

УДК 577.152.351, 577.151.02

# Построение механистической полноатомной модели апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы человека АРЕ1 для виртуального скрининга новых ингибиторов

И. Г. Халиуллин<sup>1</sup>, Д. К. Ниров<sup>1,2</sup>, И. В. Шаповалова<sup>2</sup>, В. К. Швядас<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73<sup>2</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

\*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 18.04.2012 г.

**РЕФЕРАТ** Создана полноатомная молекулярная модель апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 (АРЕ1) человека – одного из ключевых ферментов системы репарации ДНК. Исследование включало в себя гибридное квантово-механическое/молекулярно-механическое моделирование фермент-субстратных взаимодействий и расчет ионизационных состояний аминокислотных остатков активного центра фермента. В результате обобщения расчетных и экспериментальных данных обоснован выбор механизма действия АРЕ1 с остатком Asp210 в качестве акцептора протона. Выявлены взаимодействия в активном центре, наиболее важные для связывания субстрата и потенциальных ингибиторов АРЕ1, представляющих интерес в качестве перспективных сопровождающих препаратов в химио- и радиотерапии онкологических заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1, КМ/ММ, механизм действия, молекулярное моделирование, ингибирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** AP – апуриновый/апиримидиновый; АРЕ1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1; КМ/ММ – квантово-механический/молекулярно-механический; МД – молекулярная динамика; ЭРО – эксцизионная репарация оснований.

## ВВЕДЕНИЕ

Повреждения ДНК постоянно возникают в результате ошибок репликации и под воздействием различных экзогенных и эндогенных факторов, таких, как ультрафиолетовое излучение и окислительный стресс. Для обеспечения стабильности клеточного генома у млекопитающих существуют специальные ферментные системы репарации – прямая эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов и репарация в результате рекомбинации, позволяющие устранять большинство повреждений ДНК [1–3]. Фармакологическое ингибирование систем репарации является перспективным путем увеличения эффективности терапии онкологических заболеваний. Это обусловлено тем, что системы репарации противостоят действию химиотерапевтических агентов (например, темозоломида или цисплатина [4]), повреждающих ДНК с це-

лью уничтожения опухолевой клетки. Следовательно, селективное воздействие, направленное на ингибирование ферментов, участвующих в процессах репарации ДНК, может быть использовано в качестве сопровождающего лечения. Следует ожидать, что наиболее эффективными окажутся соединения, связывание которых в активном центре фермента будет затрагивать остатки, непосредственно вовлеченные в каталитический механизм. Поэтому адекватная информация об организации активного центра фермента-мишени, распределении зарядов, а также анализ взаимодействий, определяющих прочность связывания субстрата и ингибиторов, абсолютно необходимы для поиска новых лекарственных средств в терапии рака.

Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (АРЕ1) – ключевой фермент механизма репарации ДНК, известного как эксцизионная репарация осно-

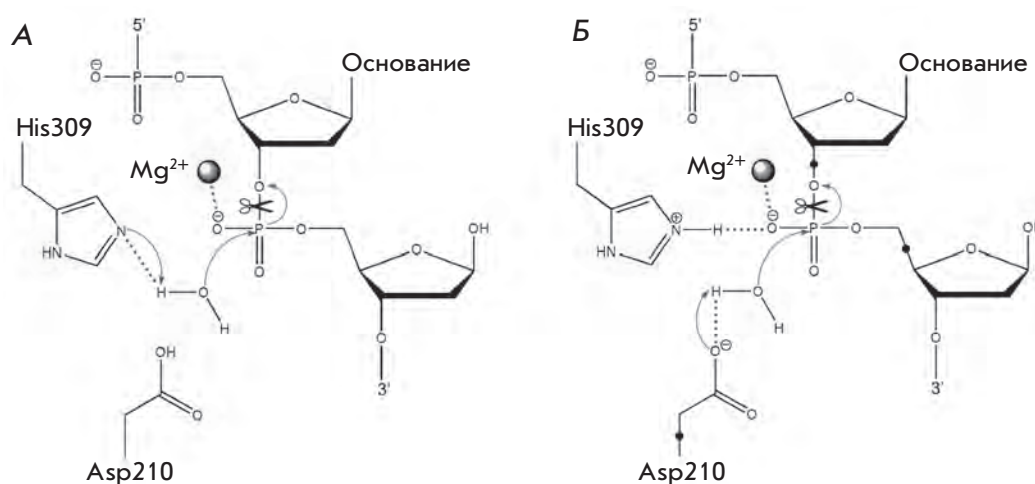
ваний (ЭРО). Апуриновые/апиримидиновые (АР) сайты – остатки дезоксирибозы в молекуле ДНК, лишенные азотистого основания, образуются в результате ферментативного гидролиза N-гликозидной связи поврежденных нуклеотидов и представляют собой, по сути, интермедиаты процесса ЭРО. Кроме того, АР-сайты в клетках могут возникать и спонтанно в результате апуринизации [5]. По существующим оценкам в клетках млекопитающих за сутки образуется до 10000 АР-сайтов [6]. Эндонуклеаза АРЕ1 распознает АР-сайты и осуществляет гидролиз их 5'-фосфодиэфирной связи для последующего замещения на неповрежденный нуклеотид [5, 7]. Данные лабораторных и клинических исследований свидетельствуют о важной роли этого фермента в развитии опухолей и формировании их устойчивости к противоопухолевым препаратам [8].

