

УДК 577.151.4; 577.325.2; 577.325.3

Структурные особенности взаимодействия 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1) с ДНК

В. В. Коваль^{1,2}, Д. Г. Кнорре^{1,2}, О. С. Федорова^{1,2*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: fedorova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.02.2014

РЕФЕРАТ Рассмотрены структурные особенности взаимодействия фермента репарации 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека (hOGG1) с ДНК; проанализирована организация активного центра этого фермента. Обобщены данные о роли отдельных аминокислотных остатков hOGG1 в процессах специфического узнавания окисленного основания ДНК, образования фермент-субстратного комплекса и удаления поврежденного основания из ДНК. Приведены структурные данные об изменении активного центра фермента и нарушении ферментативной активности hOGG1 в результате введения точечных аминокислотных замен. Обсуждается структурно-динамический механизм удаления окисленных оснований из ДНК с помощью hOGG1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белково-нуклеиновое узнавание, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза человека, ферменты репарации, функциональные мутанты, структурный анализ hOGG1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AP – апуриновый/апиримидиновый сайт; 8-охоG – 7,8-дигидро-8-оксогуанин.

ВВЕДЕНИЕ

Большое количество трехмерных структур белков и их комплексов, определенных и ставших доступными для анализа за последние полвека (по состоянию на апрель 2014 года база данных трехмерных структур биомолекул Protein Data Bank (PDB) содержит около 100 000 записей), вполне естественно привело к повышению внимания к взаимосвязи между структурой и функциями белков. В настоящем обзоре рассмотрены структурные особенности взаимодействия фермента hOGG1 с ДНК, содержащей повреждения.

Генетический материал всех живых организмов подвергается постоянному и активному воздействию как экзогенных, так и эндогенных факторов. Среди этих факторов можно выделить активные формы кислорода (АФК), высокореакционные клеточные метаболиты, различного типа ксенобиотики, воздействие ультрафиолетового и ионизирующего излучения и т.д. Среди широкого спектра воздействий, которым подвержены молекулы ДНК [1–4] и которые приводят к возникновению многих заболеваний [5–10], особенно широко представлены такие активные формы кислорода, как $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} [11, 12], образующиеся при аэробном метаболизме. Основными про-

дуктами модификации пуриновых оснований в ДНК являются 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-оксогуанин, 8-охоG) и 5-формадиопиримидиновые производные аденина – 4,6-диамино-5-формадиопиримидин (Фару А), и гуанина – 2,6-диамино-4-окси-5-формадиопиримидин (Фару G) [13, 14].

Появление в генетическом материале клетки окисленных оснований приводит к дестабилизации генома. Например, 8-оксогуанин способен образовывать с аденином комплементарную пару Хугстеновского типа. Вследствие этого в первом цикле репликации ДНК-полимераза может включать во вновь синтезируемую цепь напротив 8-охоG аденозин вместо цитозина (в результате образуется пара 8-охоG/A). Во втором цикле репликации полимераза встраивает Т против А; таким образом, после двух циклов репликации происходит замена G/C → T/A [15, 16].

Для того чтобы противостоять накоплению 8-охоG в ДНК, клетки живых организмов создали специальную защитную систему (GO-систему) [17, 18]. Эта система достаточно хорошо охарактеризована в бактериях *Escherichia coli*. Она состоит из трех ферментов: Fpg (MutM) – специфическая N-гликозилаза/AP-лиаза, удаляющая остатки 8-оксогуанина;

MutY – специфическая N-гликозилаза, удаляющая остаток аденина напротив 8-оксогуанина; и MutT – фосфатаза, гидролизующая пирофосфатную связь в 8-охо-dGTP. Клетки эукариотических организмов содержат структурные или функциональные гомологи этих бактериальных ферментов [19, 20]. Удаление остатков 8-оксогуанина из ДНК эукариот осуществляет 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1) [21]. Показано, что каждая клетка человека содержит около 50 тысяч молекул OGG1, которые защищают геномную ДНК от накопления продуктов окисления пуринов [22].

В клетках человека ген *OGG1* локализован в коротком плече хромосомы 3 (3p25/26). В процессе транскрипции с него синтезируются две основные формы мРНК, которые кодируют белки, состоящие из 345 и 424 аминокислот, α -hOGG1 и β -hOGG1 соответственно [21, 23–26]. У обеих форм hOGG1 первые 316 аминокислот совпадают; различаются С-концевые части белка [21, 23–27]. Анализ локализации в клетке этих форм фермента OGG1 показал, что α -hOGG1 находится в ядрах, а β -hOGG1 – в митохондриях [27]. Ядерный белок α -hOGG1 высококонсервативен, он охарактеризован в клетках человека, а также в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, растениях *Arabidopsis thaliana*, дрозофиле *Drosophila melanogaster* и у ряда млекопитающих [28]. Гомология между белком α -hOGG1 дрожжей и человека достигает 38%. Белок OGG1 β -типа обнаружен только в митохондриях клеток человека [28]. Каталитические механизмы и структурные свойства изучены только для белка α -hOGG1.

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ hOGG1

Фермент hOGG1 является бифункциональной ДНК-гликозилазой/ β -лиазой, он способен расщеплять N-гликозидную связь поврежденного основания с образованием свободного 8-охоG, а затем катализировать разрыв 3'-фосфодиэфирной связи. Рассматриваемый химический механизм первоначально был предложен в группе Wallace S.S. для эндонуклеазы III из *E. coli* [29]. Основные идеи, предложенные в упомянутой работе, были позже экспериментально подтверждены группой Lloyd R.S. [30] на основании анализа ковалентных сшивок между ферментом и ДНК. В соответствии с предложенным механизмом при инкубации ДНК и фермента в условиях образования оснований Шиффа и последующего его восстановления боргидридом натрия возникает ковалентная сшивка ДНК с белком.

Каталитический механизм действия фермента hOGG1 включает участие аминокислотной боковой цепи заместителя остатка Lys249, который замещает основание 8-охоG у атома C1' остатка рибозы и способ-

ствует элиминированию 3'-фосфодиэфирной связи через промежуточное образование основания Шиффа с C1'-атомом дезоксирибозы (рис. 1) [31–33]. Ранее Verdine G.L. и соавт. показали, что мутантная форма K249Q hOGG1 не обладает каталитической активностью, но сохраняет способность узнавать повреждение в ДНК [21]. Вторая химическая стадия – разрыв фосфодиэфирной связи со стороны 3'-атома углерода остатка 2'-дезоксирибозы – протекает по механизму β -элиминирования (AP-лиазная активность).

Опираясь на многочисленные структурные и биохимические работы, Verdine G.L. и соавт. [34] высказали предположение, что в кислотно/основном взаимодействии с атомами N ϵ (аминогруппа Lys249), C2', O4' участвует вырезаемое основание 8-охоG. Изучена структура восстановленного боргидридом натрия интермедиата, получаемого в ходе взаимодействия фермента hOGG1 с 8-охоG-содержащим ДНК-субстратом. Оказалось, что вырезаемое из ДНК основание 8-охоG не покидает фермент, а остается в активном центре и выступает в качестве кофактора стадии β -элиминирования. В структуре фермента атом N9 остатка 8-охоG располагается близко к атомам N ϵ и O4', что позволяет ему участвовать в передаче протона между этими атомами.

На рис. 1 представлен механизм реакции, катализируемой hOGG1, предложенный в [34]. На первой стадии в результате атаки ϵ -аминогруппой Lys249 по атому C1' дезоксирибозы происходит разрыв гликозидной связи и образование аниона основания 8-охоG⁻. Анион затем отрывает протон от ϵ -NH₂-группы Lys249, при этом образуется аминаль **3**. Протонированный 8-охоGH отдает протон на атом O4' остатка рибозы; в результате этого аминаль **3** реорганизуется в основание Шиффа **4** с раскрытием фуранозного цикла. Основание Шиффа **4** несет дополнительный протон на атоме N ϵ Lys249, который передается снова на 8-охоG⁻. Образуется 8-охоGH и незаряженное основание Шиффа **5**, в котором протекает реакция β -элиминирования, приводящая к разрыву 3'-фосфодиэфирной связи. При этом образуются фрагменты ДНК с 5'-фосфатом и положительно заряженный интермедиат **6**, содержащий на 3'-конце α,β -ненасыщенное основание Шиффа, несущее положительный заряд. В результате гидролиза интермедиата **6** образуется свободный фермент и фрагмент ДНК, содержащий на 3'-конце 4-гидрокси-2,3-пентеналь-1.

К настоящему моменту база данных трехмерных структур белков PDB содержит информацию о 27 структурах hOGG1. Разрешены структуры hOGG1 в форме свободного фермента [35] и различных комплексов с ДНК: каталитически неактивных мутантов K249Q hOGG1 с 8-охоG-содержащей ДНК [35,

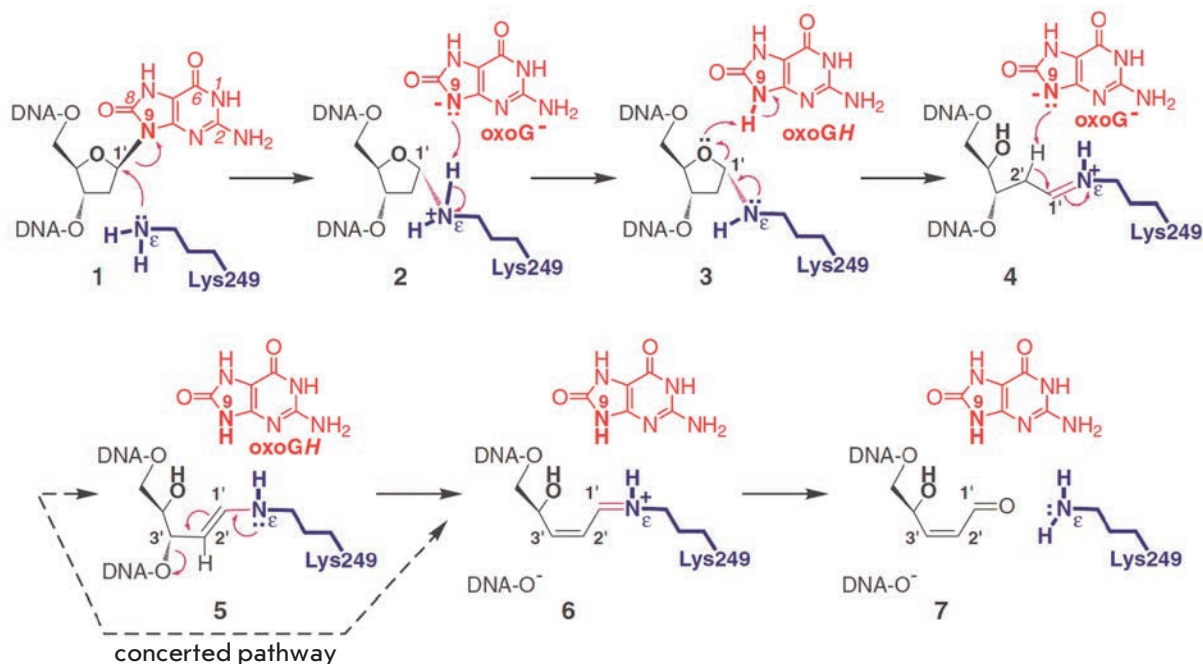


Рис. 1. Предполагаемый пошаговый механизм действия hOGG1, в котором вырезаемое на первой стадии основание 8-охоГ выступает в качестве кофактора стадии β -элиминирования. (Приведено с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nat. Struct. Biol.] Fromme J.C., Bruner S.D., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Nat. Struct. Biol. 2003. V. 10. № 3. P. 204–211, copyright 2003)

