-10038) и частичной поддержке бюджетного финансирования для обеспечения регламентных работ на использованном оборудовании № АААА-А17-117020210022-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lari, S.-U., Chen, C.-Y., Vertéssy, B. G., Morré, J., and Bennett, S. E. (2006) Quantitative determination of uracil residues in *Escherichia coli* DNA: contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance, *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1407-1420.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, **362**, 709-715.
- Lewis, C. A., Crayle, J., Zhou, S., Swanstrom, R., Wolfenden, R., and Wolfenden, R. (2016) Cytosine deamination and the precipitous decline of spontaneous mutation during Earth's history, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 8194-8199.
- Jaszczur, M., Bertram, J. G., Pham, P., Scharff, M. D., and Goodman, M. F. (2013) AID and APOBEC3G haphazard deamination and mutational diversity, *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 3089-108.
- Rebhandl, S., Hümer, M., Greil, R., and Geisberger, R. (2015) AID/APOBEC deaminases and cancer, *Oncoscience*, **2**, 320.
- Ladner, R. D. (2001) The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2**, 361-370.
- Jacobs, A. L., and Schar, P. (2012) DNA glycosylases: in DNA repair and beyond, *Chromosoma*, **121**, 1-20.
- Visnes, T., Doseth, B., Pettersen, H. S., Hagen, L., Sousa, M. M., Akbari, M., Otterlei, M., Kavli, B., Slupphaug, G., and Krokan, H. E. (2009) Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **364**, 563-568.
- Kavli, B., Sundheim, O., Akbari, M., Otterlei, M., Nilsen, H., Skorpen, F., Aas, P. A., Hagen, L., Krokan, H. E., and Slupphaug, G. (2002) hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U : A matches, U : G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup, *J. Biol. Chem.*, **277**, 39926-39936.
- Wibley, J. E. A., Waters, T. R., Haushalter, K., Verdine, G. L., and Pearl, L. H. (2003) Structure and specificity of the vertebrate anti-mutator uracil-DNA glycosylase SMUG1, *Mol. Cell*, **11**, 1647-1659.
- Hashimoto, H., Hong, S., Bhagwat, A. S., Zhang, X., and Cheng, X. (2012) Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10203-10214.
- Hashimoto, H., Zhang, X., and Cheng, X. (2012) Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8276-8284.
- Sjolund, A. B., Senejani, A. G., and Sweasy, J. B. (2013) MBD4 and TDG: multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles, *Mutat. Res.*, **743-744**, 12-25.
- Ito, S., and Kuraoka, I. (2015) Epigenetic modifications in DNA could mimic oxidative DNA damage: a double-edged sword, *DNA Repair (Amst)*, **32**, 52-57.
- Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2020) Kinetic milestones of damage recognition by DNA glycosylases of the Helix-hairpin-Helix structural superfamily, *Adv. Exp. Biol. Med.*, (in press).
- Brooks, S. C., Adhikary, S., Rubinson, E. H., and Eichman, B. F. (2013) Recent advances in the structural mechanisms of DNA glycosylases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 247-271.
- Dunn, A. R., Kad, N. M., Nelson, S. R., Warshaw, D. M., and Wallace, S. S. (2011) Single Qdot-labeled glycosylase