Существуют разные точки зрения на каталитический механизм действия эндонуклеазы АРЕ1. Первая кристаллографическая структура фермента была получена в 1997 году (PDB ID 1bix) [9], и в процессе описания структуры авторами был предложен механизм, в котором роль общего основания в катализе приписывается остатку His309. В предполагаемом механизме незаряженный остаток His309 совместно с Asp283 образует цепь переноса заряда подобно сериновым протеазам с той разницей, что в роли активируемого нуклеофильного агента выступает молекула воды (*рис. 1А*). В этом механизме роль иона металла заключается в связывании и поляризации отрицательно заряженной фосфатной группы субстрата, а также в стабилизации промежуточного соединения ферментативной реакции.

В исследованиях, проведенных с использованием сайт-направленного мутагенеза, показана принципиальная значимость другого остатка активного

центра – Asp210, для катализа: мутантные формы фермента с заменами Asp210Ala и Asp210Asn практически полностью теряли свои каталитические свойства (активность падала более чем в 25000 раз) по сравнению с ферментом дикого типа [10]. Определение кристаллографических структур АРЕ1 человека в комплексе с производными ДНК привело к существенному пересмотру предположений о механизме действия фермента [11]. Одна из установленных структур (PDB ID 1de8) представляет собой комплекс неактивного фермента, не содержащего иона металла, с аналогом субстрата, в то время как вторая структура (PDB ID 1de9) содержит ион металла (двухвалентного марганца) и связанный с ферментом ДНК-аналог субстрата после каталитического расщепления. При объединении структур (их наложении в пространстве) получено представление о строении фермент-субстратного комплекса, содержащего одновременно аналог субстрата и ион металла. Хотя полученная таким образом модельная структура фермент-субстратного комплекса не содержит молекулы воды, потенциально способной атаковать субстрат, положение остатков активного центра до и после каталитического акта позволило сделать предположение об альтернативном механизме протекания каталитической реакции [11]. В предложенной схеме в роли общего основания, активирующего молекулу воды, выступает остаток Asp210, в то время как остатку His309, наряду с ионом металла, отводится роль связывания и координации фосфатной группы субстрата (*рис. 1Б*). В этом случае подразумевается участие положительного заряда остатка His309 в процессе катализа, чему, по-видимому, способствует близкое расположение остатка Asp238. Основную же стабилизирующую функцию при образовании промежуточного соедине-

**Рис. 1.** Основные представления о механизме действия АРЕ1. А – В роли общего основания, активирующего молекулу воды, выступает остаток His309. Б – В роли общего основания выступает остаток Asp210, в то время как His309 участвует в связывании субстрата. Черные кружки – линкерные атомы, использованные в данной работе при КМ/ММ-моделировании АРЕ1.



ния ферментативной реакции выполняет, по мнению авторов работы [11], остаток Asn212.

В более поздних кристаллографических [12], а также молекулярно-динамических [13] исследованиях были выдвинуты предположения о втором участке связывания металла в активном центре фермента. В этих работах предложен механизм действия APE1 с участием двух ионов металла [12], аналогичный механизму, выявленному у родственного фермента, эндонуклеазы Endo IV, и механизм «движущегося металла» [13], включающий в себя переход иона металла между двумя участками связывания в процессе катализа.