36], N149C с oxoG-содержащей ДНК и неповрежденной ДНК [37], D268N с oxoG-ДНК и ДНК, содержащей остаток тетрагидрофурана (F-лиганд) – «стоп»-субстрата для hOGG1 [33, 38]; комплекс WT hOGG1 с F-лигандом [33]. Помимо вышеупомянутых, изучены структуры ковалентного аддукта hOGG1 с AP-субстратом [34], полученного в результате восстановления основания Шиффа боргидридом натрия, а также комплексов мутантов hOGG1 (H270A, Q315A, Q315F, G42A), содержащих замены аминокислот, участвующих в формировании контактов с 7,8-дигидро-8-оксогуанином [32]. Изучена также структура позднего интермедиата, в котором основание 8-охоГ почти полностью вставлено в активный центр, однако последний еще не приобрел конечную каталитически активную конформацию [32].

СТРУКТУРА КАТАЛИТИЧЕСКИ НЕАКТИВНОГО МУТАНТА K249Q hOGG1

Первая структура комплекса ДНК, содержащей остаток 8-охоГ, с узнающим ее белком была получена для мутанта hOGG1 с заменой K149Q. Кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа, были получены после удаления неструктурированных N- и C-концов и участка петли 80–82. Это позволило изучить структуру комплекса корового домена 12–325

мутанта с 15-звенным дуплексом, содержащим пару 8-охоГ/С (рис. 2). Ранее было показано [21], что мутантная форма, в которой остаток Lys249 заменен на остаток Glu, не обладает каталитической активностью, но сохраняет способность узнавать субстрат. Поскольку в работе [36] не удалось получить пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы комплекса полноразмерного hOGG1 K249Q с олигонуклеотидным дуплексом, содержащим 8-охоГ/С, то с помощью ограниченного трипсинового гидролиза из белка были удалены неструктурированные аминокислотные концы, а также аминокислотные остатки участка петли 80–82. В результате был закристаллизован комплекс корового домена hOGG1, состоящий из аминокислотных остатков 12–325 с 15-звенным олигонуклеотидным дуплексом, содержащим пару 8-охоГ/С, и изучена его структура (рис. 2).

Показано, что укладка белка hOGG1 типична для суперсемейства белков репарации ДНК, участвующих в механизме эксцизионной репарации оснований (base excision repair BER), таких, как эндонуклеаза III и алкил-ДНК-гликозилаза AlkA из *E. coli* [39]. Белки этого семейства обнаружены у многих организмов, от бактерий до млекопитающих, они репарируют различные повреждения гетероциклов, возникающих в результате окисления, алкилиро-

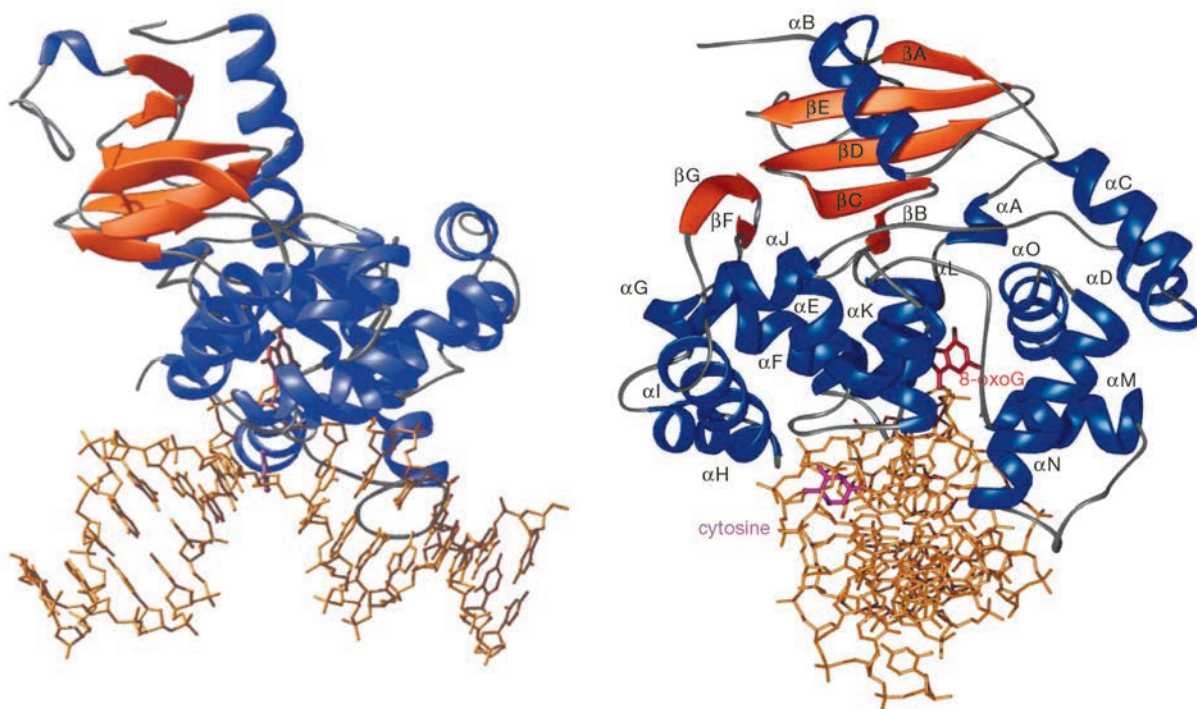


Рис. 2. Структура комплекса hOGG1-ДНК. Два ортогональных представления комплекса hOGG1-ДНК, на которых белок изображен в виде ленты (синим цветом изображены α -спирали, оранжевым – β -складки, серым – неструктурированные элементы); 15-звенный ДНК-дуплекс окрашен в желтый цвет. Основание 8-охоG (красное) полностью вывернуто из спирали ДНК и помещено в карман активного центра белка. Комплементарный ему цитозин (пурпурный) частично сохраняет стэкинг с основаниями своей цепи. Фермент изгибает ДНК на $\sim 70^\circ$ в плоскости пары оснований 8-охоG·C. Изгиб в ДНК приводит к экспонированию остатка цитозина в бороздку в направлении расположения боковых цепей аминокислот белка, что приводит к образованию специфических контактов. (Приведено с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nature] Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Nature. 2000. V. 403. P. 859–866, copyright 2000)

вания и дезаминирования ДНК. Особенность этих белков – наличие характерного структурного элемента «спираль-шпилька-спираль» (helix-hairpin-helix, HhH) [40], за которым следует Gly/Pro-богатая петля и консервативные остатки Gly, Pro и Asp (HhH-GPD). Структура hOGG1 содержит также два α -спиральных домена, общих для всех членов этого суперсемейства HhH-GPD, и третью антипараллельную β -складчатую структуру, которая есть еще только в алкил-ДНК-гликозилазе AlkA.

Белок прочно связывается с 8-охоG-содержащей цепью ДНК (рис. 2). Остаток 8-охоG полностью выворачивается из спирали ДНК и помещается в карман активного центра фермента, что согласуется с особенностями аналогичных структур в других членах суперсемейства белков HhH-GPD [31, 40, 41]. Хотя в случае нуклеотида 8-охо-dG гетероцикл находится в *syn*-конфигурации относительно гликозидной связи, в активном центре hOGG1 он связывается в *anti*-конформации, т.е. так, как это должно быть в нормальном ДНК-дуплексе. Вывернутая конфор-

мация гликозильного остатка и остова ДНК приводит к тому, что остаток 8-охоG располагается далеко от спирали ДНК и погружается глубоко в область активного центра hOGG1.

Взаимодействие hOGG1 с фосфатными группами 8-охоG-содержащей цепи, самим остатком 8-охоG и комплементарным ему цитозином создает суммарную площадь контакта 2.268 \AA^2 [36]. В то время как у большинства ДНК-связывающих белков в области контакта находится много остатков лизина и аргинина, для взаимодействия с фосфатными группами hOGG1 связывает остов ДНК в почти нейтрально заряженный канал (рис. 3), в котором расположен один основной остаток His270. Уникальная особенность образующегося комплекса состоит в наличии в hOGG1 большого числа α -спиралей, у которых N-концы ориентированы в сторону ДНК (рис. 2). Такое расположение α -спиралей усиливает спираль-дипольное взаимодействие, делая более вероятным создание дипольных электростатических контактов, а не солевых мостиков при связывании

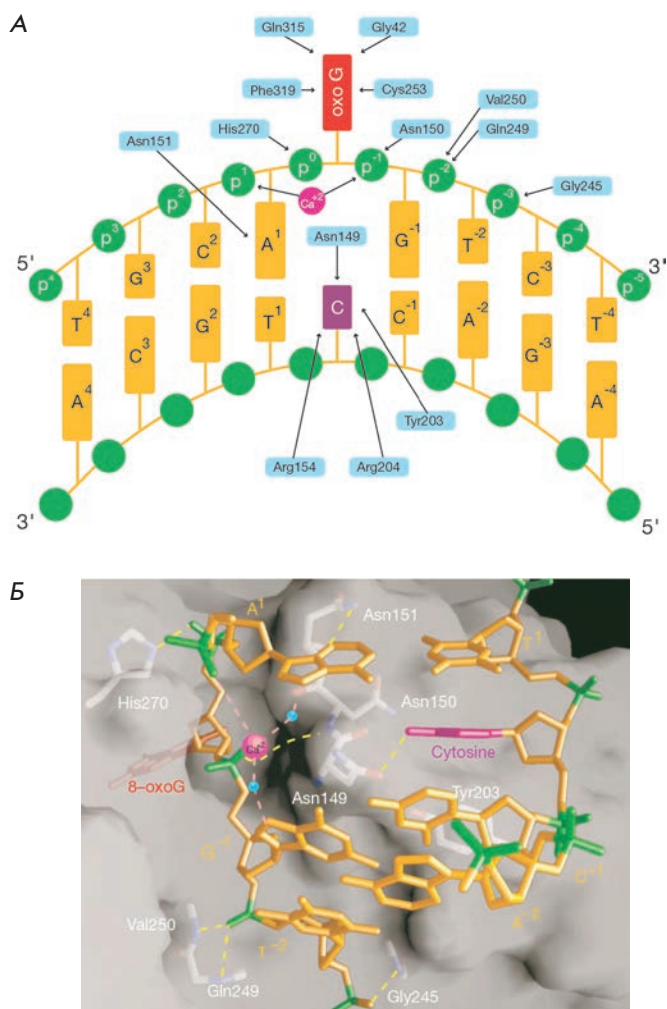


Рис. 3. Схема взаимодействия оснований ДНК с аминокислотными остатками hOGG1. А – дуплекс, содержащий пару 8-охоG/C и взаимодействующие с ним аминокислоты. Б – поверхность взаимодействия ДНК-дуплекса и фермента hOGG1. Водородные связи показаны желтым пунктиром, координационные связи иона кальция с молекулами воды – розовым. (Приведено с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nature] Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Nature. 2000. V. 403. P. 859–866, copyright 2000)