- molecules use a wedge amino acid to probe for lesions while scanning along DNA, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 7487-7498.
18. Lee, A. J., Warshaw, D. M., and Wallace, S. S. (2014) Insights into the glycosylase search for damage from single-molecule fluorescence microscopy, *DNA Repair*, **20**, 23-31.
 19. Nelson, S. R., Dunn, A. R., Kathe, S. D., Warshaw, D. M., and Wallace, S. S. (2014) Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **111**, E2091-E2099.
 20. Lee, A. J., and Wallace, S. S. (2016) Visualizing the search for radiation-damaged DNA bases in real time, *Radiat. Phys. Chem. Oxf. Engl.* **128**, 126-133.
 21. Lee, A. J., and Wallace, S. S. (2017) Hide and seek: how do DNA glycosylases locate oxidatively damaged DNA bases amidst a sea of undamaged bases? *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 170-178.
 22. Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2016) Thermodynamic analysis of fast stages of specific lesion recognition by DNA repair enzymes, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1136-1152.
 23. Iakovlev, D. A., Alekseeva, I. V., Vorobjev, Y. N., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2019) The role of active-site residues Phe98, His239, and Arg243 in DNA binding and in the catalysis of human uracil-DNA glycosylase SMUG1, *Molecules*, **24**, doi: 10.3390/molecules24173133.
 24. Zhang, Z., Shen, J., Yang, Y., Li, J., Cao, W., and Xie, W. (2016) Structural basis of substrate specificity in geobacter metallireducens SMUG1, *ACS Chem. Biol.*, **11**, 1729-1736.
 25. Matsubara, M., Tanaka, T., Terato, H., Ohmae, E., Izumi, S., Katayanagi, K., and Ide, H. (2004) Mutational analysis of the damage-recognition and catalytic mechanism of human SMUG1 DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5291-5302.
 26. Kuznetsova, A. A., Iakovlev, D. A., Misovets, I. V., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. K., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2017) Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1, *Mol. Biosyst.*, **13**, 2638-2649.
 27. Kuznetsov, N. A., Faleev, N. G., Kuznetsova, A. A., Morozova, E. A., Revtovich, S. V., Anufrieva, N. V., Nikulin, A. D. D., Fedorova, O. S., and Demidkina, T. V. (2015) Pre-steady-state kinetic and structural analysis of interaction of methionine gamma-lyase from *Citrobacter freundii* with inhibitors, *J. Biol. Chem.*, **290**, 671-681.
 28. Kladova, O. A., Krasnoperov, L. N., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2018) Kinetics and thermodynamics of DNA processing by wild type DNA-glycosylase endo III and its catalytically inactive mutant forms, *Genes (Basel)*, **9**, doi: 10.3390/genes9040190.
 29. Kladova, O. A., Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2017) Mutational and kinetic analysis of lesion recognition by *Escherichia coli* endonuclease VIII, *Genes (Basel)*, **8**, 1-13.
 30. Yakovlev, D. A., Kuznetsova, A. A., Fedorova, O. S., and Kuznetsov, N. A. (2017) Search for modified DNA sites with the human methyl-CpG-binding enzyme MBD4, *Acta Naturae*, **9**, 88-98.
 31. Kuzmic, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase, *Anal. Biochem.*, **237**, 260-273.
 32. Alekseeva, I. V., Davletgildeeva, A. T., Arkova, O. V., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2019) The impact of single-nucleotide polymorphisms of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 on specific DNA binding and catalysis, *Biochimie*, **163**, 73-83.
 33. Kladova, O. A., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2019) Thermodynamic parameters of endonuclease VIII interactions with damaged DNA, *Acta Naturae*, **11**, 29-37.
 34. Miroshnikova, A. D., Kuznetsova, A. A., Kuznetsov, N. A., and Fedorova, O. S. (2016) Thermodynamics of damaged DNA binding and catalysis by human AP endonuclease 1, *Acta Naturae*, **8**, 103-110.
 35. Rachofsky, E. L., Osman, R., and Ross, J. B. A. (2001) Probing structure and dynamics of DNA with 2-aminopurine: effects of local environment on fluorescence, *Biochemistry*, **40**, 946-956.

THE ROLE OF AMINO ACID RESIDUES Arg243 AND His239 IN THE PROCESS OF DAMAGE RECOGNITION BY HUMAN URACIL-DNA-GLYCOSYLASE SMUG1*

D. A. Iakovlev^{1,2}, I. V. Alekseeva¹, N. A. Kuznetsov^{1**} and O. S. Fedorova^{1**}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine (ICBFM), Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; E-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru; fedorova@niboch.nsc.ru

² Novosibirsk State University, Department of Natural Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

Received February 3, 2020

Revised March 17, 2020

Accepted March 19, 2020

Human uracil-DNA glycosylase SMUG1 removes uracil residues and some other noncanonical or damaged bases from DNA. Despite the functional importance of this enzyme, its X-ray structure is still unavailable. Previously, we performed homology modeling of human SMUG1 structure and suggested the roles of some amino acid residues in the recognition of damaged nucleotides and their removal from DNA. In this study, we investigated the kinetics of conformational transitions in the protein and in various DNA substrates during enzymatic catalysis using the stopped-flow method based on changes in the fluorescence intensity of enzyme's tryptophan residues and 2-aminopurine in DNA or fluorescence resonance energy transfer (FRET) between fluorophores in DNA. The kinetic mechanism of interactions between reaction intermediates was identified, and kinetic parameters of the intermediate formation and dissociation were calculated. The obtained data help in elucidating the functions of His239 and Arg243 residues in the recognition and removal of damaged nucleotides by SMUG1.

Keywords: DNA repair, human uracil-DNA glycosylase SMUG1, fluorescence, conformational dynamics, stopped-flow kinetics