Следует отметить, однако, что ЯМР-исследование с применением изотопа  $^{25}\text{Mg}$  [14] не подтвердило гипотезы о связывании второго иона магния в активном центре эндонуклеазы APE1, поставив тем самым под сомнение механизмы с участием двух ионов металла и «движущегося металла». Результаты кристаллографических исследований, полученные в работе [12], объясняются, по мнению авторов работы [14], артефактами, вызванными использованием иона свинца вместо иона магния. Эффект движения иона металла при молекулярно-динамическом моделировании, в свою очередь, может быть обусловлен погрешностями и приближениями метода классической молекулярной динамики.

Мандл и сотр. [15] предложили двухстадийный вариант механизма действия фермента APE1, включающий участие остатка Tyr171 в форме фенолят-иона для прямой нуклеофильной атаки фосфатной группы субстрата. Такой вывод был сделан на основании данных, полученных с помощью сайт-направленного мутагенеза с заменой по положению 171. Кинетические исследования каталитических свойств мутантных форм Tyr171Ala, Tyr171Phe, Tyr171His показали падение активности фермента почти на пять порядков. Однако позднее [16] авторы признали несостоятельность предложенной ими двухстадийной схемы и высказались в пользу одностадийного механизма, в котором общим основанием, активирующим молекулу воды, служит остаток His309, а остаток Tyr171 участвует в связывании и правильной ориентации субстрата.

Методы молекулярного моделирования могли оказать существенную помощь при изучении механизма действия фермента, однако этот подход практически не использовался для исследования APE1, а при моделировании взаимодействия ингибитора с ферментом не учитывалось состояние ионизации ингибитора, что осложняет интерпретацию полученных результатов [17].

Таким образом, не существует однозначного представления о механизме действия эндонуклеазы чело-

века APE1, роли аминокислотных остатков активного центра в связывании и катализе. Поэтому актуальным остается уточнение структуры активного центра, характера взаимодействий фермента с субстратом и ингибиторами, участия аминокислотных остатков активного центра в механизме действия APE1 с применением методов молекулярного моделирования.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Программное обеспечение для молекулярного моделирования

Расчет ионизационных состояний аминокислотных остатков проводили с помощью программы PROPKA 2.0 [18, 19]. Подготовку стартовой структуры к расчетам и анализ траекторий выполняли в пакете AmberTools 1.2 (<http://ambermd.org>). Минимизацию энергии и молекулярную динамику проводили в пакете Amber 10 [20, 21], молекулярный докинг – с помощью программы Lead Finder 1.1.14 компании ООО «Молекулярные технологии» [22]. Моделирование пространственной структуры 6-гидрокси-ДОФА осуществляли с помощью программы ACD/ChemSketch 8.17 [23]. Визуализацию структур и траекторий осуществляли с помощью программы VMD 1.8.6 [24]. Параллельные вычисления молекулярно-динамических траекторий проводили на суперкомпьютере СКИФ МГУ «Чебышев».

### Подготовка структуры

Стартовая модель фермент-субстратного комплекса APE1 была подготовлена на основе кристаллографической структуры 1de8 [11]. Координаты атакующей молекулы воды в активном центре получили методом докинга, координаты иона марганца перенесли из структуры 1de9, а затем изменили тип металла на магний. Структуру фермент-субстратного комплекса протонировали и поместили в ячейку молекул воды типа TIP3P с минимальным расстоянием 12 Å от белка до края ячейки. Для нейтрализации заряда в систему добавили ионы натрия. Для молекулярно-механического описания молекул белка и ДНК использовали силовое поле *ff99SB* [25], для описания AP-сайта – параметры из базы данных R.E.DD.B (<http://q4md-forcefieldtools.org>) [26].

### Минимизация энергии и молекулярная динамика

Модель фермент-субстратного комплекса APE1 уравнивали и проводили расчет 1000 пс молекулярно-динамической траектории согласно следующему протоколу. Прежде всего, проводили двухстадийную минимизацию энергии сольватированной системы. На первой стадии (2500 шагов по алгоритму steepest descent, затем 2500

шагов по алгоритму conjugate gradient) систему описывали молекулярно-механически, при этом координаты белка, ДНК и иона магния фиксировали позиционными ограничениями формы  $k(\Delta x)^2$  с константой 2 ккал/(моль·Å<sup>2</sup>). На второй стадии (5000 steepest descent шагов, 5000 conjugate gradient шагов) систему разбивали на квантово-механический (КМ) и молекулярно-механический (ММ) регионы, и минимизацию энергии проводили без ограничений. КМ-регион включал боковую цепь остатка активного центра Asp210, атакующую молекулу воды, фрагмент AP-сайта и описывался полуэмпирическим гамильтонианом RM1 [27]. При рассмотрении связей, пересекающих границу КМ- и ММ-регионов, использовали метод линкерного атома.