ДНК-субстратов. Только одна из спиралей фермента, αL , действительно контактирует с остовом ДНК. Спираль αL с петлей и спиралью αK образуют консервативный элемент NhH. В дополнение к контакту с фосфатом, который создается спиралью αL и фосфатной группой p^{-2} (Val250 и Gln249), высококонсервативный остаток глицина (Gly245), расположенный в петле, образует водородную связь с фосфатом p^{-3} (см. рис. 3). Структурный элемент NhH образует контакт с ДНК-субстратом с 3'-стороны от повреждения;

в этом месте структура ДНК-дуплекса почти не отличается от В-формы. Следовательно, элемент NhH, главным образом, вовлечен в позиционирование дуплекса для ориентации повреждения в сторону кармана активного центра.

Взаимодействие фосфатных групп p^{-1} , p^0 и p^1 очень важно для стабилизации нестандартной конформации ДНК-остова в месте расположения повреждения. Вращения вокруг связей, которые необходимы для выворачивания остатка 8-охоG из спирали, вызывают поворот атомов кислорода при фосфате p^{-1} внутрь по направлению к оси спирали, вносят дополнительное напряжение в рибозофосфатный остов ДНК. Чтобы ослабить электростатическое отталкивание, вызванное близким расположением фосфатов p^{-1} и p^1 , между ними размещается присутствующий в кристаллизационной среде частично гидратированный ион Ca^{2+} , который координируется напрямую с p^1 и через мостиковую воду – с p^{-1} (рис. 3Б). Хотя ион Ca^{2+} , который может замещаться ионом Mg^{2+} в физиологических условиях, непосредственно не взаимодействует с белком, однако его лиганд, молекула воды, образует водородную связь с ДНК, стабилизируя тем самым ее вывернутую и изогнутую конформацию.

Комплементарный цитозин находится внутри спирали, однако он практически не образует стэкинга с соседними основаниями с 5'-стороны из-за изгиба в этом месте цепи ДНК, которое вызывает разворачивание дуплекса в сторону от молекулы фермента. За пределами активного центра конформация ДНК близка к канонической В-форме (рис. 2).

Область дуплекса, высвобождаемая после выворачивания остатка 8-охоG, заполняется аминокислотными остатками консервативного NNN-элемента (последовательность из трех расположенных подряд остатков аспарагина), а именно, остатком Asn149, который образует водородную связь между амидным карбонилем бокового заместителя и экзоциклической аминогруппой остатка цитозина комплементарной цепи (рис. 3Б). Кроме того, hOGG1 погружает арильное кольцо остатка Tyr203 в пространство между C^0 (комплементарным цитозином) и основанием с 5'-стороны (рис. 3Б), тем самым ликвидируя стэкинг двух оснований и образуя острый излом в спирали ДНК, что существенно улучшает доступ со стороны малой бороздки к той части основания, которое участвует в уотсон-криковском взаимодействии. Основание C^0 также теряет стэкинг с 3'-стороны с соседним основанием (см. на рис. 3Б основание T^1). Аминокислотные остатки Arg154 и Arg204 hOGG1 перемещаются в сторону C^0 со стороны малой бороздки; один аргинин располагается сверху, а другой снизу плоскости пиримидинового кольца, и одновременно образуются

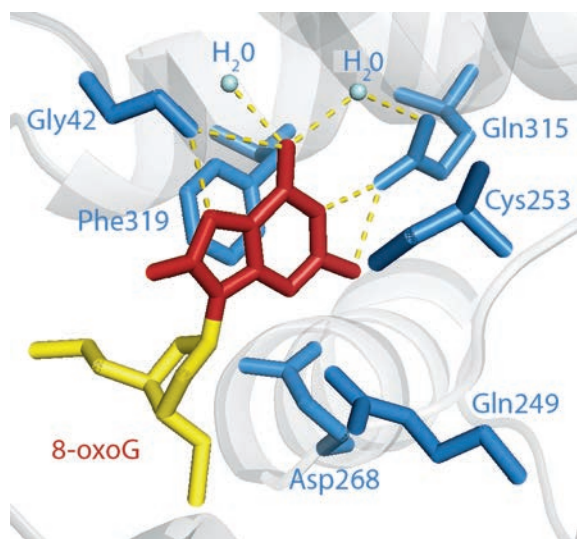


Рис. 4. Аминокислоты активного центра hOGG1, участвующие в узнавании основания 8-охоG. Визуализация PDB-файла 1EBM [36] с помощью программного пакета PyMOL [43]

водородные связи с акцепторными атомами N3 и O2 цитозина C⁰. Эти взаимодействия, по-видимому, исключительно сильные, они требуют присутствия соседних акцепторных атомов, что является уникальным для цитозина в сравнении с другими гетероциклическими основаниями в ДНК. Следовательно, вместе с взаимодействием между Asn149 и амидным карбонилем цитозина C⁰ между ферментом и комплементарным остатком цитозина может образоваться до пяти водородных связей.

Роль остатка Asn149 подтверждена в работе [42], в которой показано, что остаток Asn149 образует водородную связь с атомом N4 экзоциклической аминогруппы остатка цитозина, комплементарного 8-охоG. В комплексе с водородными связями, образованными гуанидиниевой группой остатка Arg204 с атомами N1 и O2, это обеспечивает уникальный узнающий фрагмент для комплементарного цитозина и играет, по-видимому, главную роль в обеспечении специфичности по отношению к остатку цитозина в комплементарной цепи, которая характерна для hOGG1.

Узнавание 8-охоG в активном центре происходит путем формирования специфических контактов между поврежденным основанием и аминокислотными остатками белка. Фермент узнает уреидный фрагмент 8-охоG, включающий C8-карбонильную группу, атомы N7 и N9. При этом атом N7 образует водородную связь с карбонилем остатка Gly42. Среди

всех контактов 8-охоG имеется только одно взаимодействие с остатком Gly42, которого нет у гуанина. Поэтому в работе [36] делается вывод о том, что ответственность за дискриминацию 8-охоG от G несет только одна водородная связь. Необходимо отметить, что критически значимая аминокислота Gly42 помещается в β -складчатом домене, расположенном в области контакта hOGG1-ДНК.

Кроме упомянутых выше, в узнавании 8-охоG участвуют также другие аминокислоты активного центра hOGG1. Остатки Phe319 и Cys253 взаимодействуют с π -системой 8-охоG с двух противоположных сторон, образуя структуру сэндвича (рис. 4). Амидная NH₂-группа остатка Gln315 через прочно связанную в активном центре молекулу воды взаимодействует с атомом O6 основания 8-охоG, а боковая карбонильная группа остатка Gln315 образует две водородные связи с атомами N1 и N2 8-оксогуанина. Вторая прочно связанная молекула воды также образует водородную связь с атомом O6. Взаимодействие остатков Gln315 и Gly42, а также связанных в активном центре молекул воды, по своим характеристикам не позволяет образовывать донорно-акцепторные водородные связи с A, C и T.

Анализ структурных данных [36] позволяет глубже понять роль каталитически важных аминокислотных остатков Lys249 и Asp268. Остаток Lys249 находится на расстоянии ~ 2.5 Å от атома C1' 8-охоG вблизи от места в активном центре, в которое выворачивается окисленное основание; а остаток Asp268 ориентирован подходящим образом для того, чтобы проводить протонирование/депротонирование Lys249. Интермедиат, образовавшийся при атаке дезоксирибозы остатком Lys249, перегруппировывается в основание Шиффа (рис. 1). Эта перегруппировка требует депротонирования боковой аминогруппы остатка Lys249, возможно, с помощью Asp268, и протонирования атома O1', для чего подходящим образом ориентирован остаток His270. Такая роль остатка His270 хорошо объясняет его инвариантность среди членов суперсемейства HhH-GPD, поскольку он необходим для катализа стадии образования основания Шиффа.

КОМПЛЕКС КАТАЛИТИЧЕСКИ АКТИВНОГО hOGG1 СО «СТОП»-СУБСТРАТОМ

Изучена структура комплекса hOGG1 с ДНК, содержащей вместо 8-охоG остаток 2-оксиметил-3-окситетрагидрофурана (F) [33]. Такой фрагмент ДНК служит «стоп»-субстратом для hOGG1. Показано [33], что в полученной структуре (PDB ID: 1FN7) Asp268 расположен достаточно далеко от Lys249, чтобы активировать депротонирование его боковой аминогруппы; расстояние N–O равно 3.7 Å. Более того,

остаток Asp268 не имеет контакта с His270, который, по-видимому, нужен для образования водородной связи с атомом O1' рибозы, обнаруженной в структуре K249Q hOGG1 [36]. Таким образом, отсутствие окисленного основания ДНК, выворачиваемого из цепи и помещаемого в карман активного центра, привело к изменению структуры фермента.

Основываясь на полученных данных, в работе [33] был сделан вывод, что, во-первых, 8-охоG-узнающий карман hOGG1 хорошо подогнан под структуру поврежденного основания, позиционируя нужным образом остатки Phe319, His270 и Asp268. Во-вторых, в данной работе роль остатка Asp268, действующего как депротонирующее Lys249 основание, не подтверждена и не опровергнута. Высказана гипотеза, что этот остаток создает электростатическое поле, стабилизирующее положительный заряд, возникающий на стадии переходного состояния на атомах O1' и C1' дезоксирибозы 8-охоG.