После минимизации энергии с применением указанного выше КМ/ММ-разбиения систему разогревали от 0 до 300 К в течение 50 пс (с позиционными ограничениями 1 ккал/(моль·Å<sup>2</sup>) на атомах белка, ДНК и иона магния), уравнивали при 300 К в течение 500 пс и проводили симуляцию равновесной системы в течение 1000 пс. Во всех симуляциях использовали периодические граничные условия и метод учета дальнедействующих взаимодействий PME (Particle Mesh Ewald). Радиус отсечения несвязных взаимодействий составлял 10 Å. Разогрев системы проводили при постоянном объеме, уравнивание и расчет траектории в течение 1000 пс – при постоянном давлении. Регуляцию температуры осуществляли по методу Ланжевена. Шаг интегрирования составлял 0.002 пс. Межатомные расстояния и углы в активном центре АРЕ1 анализировали на основании траектории 1000 пс равновесной симуляции.

### Молекулярный докинг

Модель для проведения молекулярного докинга потенциальных ингибиторов АРЕ1 была получена следующим образом. Из структуры сольватированного фермент-субстратного комплекса АРЕ1, полученного в результате минимизации энергии, удалили молекулу воды, ионы натрия и субстрат-аналог ДНК, после чего рассчитали потенциальную решетку (карту потенциала взаимодействия в активном центре), охватывающую область связывания AP-сайта. Затем с использованием генетического алгоритма поиска в активный центр докировали молекулу потенциального ингибитора 6-гидрокси-ДОФА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

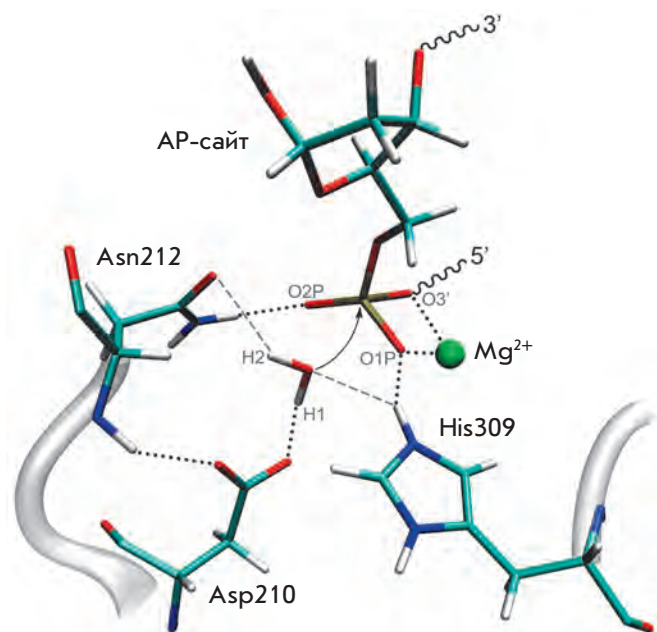
### Ионизационные состояния остатков активного центра

По результатам расчета ионизационных состояний остатков активного центра методом PROPKA 2.0

было установлено, что в оптимальных условиях протекания реакции гидролиза фосфодиэфирной связи (рН 7–8 [12]) остаток His309 находится в протонированной форме (расчетное значение  $pK_a$ , равное 8.6, совпадает со значением  $pK_2$  экспериментально определенного рН-профиля активности фермента), а остаток Asp210 – в непротонированной (расчетное значение  $pK_a$ , равное 6.2, близко к значению  $pK_1$  рН-профиля активности фермента – 6.6). Таким образом, можно заключить, что функцию общего основания при катализе выполняет непротонированный отрицательно заряженный остаток Asp210, в то время как положительно заряженный в условиях оптимума реакции остаток His309 участвует в связывании отрицательно заряженной фосфатной группы субстрата и стабилизации переходного состояния. Поэтому далее при построении полноатомной модели АРЕ1 Asp210 и His309 моделировали в заряженной форме.

### Модель фермент-субстратного комплекса и предполагаемый механизм действия эндонуклеазы АРЕ1

Стартовая сольватированная модель фермент-субстратного комплекса АРЕ1 была создана на основе кристаллографических структур 1de8 и 1de9 как описано в «Экспериментальной части». Далее было необходимо оптимизировать позиции атомов модели (прежде всего координаты добавленных атомов водорода), для чего проведена двухстадийная минимизация энергии системы. На первой стадии проводили молекулярно-механическую минимизацию с целью удаления наибольших напряжений в системе. На второй стадии осуществляли более тонкую настройку структуры активного центра при помощи гибридной КМ/ММ-минимизации энергии с использованием гамильтониана RM1 как описано выше. Стабильность полученной структуры подтверждена в результате КМ/ММ молекулярно-динамической симуляции продолжительностью 1000 пс. Рассчитанные межатомные расстояния в активном центре АРЕ1 приведены в *таблице*. Анализ полученной модели показывает, что связывание субстрата в активном центре апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы сопровождается образованием большого количества связей и взаимодействий различной природы. Среди них следует выделить гидрофобные взаимодействия дезоксирибозы AP-сайта в гидрофобном кармане, образованном остатками Leu282, Phe266 и Trp280. Свободная гидроксильная группа дезоксирибозы AP-сайта также образует водородную связь с карбонильной группой основной цепи Ala230. Фосфатная группа, расположенная на 3'-конце AP-сайта, удерживается положительным зарядом остатка Arg177. Атакуемая фосфатная группа



**Рис. 2.** Активный центр полноатомной модели фермент-субстратного комплекса APE1. Пунктирными линиями показана система водородных связей. Штриховыми линиями отмечены электростатические взаимодействия, не являющиеся водородными связями. Стрелка указывает направление нуклеофильной атаки.

электростатически взаимодействует с ионом магния и образует водородные связи с боковыми радикалами остатков Asn174, Asn212 и His309. Гидроксильная группа остатка Tyr171 направлена в сторону атома кислорода уходящей группы.

Ориентация атакующей молекулы воды обеспечивается взаимодействием с общим основанием Asp210, карбонильной группой остатка Asn212 и боковым радикалом остатка His309, причем взаимодействия  $\text{H}_2\text{O}:\text{H2} \cdots \text{Asn212}:\text{OD1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}:\text{O} \cdots \text{His309}:\text{HE2}$  не являются полноценными водородными связями: средние значения углов  $\text{O}\cdots\text{H2}\cdots\text{OD1}$  и  $\text{NE2}\cdots\text{HE2}\cdots\text{O}$  составляют  $137^\circ$  и  $122^\circ$  соответственно, в то время как в случае водородной связи эти значения должны быть не менее  $150^\circ$ . Реакционноспособная конформация карбоксильной группы общего основания Asp210 в ферменте поддерживается взаимодействием его бокового радикала с аминогруппой основной цепи остатка Asn212 (рис. 2).

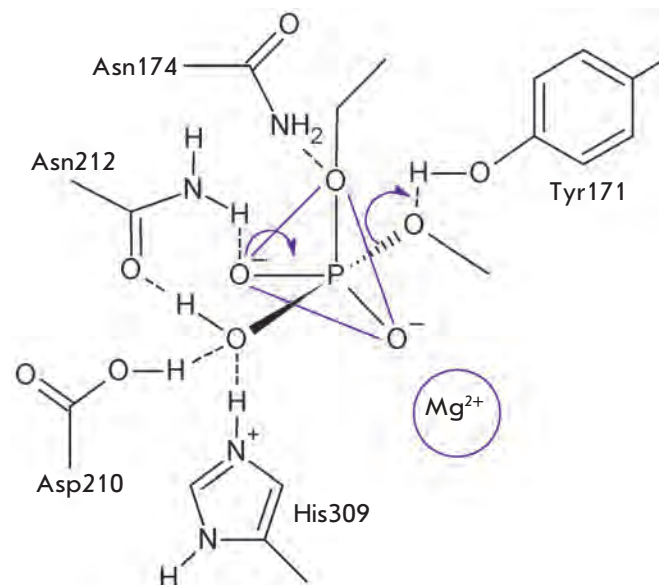
Ориентированная и поляризованная под действием зарядов остатков Asp210, His309 и иона металла молекула воды способна атаковать фосфатную группу субстрата, одновременно передавая протон общему основанию – остатку Asp210. Образующийся в результате атаки интермедиат в виде тригональной бипирамиды стабилизирован следующими взаимодействиями в активном центре фермента: атомы кис-