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ hOGG1 ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ДНК

Кристаллическая структура свободного фермента hOGG1 и его комплекса с 8-охоG-содержащей ДНК, получены в работе Bjørås M. и соавт. [35] с разрешением 2.15 Å. В составе комплекса с ДНК так же, как и в работе [36], использовали каталитически неактивный мутант K249Q. Согласно данным [35], структура hOGG1 существенно различается у свободной формы и связанной в комплексе с 8-охоG-содержащей ДНК (рис. 5). В узнавании поврежденного основания принимают участие остатки Phe319, Cys253, Gly42, Gln43, Phe45 и Gln315, что согласуется с данными [36]. Остатки Phe319 и Cys253 располагаются с противоположных сторон от плоскости 8-охоG, тогда как остатки Gly42, Gln43, Phe45 взаимодействуют с краем большой бороздки, узнавая протонированный атом N7 8-охоG. Амидный атом кислорода Gln315 образует водородные связи с N1-имино- и N2-аминогруппами кольца, участвующего в спаривании оснований. Остаток Phe319 принимает различные конформации в свободной и связанной с ДНК форме hOGG1 (рис. 5A). В комплексе с ДНК ароматическое кольцо остатка Phe319 располагается почти перпендикулярно той ориентации, которая была у него в свободной форме. У остатка Gln315 в свободном ферменте боковая цепь располагается под ароматическим кольцом остатка Phe319 (рис. 5A). В связанном с ДНК состоянии амидный атом азота этого остатка вовлекается в образование системы водородных связей, в которой участвует также карбонильный атом кислорода остатка Pro266, располагающийся с другой стороны от кольца 8-охоG. В результате конформация фермента существенно

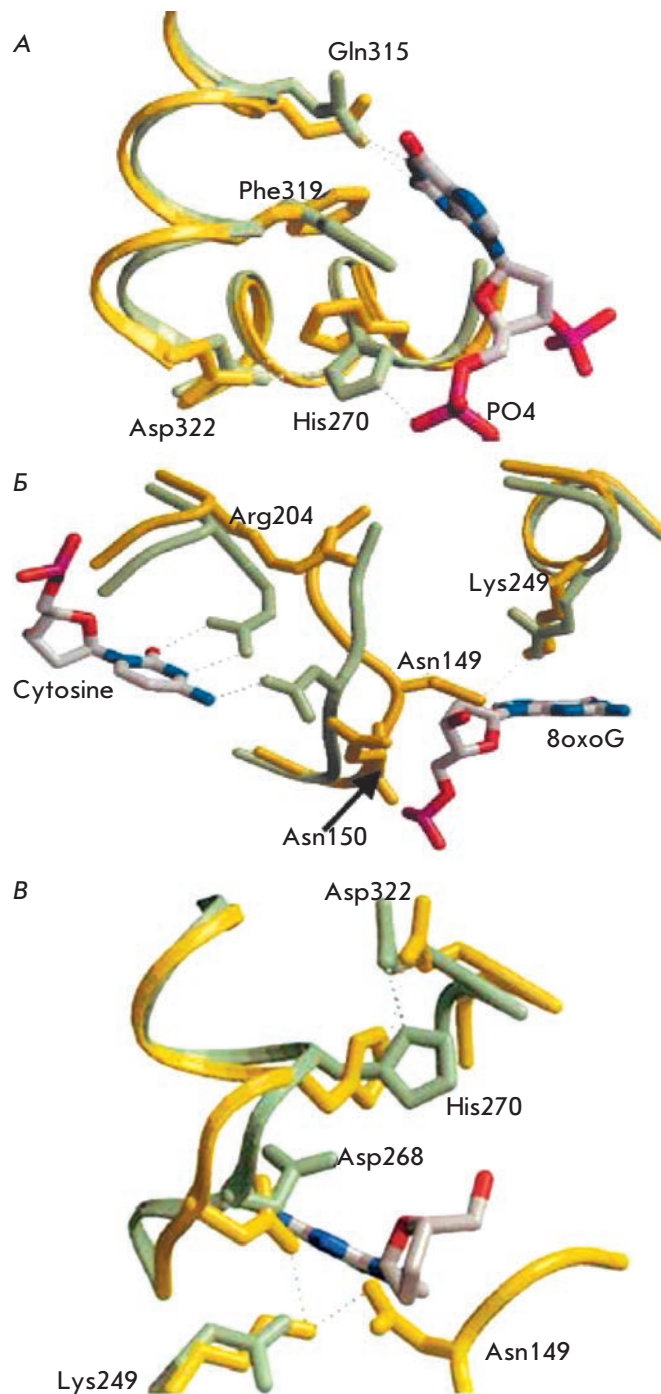


Рис. 5. Узнавание основания 8-охоG hOGG1 (желтым цветом обозначен свободный фермент, а светло-зеленым – связанный с ДНК). А – конформация остатка His270 в свободной и связанной с ДНК структурах. Участие остатков Gln315, Phe319 и Asp322 в образовании кармана для связывания 8-охоG. Б – участие остатка Asn149 в узнавании и связывании комплементарного цитозина. В – конформационные изменения остатков Asp268 и His270 в процессе связывания 8-охоG. (Приведено с разрешения Elsevier Science Ltd.: [J. Mol. Biol.] Bjørås M., Seeberg E., Luna L., Pearl L.H., Barrett T.E. J. Mol. Biol. 2002. V. 317. P. 171–177, copyright 2002)

меняется, создавая тесный карман для связывания поврежденного основания 8-охоG.

В данной работе [35] несколько иначе была интерпретирована роль остатка His270. Установлено, что конформационные изменения фермента в области кармана, связывающего гетероциклическое основание, сопровождаются изменением ориентации His270, который образует две водородные связи в комплексе с ДНК: одну – между атомом азота N2 имидазольного кольца с 5'-фосфатной группой 8-охоG, вторую – между атомом азота N1 и карбоксильной группой остатка Asp322 (рис. 5А). В свободном ферменте, хотя и сохраняется одна водородная связь с Asp322, имидазольное кольцо остатка His270 отклоняется более чем на 90° по сравнению со связанной с ДНК конформацией; встраивается напротив фенильного кольца остатка Phe319 и образует два слоя сэндвича, закрытого остатком Gln315. Такое вращение остатка His270 несовместимо с конформациями остатков Phe319 и Gln315, которые необходимы для специфического связывания 8-охоG в комплексе с ДНК. Конформации боковых заместителей остатков Phe319 и Gln315 определяются конформацией остатка His270, которая сама в комплексе с 8-охоG-ДНК определяется взаимодействием с 5'-фосфатной группой 8-охоG-нуклеотида. Таким образом, связывание с hOGG1 рибозофосфатного остова ДНК определяет конформацию остатка His270, который, в свою очередь, вызывает конформационные изменения в остатках Phe319 и Gln315, что позволяет окисленному основанию связаться в специфическом кармане.

Следовательно, боковые цепи заместителей в остатках Phe319, Gln315 и His270 действуют как единое целое, переключаясь между закрытым и открытым состояниями при связывании 8-охоG-нуклеотида.

В свободном ферменте область аминокислотных остатков 146–151 принимает конформацию, отличную от конформации в комплексе с ДНК; сдвиг соответствующих атомов достигает 4–9 Å в связанной с ДНК структуре. Наиболее существенные изменения происходят в центре этого сегмента, где боковая цепь остатка Asn149 в свободном ферменте направлена назад в сторону фермента и образует водородные связи между амидным атомом кислорода и ε-аминогруппой каталитического остатка Lys249 (рис. 5Б). Однако при образовании комплекса с 8-охоG-ДНК этот атом кислорода перемещается на ≈ 9 Å, чтобы осуществить взаимодействие с удаленным остатком цитозина. Остальные остатки аспарагина в триplete NNN, 150 и 151, чьи водородные связи в комплексе с ДНК стабилизируют цитозинузнающий фрагмент белка, в свободном ферменте направлены в раствор. Кон-

формация этого внутриспирального пептида в свободном ферменте не подходит для связывания 8-охоG в экстраспиральной конформации. Как встраивание сегмента белка в ДНК, так и встраивание в белок вырезаемого нуклеотида требуют сопутствующих этим процессам перестроек структуры белка.

Одно из важных последствий реориентации остатка His270 в комплексе фермента hOGG1 с 8-охоG-ДНК – небольшое перемещение участка спирали и цепи между остатками Pro266 и Trp272, которое сдвигает боковую цепь остатка Asp268 на расстояние более 1.5 Å по сравнению с ее расположением в свободном ферменте (рис. 5В).

В структуре комплекса hOGG1 с ДНК, содержащей F-лиганд [33], остаток Lys249 удален от карбоксильной группы Asp268, что делает сомнительным предположение о ее роли в депротонировании нуклеофила и тем самым указывает на альтернативную функцию этого остатка в стабилизации заряженного переходного состояния дезоксирибозного кольца. Кроме того, в ДНК-связанной структуре карбоксильная группа Asp268 и имидазольная группа His270 достаточно сближены и могут образовать слабую водородную связь, которая также способна облегчать отрыв протона с помощью Asp268, обеспечивая тем самым ее косвенное участие в катализе. С другой стороны, в структуре свободного hOGG1 боковые цепи остатков Asp268 и His270 удалены на расстояние >4 Å и расположены совершенно неоптимально для образования между ними водородной связи (рис. 5В). В противоположность этому боковые цепи остатков Lys249 и Asp268 расположены оптимально для образования водородной связи между ε-амино- и карбоксильными группами соответственно и дополнительной водородной связи между ε-аминогруппой Lys249 и атомом кислорода бокового заместителя в остатке Asn149 (рис. 5В). Конфигурация боковой цепи остатка Lys249 в активном центре соответствует протонированной форме ε-аминогруппы, стабилизированной нейтральной водородной связью с атомом кислорода амидной группы остатка Asn149 и водородной связью с депротонированным карбоксилем боковой цепи остатка Asp268.

В соответствии с механизмом катализа, предложенном для OGG1 [29–31], остаток Lys249 осуществляет нуклеофильную атаку по атому углерода C1' дезоксирибозного кольца, замещая основание 8-охоG и образуя ковалентный интермедиат – основание Шиффа [39]. Протонированная боковая группа остатка Lys249 в свободном ферменте не способна осуществить такую функцию, которая требует присутствия неподеленной пары электронов, как в нейтральной ε-NH₂. Поэтому остаток Lys249 должен быть депротонирован для того, чтобы могла пройти эта реакция.

Это возможно лишь в том случае, если взаимодействие с остатком Asp268, стабилизирующее протонированное состояние остатка Lys249, исчезает при связывании с субстратом.