Дистанционные характеристики фермент-субстратного комплекса APE1, полученные в результате равновесной КМ/ММ-симуляции продолжительностью 1000 пс. Средние значения приведены вместе со стандартным отклонением

Взаимодействие	Расстояние, Å
$\text{H}_2\text{O}:\text{O} \cdots \text{AP-сайт}:\text{P}$	$1.91 \pm 0.03$
$\text{H}_2\text{O}:\text{O} \cdots \text{His309}:\text{HE2}$	$2.52 \pm 0.17$
$\text{H}_2\text{O}:\text{H1} \cdots \text{Asp210}:\text{OD1}$	$1.49 \pm 0.07$
$\text{H}_2\text{O}:\text{H2} \cdots \text{Asn212}:\text{OD1}$	$2.62 \pm 0.47$
$\text{AP-сайт}:\text{O1P} \cdots \text{Mg}^{2+}$	$1.84 \pm 0.04$
$\text{AP-сайт}:\text{O1P} \cdots \text{His309}:\text{HE2}$	$1.78 \pm 0.09$
$\text{AP-сайт}:\text{O2P} \cdots \text{Asn212}:\text{HD2}$	$2.08 \pm 0.32$
$\text{dC5}:\text{O3}' \cdots \text{Mg}^{2+}$	$1.95 \pm 0.06$
$\text{Asp210}:\text{OD2} \cdots \text{Asn212}:\text{H}$	$2.22 \pm 0.20$

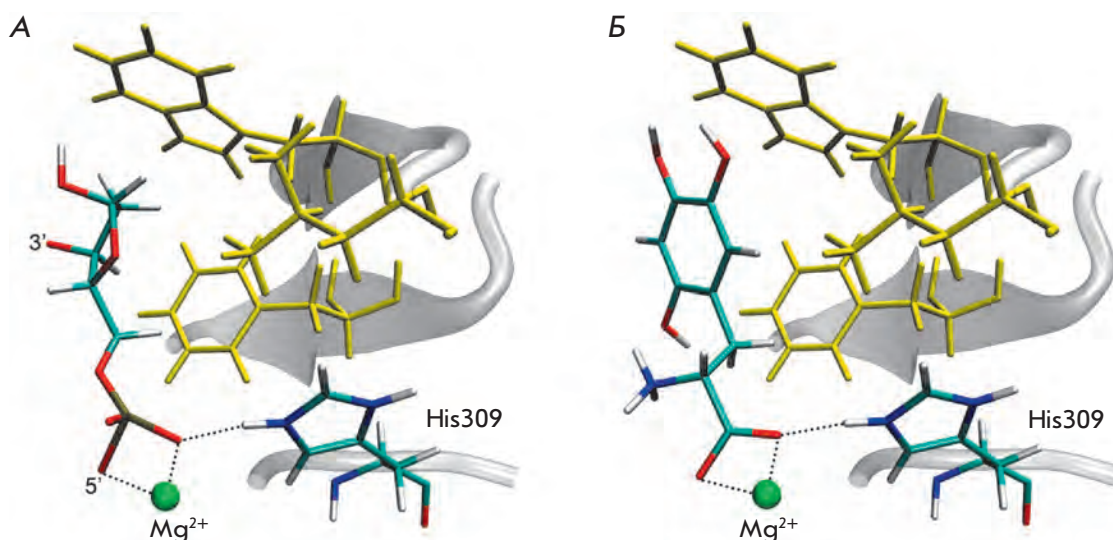
лорода в «вершинах» бипирамиды взаимодействуют с боковыми радикалами остатков His309 и Tyr171; плоскость треугольника в «основании» бипирамиды расположена между остатками Asn174, Asn212 и ионом магния (рис. 3).

Данные по мутагенезу Tyr171 [15] указывают на важную роль этого остатка в механизме действия APE1, однако, в отличие от ранее сделанных предположений [15, 16], мы предполагаем другую роль



**Рис. 3.** Схематичное изображение строения и превращения промежуточного продукта (интермедиата в виде тригональной бипирамиды) в реакции гидролиза, катализируемой AP-эндонуклеазой 1.

Рис. 4. Расположение субстрата (А) и потенциально ингибитора (Б) в активном центре полноатомной модели АРЕ1. Желтым показаны остатки гидрофобного кармана: Phe266, Trp280 и Leu282.



Tyr171 в катализе. Близкое расположение положительных зарядов иона магния и остатка Arg156 должно способствовать облегченному уходу протона с гидроксильной группы Tyr171, поэтому мы рассматриваем данный остаток в качестве потенциального донора протона для уходящей группы, являющейся сильным основанием. Менее значительное влияние мутаций по положению 171 на связывание субстрата по сравнению с падением каталитической константы [15] объясняется слабо выраженным взаимодействием остатка с субстратом на ранних стадиях реакции, предшествующих каталитическому акту, что полностью согласуется со сделанным предположением. В ходе каталитического превращения, по-видимому, происходит сближение уходящей группы с боковым радикалом остатка Tyr171, что обеспечивает дополнительную стабилизацию интермедиата реакции, и передача протона на уходящую группу становится возможной.

При дальнейшем протекании реакции менее стабилизированная связь P–O, находящаяся в плоскости основания и направленная в сторону остатка Asn212, превращается в двойную P=O. Одновременно с этим разрывается связь P–O, направленная к остатку Tyr171, и уходящая группа забирает протон у гидроксильной группы тирозина (рис. 3).

Восстановление каталитически активного состояния активного центра (депротонирование общего основания Asp210 и протонирование кислоты Tyr171) происходит в результате взаимодействия с молекулами воды из внешней среды.

#### Анализ связывания субстрата и механизмов ингибиторов

В связывании субстрата и стабилизации переходного состояния в ходе реакции участвует множество заря-

дов и полярных групп, характер этих взаимодействий и ионное состояние аминокислотных остатков активного центра определяют требования к структуре соединений, способных связываться в активном центре АРЕ1. При конструировании эффективных ингибиторов фермента следует реализовать по крайней мере наиболее важные взаимодействия. Существование гидрофобного участка связывания наряду с множеством полярных и различно заряженных групп осложняет поиск низкомолекулярных соединений подходящей структуры. Аминокислоты являются тем классом природных соединений, в структуре которых одновременно имеются заместители различной природы, способные осуществить гидрофобные, электростатические взаимодействия, выступить донором или акцептором водородных связей. Отмечалось [17], что 6-гидрокси-ДОФА может быть ингибитором эндонуклеазной активности АРЕ1, однако, при моделировании взаимодействия фермента с ингибитором было неправильно учтено состояние ионизации ингибитора, что затрудняет интерпретацию полученных результатов. Для выяснения особенностей взаимодействия фермента с потенциальными ингибиторами такого строения проведено молекулярное моделирование связывания различных аминокислот (в том числе 6-гидрокси-ДОФА) и их производных в активном центре АРЕ1 с учетом ионизации как самого потенциального ингибитора, так и аминокислотных остатков активного центра фермента.

Анализ результатов молекулярного моделирования показывает, что наличие карбоксильной группы позволяет выбранным соединениям связываться с ионом металла и остатком His309, в то время как гидрофобный заместитель, например фенильный радикал, может располагаться в гидрофобном кармане связывания дезоксирибозы (рис. 4). Введение

гидроксильных заместителей в фенильный радикал может приводить к образованию дополнительных водородных связей с полярными остатками активного центра фермента. Кроме того, одним из возможных факторов, определяющих эффективность ингибирования, является связывание ингибитора с заряженным остатком общего основания.

## ВЫВОДЫ

Целью работы был выбор наиболее достоверного механизма действия АРЕ1 на основе данных молекулярного моделирования, анализа построенной механистической полноатомной модели АРЕ1, а также критического рассмотрения опубликованных ранее экспериментальных результатов и предположений. Для этого проведен расчет ионизационных состояний остатков активного центра и гибридное КМ/ММ-моделирование фермент-субстратного комплекса, содержащего молекулу воды, способную атаковать субстрат. В результате проведенного исследования показано, что функцию общего основания в каталитическом механизме выполняет, по всей видимости, остаток Asp210, а остаток His309, находясь в протонированной (заряженной) форме, участвует в связывании фосфатной группы субстрата. Анализ молекулярно-динамической траектории фермент-субстратного комплекса показывает его высокую ре-

акционноспособность и свидетельствует об адекватности проведенного молекулярного моделирования.