Согласно [35], связывание с нуклеозидом 8-охо-dG способствует изменению положения остатка Asp268 (через перемещение остатков Phe319 и Phe270), что приводит к разрыву его ион-парной/водородной связи с остатком Lys249. Параллельно, для того, чтобы осуществить взаимодействие фермента с остатком цитозина комплементарной цепи, происходит выворачивание межспиральной петли и разрыв водородной связи между остатком Lys249 и боковой карбоксильной группой остатка Asn149. Вследствие исчезновения этих нейтрализующих взаимодействий существование протонированной формы ϵ -аминогруппы остатка Lys249 должно быть невыгодным по сравнению с нейтральной формой, образующейся в результате отрыва протона карбоксильной группой остатка Asp268 одновременно с его перемещением и исчезновением водородной связи с остатком Lys249.

Таким образом, сделан вывод [35], что водородные связи, образованные остатками Asp268 и Asn149 с протонированным атомом азота ϵ -аминогруппы остатка Lys249, служат триггерными замками в свободном ферменте; одна водородная связь связана с узнаванием 8-охоG, другая – цитозина, и обе должны исчезнуть для того, чтобы фермент был готов к нуклеофильной атаке по атому C1' дезоксирибозы ДНК.

РОЛЬ ОСТАТКА Asp268 В КАТАЛИТИЧЕСКОМ МЕХАНИЗМЕ hOGG1

Остаток Asp268 каталитически важен как для hOGG1, так и для всего структурного семейства, к которому принадлежит этот белок [26, 44]. Замена остатка Asp268 на Ala или Asp приводят к потере гликозилазной и AP-лиазной активностей, однако ДНК-связывающая активность почти не меняется.

Достаточно давно было высказано предположение, что Asp268 может сопровождать вырезание основания путем депротонирования остатка Lys249, тем самым превращая нереакционноспособную катионную форму в нуклеофильный нейтральный амин [36]. Однако против такой его роли свидетельствует факт, что остаток Asp, находящийся на конце α -спирали белка, должен быть менее основным на несколько порядков величины; стабильное положение должно полностью препятствовать вращению Asp268 вокруг связи C ^{α} –C ^{β} для осуществления взаимодействия с Lys249. В кристаллической структуре фермента дикого типа в комплексе с AP-ДНК [33] показано, что взаимодействие между остатками

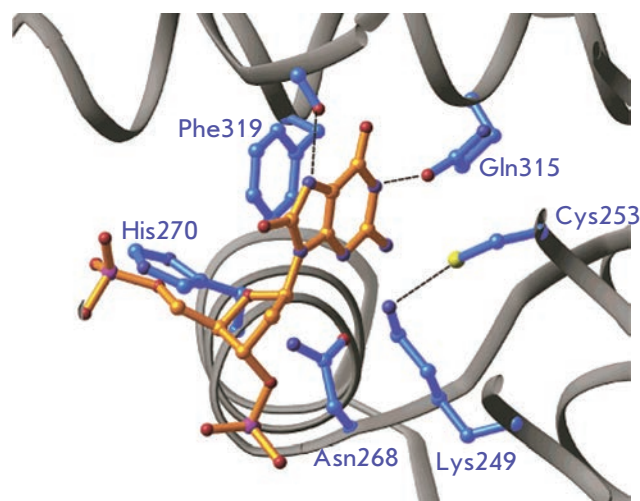


Рис. 6. Структура активного центра мутанта hOGG1 D268N в составе комплекса с ДНК-дуплексом, содержащим 8-охоG. Визуализация PDB-файла 1N3C [38] (Приведено с разрешения American Chemical Society: [Biochemistry] Norman D.P.G., Chung S.J., Verdine G.L. Biochemistry. 2003. V. 42. P. 1564–1572, copyright 2003)

Asp268 и Lys249 отсутствует. Действительно, только в структуре свободного белка эти два остатка были связаны водородной связью, при этом остаток Asp268 сохраняет свое положение в α -спирали, а остаток Lys249 разворачивается, как на шарнире, чтобы обеспечить с ним контакт [35]. Важно то, что даже при ослабленном взаимодействии между остатками Glu268 и Lys249 (в мутантном белке с заменой D268E) и более длинной боковой цепи боковая цепь остатка Glu268 не взаимодействует с остатком Lys249. Можно предположить, что если за счет микроокружения рK_a остатка Lys249 понижается даже ненамного, то при этом получается некоторое количество нейтрального амина; этого может быть достаточно, чтобы вызвать разрезание гликозидной связи и удаление основания.

Для проверки участия остатка Asp268 в химических реакциях, катализируемых hOGG1, этот остаток заменяли на остатки аспарагина (D268N), глутамата (D268E) и глутамина (D268Q) [38]. Показано, что остаток Asp268, расположенный на N-конце α -спирали (рис. 6), выполняет двойственную функцию, катализируя протекание стадий удаления основания и разрыва цепи. Замена этого аминокислотного остатка на аспарагин приводила к сильному снижению ферментативной активности у hOGG1 с D268N. В кристаллической структуре этого мутанта впервые показано участие нуклеофильного остатка лизина

(Lys249) в узнавании поврежденного остатка G (8-охоG или F).

Анализ этой структуры позволил предположить, что удаление основания 8-охоG происходит через разрыв гликозидной связи и лишь последующее присоединение остатка Lys249 с образованием основания Шиффа между ϵ -NH₂-группой и C1'-атомом дезоксирибозы. С другой стороны, замены аспартата на глутамин (D268Q hOGG1) и глутамат (D268E hOGG1), хотя и дестабилизировали структуру (укладку) белка, но не приводили к потере каталитической активности.

Установлено [38], что структуры комплексов с ДНК у мутантных по остатку Asp268 форм hOGG1 близки к определенной ранее структуре комплекса мутанта с заменой K249Q [36]. Величина среднеквадратичного отклонения координат для структур белковых остовов мутантов hOGG1 D268N и K249Q составляет 0.32 Å, что с уверенностью позволяет говорить об идентичности структур. Если сравнивать структуры фермента дикого типа и мутанта hOGG1 D268E, связанного с F-аналогом, то величина среднеквадратичного отклонения составляет 0.45 Å и 0.59 Å для структур WT hOGG1/F и hOGG1 D268Q/F соответственно. Это свидетельствует о том, что в результате замены аминокислот активного центра в этих мутантах не происходит глобальных структурных перестроек. Во всех трех структурах единственные серьезные перестройки происходили в области активного центра, а именно, в положении первых трех аминокислот α -M-спирали (остатки 269, 270 и 271). Во всех трех структурах нуклеофильная ϵ -NH₂-группа остатка Lys249 имеет примерно фиксированное положение в кристалле, хотя она и находится на конце длинной алкильной цепи. В этой структуре ϵ -NH₂-группа остатка Lys249 расположена вблизи атома C1' дезоксирибозы (3.4 Å), однако не на траектории, подходящей для прямой нуклеофильной атаки по гликозидной связи (рис. 6). По этим данным ϵ -аминогруппа остатка Lys249, по-видимому, образует водородную связь с сульфгидрильной группой аминокислоты Cys253, которая, наоборот, находится на ван-дер-ваальсовском расстоянии от π -системы основания 8-охоG. Из-за того, что остаток Cys253 расположен над верхней поверхностью рибозы, остаток Lys249 не может осуществить контакт с остатком Cys253 при атаке сахара с нижней стороны. В то время как в ферменте дикого типа карбоксильный кислород остатка Asp268 образует водородную связь с боковой цепью остатка His270, в мутанте D268N NH₂-амидная группа остатка Asn268 расположена слишком далеко от остатка His270 для образования водородной связи. Отсутствие такого взаимодействия позволяет объяснить сравнительно слабое связывание ДНК с му-

тантом D268N, поскольку остаток His270 напрямую взаимодействует с фосфатным остовом с 5'-стороны от повреждения. Остальная часть активного центра и узнающего основание кармана в структурах мутантных hOGG1 с заменами D268N и K249Q, связанных с 8-охоG-содержащей ДНК, идентична.

Альтернативное предположение о роли остатка Asp268 – это электростатическая стабилизация с помощью остатка Asp268 положительного заряда на атоме O4' в переходном состоянии дезоксирибозы в реакции удаления основания [33]. С этой точкой зрения согласуется тот факт, что во всех структурах hOGG1, имеющих в положении 268 остаток Asp, карбоксильный атом кислорода располагается вблизи атома O4' сахарофосфатного остова ДНК, примерно на расстоянии 3.2 Å. Вследствие сильного взаимодействия с собственной α -спиралью ориентация боковой цепи Asn268 в мутантной форме D268N почти такая же, как и у остатка Asp268 в ферменте дикого типа. Следовательно, замещение остатком Asn положения 268 приводит к замене отрицательно заряженного атома кислорода на нейтральную NH₂-группу с тем же расположением в активном центре. Расстояние между амидным азотом остатка Asn268 и атомом O4' дезоксирибозного кольца (3.4 Å) больше, чем можно было ожидать при наличии водородной связи между этими атомами, однако этого достаточно, чтобы атом O4' отчасти испытывал влияние положительного электростатического поля амидных протонов остатка Asn268. Поэтому полагают [33], что замена заряда на противоположный знак от Asp (δ^-) на Asn (δ^+) в положении 268 способствует повышению энергии переходного состояния в реакции удаления основания вследствие увеличения положительного заряда на O4', что приводит к значительному уменьшению скорости этой реакции.

Таким образом, показано [38], что форма hOGG1, содержащая вместо остатка аспартата Asp268 аспарагин (D268N), абсолютно неактивна. Аминокислотные замены D268Q или D268E, хотя и приводили к менее выгодной конформации фермента, но не снижали каталитическую активность. Полученные данные опровергают высказанное ранее [36] предположение о роли остатка Asp268 как кислотного/основного катализатора hOGG1, однако они подтверждают его участие в формировании заряда на атоме O4' дезоксирибозы при 8-охоG в ходе стадии вырезания основания.

МЕХАНИЗМ УЗНАВАНИЯ ПОВРЕЖДЕННОГО ОСНОВАНИЯ 8-охоG

Структура гетероциклических оснований 8-охоG и G отличается только по двум положениям: атом C8 связан с атомами O или H, N7 содержит атом H

или неподеленную пару электронов соответственно. По этой причине атом Н при атоме N7 в 8-охоG имеет возможность образовывать водородную связь с карбонилем основной цепи остатка Gly42, тогда как у G такой возможности нет. Для того чтобы детальнее разобраться в структурных особенностях взаимодействия фермента hOGG1 с окисленным основанием 8-охоG и неповрежденным G, изучали взаимодействие с ДНК-субстратами мутантной формы hOGG1 N149C, у которого полностью отсутствует каталитическая активность [37]. Остаток Cys149 через дисульфидную связь соединяли линкером с атомом C4 в остатке цитозина, комплементарного 8-охоG. Это позволяло ограничить возможность диссоциации белка из комплекса с ДНК. Получены кристаллические структуры комплексов N149C hOGG1 с 8-охоG-, G- и 7-деза-G-содержащими ДНК-дуплексами.