Выявлены наиболее важные взаимодействия в активном центре, определяющие эффективность связывания субстрата и потенциальных ингибиторов фермента, представляющих интерес в качестве перспективных сопровождающих препаратов в химио- и радиотерапии онкологических заболеваний. Выдвинуто предположение о роли Tyr171 активного центра АРЕ1 как остатка, способного отдать протон уходящей группе субстрата. Таким образом, проведенное исследование позволило установить согласованный механизм действия фермента, обобщающий данные молекулярного моделирования, экспериментальные результаты кинетических исследований и другие опубликованные данные. В дальнейшей работе планируется применить гибридные квантово-механические методы более высокого порядка для расчета энергетического барьера реакции, катализируемой эндонуклеазой АРЕ1 в соответствии с предложенным механизмом, и провести поиск эффективных ингибиторов с использованием построенной механистической полноатомной модели фермента. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Министерства образования и науки России  
(Государственный контракт № 16.512.11.2240).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindahl T., Wood R.D. // *Science*. 1999. V. 286. P. 1897–1905.
- Hoeyjmakers J.H. // *Nature*. 2011. V. 411. P. 366–374.
- Речкунова Н.И., Красикова Ю.С., Лаврик О.И. // *Биохимия*. 2011. Т. 76. С. 32–45.
- Abbotts R., Madhusudan S. // *Cancer Treatment Rev*. 2010. V. 36. P. 425–435.
- Невинский Г.А. // *Биохимия*. 2011. Т. 76. С. 115–141.
- Wilson D.M., Simeonov A. // *CMLS*. 2010. V. 67. P. 3621–3631.
- Дырхеева Н.С., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // *Молекулярная биология*. 2007. Т. 41. С. 450–466.
- Fishel M.L., Kelley M.R. // *Mol. Aspects Medicine*. 2007. V. 28. P. 375–395.
- Gorman M.A., Morera S., Rothwell D.G., de La Fortelle E., Mol C.D., Tainer J.A., Hickson I.D., Freemont P.S. // *EMBO J*. 1997. V. 16. P. 6548–6558.
- Erzberger J.P., Wilson D.M. // *J. Mol. Biol*. 1999. V. 290. P. 447–457.
- Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. // *Nature*. 2000. V. 403. P. 451–456.
- Beernink P.T., Segelke B.W., Hadi M.Z., Erzberger J.P., Wilson D.M., Rupp B. // *J. Mol. Biol*. 2001. V. 307. P. 1023–1034.
- Oezguen N., Schein C.H., Peddi S.R., Power T.D., Izumi T., Braun W. // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2007. V. 68. P. 313–323.
- Lipton A.S., Heck R.W., Primak S., McNeill D.R., Wilson D.M., Ellis P.D. // *J. Amer. Chem. Soc*. 2008. V. 130. P. 9332–9341.
- Mundle S.T., Fattal M.H., Melo L.F., Coriolan J.D., O'Regan N.E., Strauss P.R. // *DNA Repair*. 2004. V. 3. P. 1447–1455.
- Mundle S.T., Delaney J.C., Essigmann J.M., Strauss P.R. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. P. 19–26.
- Simeonov A., Kulkarni A., Dorjsuren D., Jadhav A., Shen M., McNeill D.R., Austin C.P., Wilson D.M. III // *PloS One*. 2009. V. 4. P. e5740.
- Li H., Robertson A.D., Jensen J.H. // *Proteins*. 2005. V. 61. P. 704–721.
- Bas D.C., Rogers D.M., Jensen J.H. // *Proteins*. 2008. V. 73. P. 765–783.
- Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E. III, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Crowley M., Walker R.C., Zhang W., et al. // *AMBER 10*. University of California. San Francisco. 2008.
- Walker R.C., Crowley M.F., Case D.A. // *J. Comput. Chem*. 2008. V. 29. P. 1019–1031.
- Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Chem. Inf. Model*. 2008. V. 48. P. 2371–2385.
- ACD/ChemSketch Freeware, version 8.17. Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com. 2005.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graphics*. 1996. V. 14. № 1. P. 33–38.
- Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. // *Proteins*. 2006. V. 65. P. 712–725.
- Chen J., Dupradeau F.-Y., Case D.A., Turner C.J., Stubbe J. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 3096–3107.
- Rocha G.B., Freire R.O., Simas A.M., Stewart J.J.P. // *J. Comp. Chem*. 2006. V. 27. P. 1101–1111.