Обнаружено, что в комплексах hOGG1 с 8-охоG- и G-содержащими ДНК изгиб спирали ДНК в месте выворачивания нуклеотида составляет $\sim 70^\circ$ и $\sim 80^\circ$ соответственно. Основание 8-охоG при этом погружено глубоко в узнающий повреждение карман фермента, а G выталкивается из этого кармана и лежит на поверхности фермента в «экзосайте», расположенном на расстоянии примерно 5 \AA от кармана фермента (рис. 7А,Б). Основание G взаимодействует с двумя остатками активного центра Phe319 и His270, но эти контакты отличаются от тех, что имеют место в случае 8-охоG. В комплексе с 8-охоG-субстратом остаток His270 не контактирует с этим основанием, а образует водородную связь с его 5'-фосфатом. В комплексе с G-содержащей ДНК His270 взаимодействует с π -системой основания, но не образует водородной связи с фосфатом.

Оценка свободной энергии взаимодействия остатков 8-охоG и G с активным центром фермента hOGG1 (ΔA_1 и ΔA_2 соответственно), проведенная в [37] с использованием компьютерного моделирования по методу квантовой механики/молекулярной механики, показала, что свободная энергия дискриминации поврежденного основания $\Delta\Delta A = \Delta A_1 - \Delta A_2$ равна -6.8 ккал/моль, что соответствует 10^5 -кратному предпочтительному связыванию в активном центре остатка 8-охоG по сравнению с G.

Водородная связь, образующаяся между карбонильным атомом кислорода остатка Gly42 и протоном при атоме N7 в 8-охоG, сильно стабилизирует структуру комплекса. В случае G – вместо нее будет кулоновское отталкивание между карбонилем остатка Gly42 и неподеленной парой электронов атома N7, если остатки G и Gly42 будут занимать в комплексе те же положения, что и в комплексе с 8-охоG.

Данная работа [37] позволяет глубже понять механизм узнавания поврежденного основания. Выворачивание основания из цепи ДНК не может происходить в ходе одной стадии как согласованный процесс. Скорее всего, он протекает через образование серии дискретных состояний. Этот вывод основан на том, что комплекс фермента hOGG1 с G-субстратом может имитировать интермедиат, образующийся с 8-охоG-субстратом, непосредственно перед выворачиванием основания в карман активного центра. Многостадийный характер механизма узнавания повреждения в ДНК ферментом hOGG1 доказан также в исследованиях динамики конформационных переходов путем регистрации флуоресценции остатков Trp в белке и 2-аминопурина в ДНК [45, 46].

Сравнение конформаций комплексов фермента с G- и 8-охоG-содержащей ДНК позволяет понять, что происходит на последней стадии выворачивания основания. Со стороны 3'-конца (слева) от данного нуклеотида структуры комплексов очень похожи. В них сохраняется контакт за счет водородных связей со структурой HhH, содержащей остатки Gly245, Gln249 и Val250, а также сохраняется электростатическое взаимодействие с ионом двухвалентного металла (рис. 7А). Единственным исключением является состояние 3'-фосфата внеспирального нуклеотида, который образует водородную связь с остатком Lys249 в G-комплексе; тогда как в комплексе, содержащем 8-охоG, остаток Lys249 не может участвовать во взаимодействии с 3'-фосфатом, а должен быть повернут в сторону активного центра для того, чтобы принять участие в каталитической стадии. Предполагается [37], что контакты с 3'-стороны от повреждения, возможно, даже контакт 3'-фосфата ДНК с остатком Lys249, устанавливаются раньше, чем фактически произойдет выворачивание поврежденного основания. С 5'-стороны от внеспирального нуклеотида конформации спирали различаются для G- и 8-охоG-структур. Следовательно, в комплексе с G-ДНК имеет более выраженный изгиб спирали ($\sim 80^\circ$ по сравнению с $\sim 70^\circ$); дуплекс с 5'-стороны также сильнее повернут, примерно на $\sim 20^\circ$ вокруг оси спирали (рис. 7Б). Эта разница возникает из-за потери водородных связей, образованных между 3'- и 5'-фосфатами и NH-группой основной цепи остатка Asn150 и NH-группой боковой цепи остатка His270 в комплексе с 8-охоG-содержащей ДНК. Двухвалентный катион Ca^{2+} , который координирует 3'-фосфат и стабилизирует изгиб за счет внутри- и внешнесферных контактов с внеспиральным нуклеотидом, в G-комплексе также отсутствует (рис. 7А). Эти контакты устанавливаются в 8-охоG-комплексе только после выворачивания поврежденного нуклеотида в узнающий карман фермента.

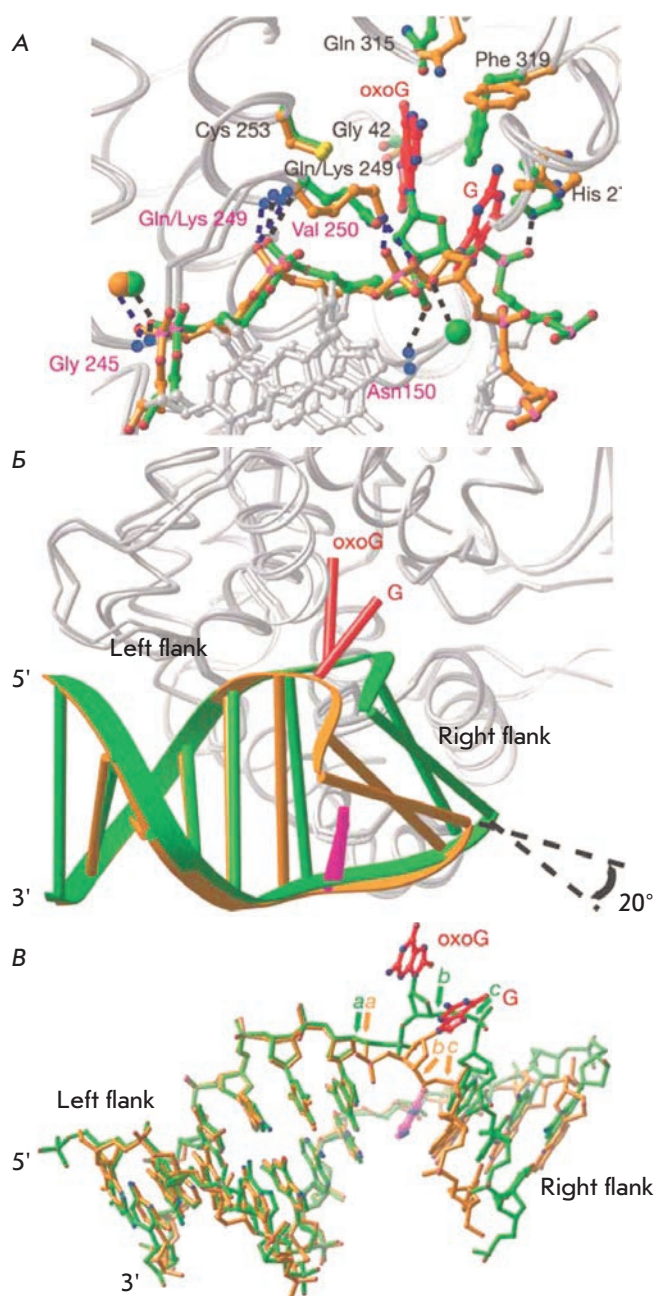


Рис. 7. Наложение структур N149C hOGG1 с ДНК-дуплексом, содержащим либо 8-охоG (зеленый цвет), либо G (желтый цвет). А – расположение остатков активного центра фермента при взаимодействии с основаниями 8-охоG и G. Б – изменение структуры ДНК-дуплекса в зависимости от связывания поврежденного и неповрежденного оснований. В – изменение геометрических параметров ДНК в области связывания с ферментом. Желтыми и зелеными стрелками обозначены валентные связи, претерпевающие существенное вращение: $+110^\circ$ (стрелка а) для связи C4'–C5' с 3'-конца от 8-охоG, $+119^\circ$ (стрелка б) для связи C4'–C5' 8-охоG, -151° (стрелка с) для связи P–O5'. (Приведено с разрешения Macmillan Publishers Ltd.: [Nature] Banerjee A., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. Nature. 2005. V. 434. P. 612–618, copyright 2005)

С учетом прогресса в понимании структурных основ высокой специфичности фермента по отношению к поврежденному основанию остается непонятным, как фермент hOGG1 узнает 8-охоG внутри ДНК-спирали. Согласно [47], решение этого вопроса заключается в идентификации вариантов hOGG1, способных узнавать внутриспиральное поврежденное основание, но значительно снижать способность связывания внеспирального повреждения.

В работе [47] был проведен анализ структуры форм hOGG1, содержащих замены аминокислот, участвующих в формировании контактов с 8-охоG. Как и в предыдущих работах [37], авторы использовали технологию межмолекулярных дисульфидных швов для ковалентного связывания остатков цистеина в hOGG1 с атомом C4 цитозина, комплементарного окисленному гуанину. Показано, что мутации по остатку His270, который образует контакт с 5'-фосфатом (форма hOGG1 H270A), по остатку глутамина Gln315, взаимодействующему с внешней поверхностью двухцепочечной ДНК (форма hOGG1 Q315A), не влияют на структуру фермента, но лишают его функциональности.

С другой стороны, замена остатка Gly42, формирующего специфический, показанный ранее [36] контакт с 8-охоG, на остаток аланина (форма hOGG1 G42A) приводит к появлению препятствия для связывания 8-охоG в области контактной поверхности между ДНК и hOGG1. Как уже отмечалось выше, Gly42 – единственная аминокислота в hOGG1, которая непосредственно «оценивает» структурную разницу между G и 8-охоG: атом N7 8-охоG образует водородную связь с карбонильным кислородом остатка Gly42 [37]. Замена атома водорода при C_α-атоме остатка Gly42 гораздо более объемной метильной группой аланина (форма hOGG1 G42A) вносит существенные стерические затруднения при связывании 8-охоG в активном центре фермента (рис. 8А); такое связывание вызывает конформационные реорганизации в структуре аминокислотной последовательности hOGG1.

При введении аминокислотной замены Q315F, которая стерически препятствовала связыванию 8-охоG в кармане активного центра, получены две структуры: Q315F*149 и Q315F*292, в которых цитозин комплементарной цепи был ковалентно связан с остатками цистеина 149 и 292 соответственно. Белок hOGG1 Q315F*149 действительно не связывал остаток 8-охоG в кармане активного центра, а только в экзосайте (рис. 8Б). Однако мутант Q315F*292 позволял остатку 8-охоG почти полностью погружаться в узнающий карман, так что могли образоваться водородные связи между остатком Gly42 и 8-охоG N7-H (рис. 8В). Авторы данной работы полагают, что в этой

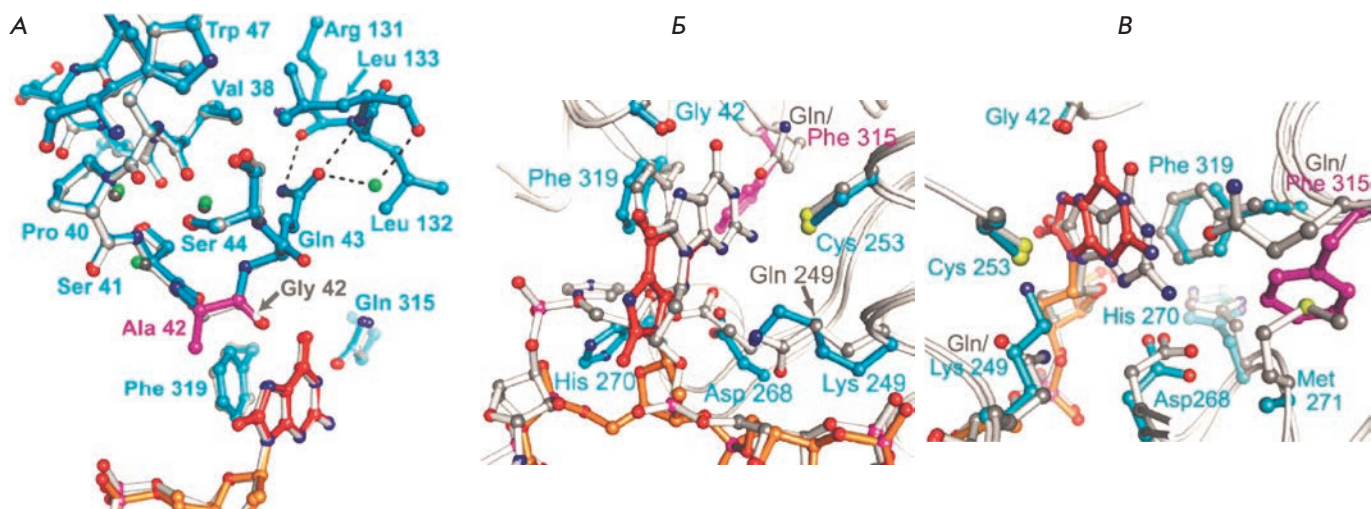


Рис. 8. Изменения в расположении аминокислот активного центра hOGG1 в комплексе с 8-охоG-содержащей ДНК вследствие введения замен по аминокислотам, участвующим в формировании контактов с 8-охоG. А – наложение остатков аминокислот активного центра hOGG1 для WT (серый остов) и мутантной формы G42A (синий остов). Б – аминокислоты активного центра для структуры Q315F*149; остаток 8-охоG в WT hOGG1 показан серым цветом, в Q315F – красным. В – аминокислоты активного центра в структуре Q315F*292. (Приведено с разрешения The American Society for Biochemistry and Molecular Biology: [J. Biol. Chem.] Radom C.T., Banerjee A., Verdine G.L. J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 9182–9194, copyright 2007)

структуре за счет ковалентной сшивки с удаленным остатком Cys292 стабилизируется слабое взаимодействие основания 8-охоG с узнающим повреждение карманом. Несмотря на то что в этой структуре остаток 8-охоG погружен в карман активного центра, не происходит его отрыва от ДНК. Необходимо также отметить, что замена остатка Gln на Phe в мутантной форме hOGG1 Q315F вызывала полную потерю специфичности hOGG1 при связывании как 8-охоG-содержащей, так и неповрежденной ДНК.

С целью детального выяснения роли отдельных остатков аминокислот, участвующих в связывании 8-охоG в активном центре фермента hOGG1, был синтезирован фотоактивируемый аналог 8-охоG, несущий на атоме кислорода, находящемся при C6 в остатке 8-охоG, ортонитрофенилизопропильную группу (PC) [32]. Использование такого производного в составе ДНК-субстрата в сочетании с остановкой реакции быстрым замораживанием позволило структурно охарактеризовать один из наиболее поздних интермедиатов, образующихся в ходе процесса эксцизионной репарации оснований (BER).

Комплекс фермента с PC-субстратом имел такую же структуру, как и комплекс с G-субстратом, т.е. модифицированное PC-основание располагалось в экзосайте фермента hOGG1 [37]. При облучении кристалла этого комплекса светом с длиной волны 373 нм при 4°C в течение 30 с происходило отщепление ортонитрофенилизопропильной группы с об-

разованием продукта, содержащего пару 8-охоG/C (FC-комплекс). Дальнейшее быстрое замораживание в жидком азоте и анализ полученной структуры показали, что полученное основание 8-охоG оказывается в кармане активного центра в том же положении, что и в комплексе hOGG1 с 8-охоG-содержащей ДНК [36, 47].

При этом сохранился контакт, определяющий проявление специфичности узнавания 8-охоG ферментом, образованный за счет водородной связи между атомом N7 основания 8-охоG и карбонильным атомом кислорода основной цепи остатка Gly42; хотя длина этой связи была больше, чем в комплексе с 8-охоG-субстратом (LRC-комплекс, 3.4 против 2.8 Å) (рис. 9).

Какого-либо другого контакта 8-охоG с ключевыми аминокислотами не обнаружено. Три ключевые аминокислоты в hOGG1, играющие важную роль в формировании контактов с 8-охоG, а именно остатки Phe319, Cys253 и Gln315, в FC-комплексе находились в других положениях, чем в полученных ранее структурах [36, 47] (см. рис. 4, рис. 9А). Кроме того, дополнительный контакт между остатком His270 и 5'-фосфатом 8-охоG, имеющийся в LRC-комплексе, в FC-комплексе отсутствовал. Вместо этого остаток His270 находился в стэкинге с Phe319, тогда как водородной связи между остатками His270 и Asp322, присутствующей в FC-комплексе, не было в LRC-комплексе с 8-охоG-субстратом. Каталитически значимая нуклеофильная боковая цепь остатка Lys249

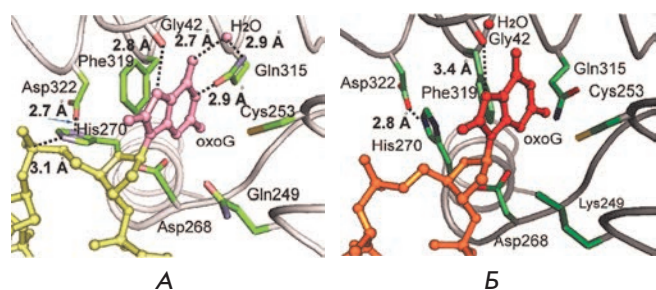


Рис. 9. Расположение остатков аминокислот активного центра относительно 8-охоG в LRC-комплексе [36] (А) и FC-комплексе (Б). (Приведено с разрешения American Chemical Society: [J. Am. Chem. Soc.] Lee S., Radom C.T., Verdine G.L. J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 7784–7785, copyright 2008)

в FC-комплексе дезориентирована и не вовлечена в образование ключевого солевого мостика с остатком Cys253 (Lys249(NH₃⁺)/Cys253(S⁻)), который был предсказан расчетным путем [37] для стадии узнавания основания 8-охоG. Это различие между FC- и LRC-комплексами не ограничивается расположением боковых заместителей перечисленных аминокислот. Спираль α-О, в которой находятся три аминокислотных остатка активного центра, Gln315, Phe319 и Asp322, также оказывается отодвинутой от активного центра (рис. 9Б).

Таким образом, изученная в данной работе структура комплекса относится к интермедиату, наиболее позднему среди когда-либо исследованных для ДНК-гликозилаз, в котором основание 8-охоG почти полностью вставлено в активный центр, однако последний еще не приобрел конечную каталитически активную конформацию (см. также [46]).

Показано [32], что попадание поврежденного основания из экзосайта в активный центр фермента происходит намного быстрее, чем последующая реорганизация аминокислот активного центра, необходимая для образования каталитически компетентного состояния.

В дальнейшем отработанную ранее [37, 47] технологию межмолекулярных дисульфидных сшивок использовали для ковалентного связывания остатков цистеина в hOGG1 с атомом С4 цитозина, комплементарного окисленному гуанину в ДНК-дуплексе [48]. Такая техника позволяла добиваться образования комплекса между ферментом и ДНК в процессе получения кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа. Была закристаллизована и получена структура hOGG1, в которой неповрежденный гуанин был вывернут из двухцепочечной спирали ДНК и помещен в активный центр фер-

мента [48]. В таком комплексе не происходило расщепления N-гликозидной связи. Эта неспособность катализировать расщепление гликозидной связи не была обусловлена структурным влиянием дисульфидной сшивки между ДНК и ферментом, поскольку замена G на 8-охоG в этом же комплексе приводила к эффективному вырезанию окисленного нуклеотида. Полученные данные указывают на существование механизма позднего предотвращения вырезания азотистого основания G, которое ошибочно попало в активный центр hOGG1. Подобный механизм включается только в тех редких случаях, когда гуанин преодолевает энергетический барьер перемещения из экзосайта в карман активного центра. Механизм, на котором основано предотвращение вырезания G, пока остается неясным. Ранее было показано, что N-гликозидная связь при G более лабильна при нейтральных значениях pH, чем при 8-охоG [49]. Следовательно, механизм дискриминации, который опирается на различиях в лабильности N-гликозидной связи с G по сравнению с 8-охоG, в данном случае не может служить объяснением.

Получено также подтверждение существования механизма позднего предотвращения вырезания G [46]. В этом исследовании с помощью метода остановленной струи была проанализирована эффективность каталитического действия hOGG1 на ДНК-субстраты различной специфичности. Сочетание регистрации изменений собственной флуоресценции остатков триптофана в ферменте и флуоресценции введенных в ДНК остатков 2-аминопурина позволяло одновременно следить как за динамикой ДНК, так и за изменением структуры фермента. В работе использовали ДНК-дуплексы, не содержащие и содержащие окисленный гуанин – 8-охоG-субстрат и G-лиганд соответственно. При связывании с hOGG1 ДНК-дуплексов была зарегистрирована (по увеличению интенсивности флуоресценции остатка 2-аминопурина) дестабилизация двойной спирали ДНК на временах ~10 и 20 мс соответственно, что объяснялось изгибанием ДНК и выворачиванием гетероциклических оснований G или охоG из спирали [46]. На временах > 20 мс в случае охоG-субстрата происходило уменьшение интенсивности флуоресценции 2-аминопурина, которое, вероятно, соответствовало погружению аминокислотных остатков белка в полость в двойной спирали и стабилизации такого комплекса. Аналогичного изменения интенсивности 2-аминопурина не наблюдалось в случае G-лиганда. Это означало, что связывание hOGG1 с неспецифической ДНК может привести к изгибанию ДНК и выворачиванию G в экзосайт фермента, но механизм позднего предотвращения вырезания G отключает

стадию перехода фермента в каталитически компетентное состояние.

Verdine G.L. и соавт. [48] полагают, что положение уровня энергии переходного состояния для расщепления N-гликозидной связи в G может быть выше, чем для 8-охоG вследствие либо смещения основных элементов активного центра, либо отсутствия стабилизации переходного состояния (фермент-G)[‡] через образование водородной связи с остатком Gly42. Кроме того, ориентация G в активном центре слегка отличается от ориентации 8-охоG, полученной ранее [37]. Это может помешать достижению оптимального конформационного состояния для атаки боковой аминокислотной группы остатка Lys249 по C1'-положению дезоксирибозы. Эту гипотезу хорошо подтверждают предыдущие результаты, когда введение аминокислотных замен узнающего кармана, которые даже немного изменяли его геометрию: D268N [38] и Q315F [47], приводило к сильному (но не полному) падению эффективности катализа hOGG1.

В работе Lukina M.V. и соавт. [50] получены формы hOGG1 C253L и C253I, в которых карман активного центра закрыт вследствие замены остатка Cys253 на более объемные лейцин либо изолейцин. Несмотря на то что введение такой мутации искажало геометрию активного центра и значительно снижало каталитическую активность hOGG1, к полному подавлению ферментативной активности белка такая мутация не приводила. Полученные результаты хорошо согласуются с концепцией пластичности активного центра, которая предполагает, что активный центр hOGG1 структурно достаточно лабилен, чтобы частично компенсировать искажения, вызванные мутацией [50].

Полученный в работе [48] надмолекулярный ансамбль структурно весьма похож на комплекс, в котором hOGG1 выщепляет из ДНК основание 8-охоG. Различия этих комплексов во взаимодействии с основаниями G и 8-охоG обусловлены, возможно, лишь расхождениями на уровне тонкой подстройки структуры активного центра. Полагают, что во время поиска повреждений в ДНК hOGG1 может иногда выворачивать неповрежденный гуанин в свой активный центр [48]. Полученные результаты позволяют предполагать, что такие случайные попадания G в активный центр hOGG1 не приводят к расщеплению N-гликозидной связи вследствие способности различать 8-охоG и G на уровне катализа.

Существует гипотеза, что фермент hOGG1 «чувствует» измененную динамику в комплементарной паре 8-охоG-C как следствие измененных динами-

ческих свойств этой пары по сравнению с парой G-C. Это предположение было проверено путем сравнения времен спонтанного открытия комплементарных пар оснований в двойной спирали ДНК с помощью ЯМР-спектроскопии протонного обмена [51]. Оказалось, что скорость спонтанного открытия 8-оксогуанина и время жизни основания во внеспиральном состоянии такие же, как и у канонической пары гуанин-цитозин. Этот факт позволяет предположить, что динамика раскрытия комплементарных пар оснований не играет значительной роли в узнавании повреждения ДНК-гликозилазами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре рассмотрены структурные особенности взаимодействия фермента репарации – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы человека – с ДНК-субстратами. Рассмотрены как опубликованные к настоящему моменту работы, так и данные о трехмерных структурах hOGG1, представленные в базе Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. Показано, что важнейшими аминокислотами активного центра фермента, принимающими участие в катализе, являются Lys249 и Asp268. Аминокислоты, отвечающие за дискриминацию 8-охоG от G и вовлеченные в связывание окисленного основания в узнающем кармане – это Gly42, Asn149, Cys253, His270, Gln315, Phe319.

Обсужден структурно-динамический механизм удаления окисленных оснований из ДНК с помощью hOGG1. Показано, что выворачивание основания из цепи ДНК не может происходить в ходе одной стадии как согласованный процесс. По-видимому, он протекает через образование серии дискретных состояний. Интересной и плодотворной кажется гипотеза о том, что специфичность удаления поврежденного основания с помощью hOGG1 контролируется на всех этапах: на стадии узнавания повреждения, на этапе выворачивания его из дуплекса, в процессе связывания 8-охоG в узнающий карман фермента и на стадии каталитического гидролиза N-гликозидной связи. ●

Работа поддержана РФФИ (гранты № 13-04-00013 (ОСФ), 14-04-00806 (ВВК), 14-04-00531 (ДГК)), программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 6.11), Советом по грантам Президента Российской Федерации (НШ-1205.2014.4 (ДГК)), Министерством образования и науки РФ (конкурс совместных лабораторий НГУ – ННЦ СО РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wallace S.S. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 33. № 1. P. 1–14.
2. Marnett L.J. // *Carcinogenesis*. 2000. V. 21. № 3. P. 361–370.
3. Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32. № 11. P. 1102–1115.
4. Boiteux S., Guillet M. // *DNA Repair (Amst.)*. 2004. V. 3. № 1. P. 1–12.
5. Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J. // *FASEB J.* 2003. V. 17. № 10. P. 1195–1214.
6. Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. // *Mutat. Res.* 2004. V. 567. № 1. P. 1–61.
7. Xie Y., Yang H., Cunanan C., Okamoto K., Shibata D., Pan J., Barnes D.E., Lindahl T., McIlhatton M., Fishel R., Miller J.H. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 9. P. 3096–3102.
8. Wan J., Bae M.-A., Song B.-J. // *Exp. Mol. Med.* 2004. V. 36. № 1. P. 71–77.
9. Gu Y., Desai T., Gutierrez P.L., Lu A.-L. // *Med. Sci. Monit.* 2001. V. 7. № 5. P. 861–868.
10. Raha S., Robinson B.H. // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. № 10. P. 502–508.
11. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford Univ. Press, 2002.
12. Jezek P., Hlavata L. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2005. V. 37. № 12. P. 2478–2503.
13. Bernards A.S., Miller J.K., Bao K.K., Wong I. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 23. P. 20960–20964.
14. Kasai H., Nishimura S. // *Nucleic Acids Res.* 1984. V. 12. № 4. P. 2137–2145.
15. Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P. // *Nature*. 1991. V. 349. № 6308. P. 431–434.
16. Grollman A.P., Moriya M. // *Trends Genet.* 1993. V. 9. № 7. P. 246–249.
17. Michaels M.L., Miller J.H. // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. № 20. P. 6321–6325.
18. Fowler R.G., White S.J., Koyama C., Moore S.C., Dunn R.L., Schaaper R.M. // *DNA Repair (Amst.)*. 2003. V. 2. № 2. P. 159–173.
19. Sakumi K., Furuichi M., Tsuzuki T., Kakuma T., Kawabata S., Maki H., Sekiguchi M. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 31. P. 23524–23530.
20. Slupska M.M., Baikalov C., Luther W.M., Chiang J.-H., Wei Y.-F., Miller J.H. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 13. P. 3885–3892.
21. Lu R., Nash H.M., Verdine G.L. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. № 6. P. 397–407.
22. Cappelli E., Hazra T., Hill J.W., Slupphaug G., Bogliolo M., Frosina G. // *Carcinogenesis*. 2001. V. 22. № 3. P. 387–393.
23. Radicella J.P., Dherin C., Desmazes C., Fox M.S., Boiteux S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 8010–8015.
24. Roldan-Arjona T., Wei Y.F., Carter K.C., Klungland A., Anselmino C., Wang R.P., Augustus M., Lindahl T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 8016–8020.
25. Aburatani H., Hippo Y., Ishida T., Takashima R., Matsuba C., Kodama T., Takao M., Yasui A., Yamamoto K., Asano M. // *Cancer Res.* 1997. V. 57. P. 2151–2156.
26. Rosenquist T.A., Zharkov D.O., Grollman A.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 7429–7434.
27. Nishioka K., Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., Nakabeppu Y. // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. P. 1637–1652.
28. Boiteux S., Radicella J.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 377. P. 1–8.
29. Kow Y.W., Wallace S.S. // *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 25. P. 8200–8206.
30. Dodson M.L., Michaels M.L., Lloyd R.S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 52. P. 32709–32712.
31. Labahn J., Schäfer O.D., Long A., Ezaz-Nikpay K., Verdine G.L., Ellenberger T.E. // *Cell*. 1996. V. 86. № 2. P. 321–329.
32. Lee S., Radom C.T., Verdine G.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 25. P. 7784–7785.
33. Norman D.P.G., Bruner S.D., Verdine G.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 2. P. 359–360.
34. Fromme J.C., Bruner S.D., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. // *Nat. Struct. Biol.* 2003. V. 10. № 3. P. 204–211.
35. Björås M., Seeberg E., Luna L., Pearl L.H., Barrett T.E. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 317. № 2. P. 171–177.
36. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. // *Nature*. 2000. V. 403. № 6772. P. 859–866.
37. Banerjee A., Yang W., Karplus M., Verdine G.L. // *Nature*. 2005. V. 434. № 7033. P. 612–618.
38. Norman D.P.G., Chung S.J., Verdine G.L. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. № 6. P. 1564–1572.
39. Nash H.M., Bruner S.D., Schäfer O.D., Kawate T., Addona T., Spohner E., Lane W.S., Verdine G.L. // *Curr. Biol.* 1996. V. 6. № 8. P. 968–980.
40. Thayer M.M., Ahern H., Xing D., Cunningham R.P., Tainer J.A. // *EMBO J.* 1995. V. 14. № 16. P. 4108–4120.
41. Guan Y., Manuel R.C., Arvai A.S., Parikh S.S., Mol C.D., Miller J.H., Lloyd S., Tainer J.A. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 12. P. 1058–1064.
42. Björås M., Luna L., Johnsen B., Hoff E., Haug T., Rognes T., Seeberg E. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 20. P. 6314–6322.
43. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.6.0.0 Schrödinger, LLC.
44. Krokan H.E., Standal R., Slupphaug G. // *Biochem. J.* 1997. V. 325. Pt. 1. P. 1–16.
45. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. № 12. P. 3919–3931.
46. Kuznetsov N.A., Koval V.V., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 2. P. 1029–1038.
47. Radom C.T., Banerjee A., Verdine G.L. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 12. P. 9182–9194.
48. Crenshaw C.M., Nam K., Oo K., Kutchukian P.S., Bowman B.R., Karplus M., Verdine G.L. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 30. P. 24916–24928.
49. Bialkowski K., Cysewski P., Olinski R. // *Z. Naturforsch.* 1996. V. 51. № 1–2. P. 119–122.
50. Lukina M.V., Popov A.V., Koval V.V., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Zharkov D.O. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 40. P. 28936–28947.
51. Every A.E., Russu I.M. // *J. Mol. Recognit.* 2013. V. 26. № 4. P. 175–180.