

1 Аннотация

Посредством молекулярно-динамических расчетов в программном пакете GROMACS было выполнено моделирование ДНК-полимеразы β человека дикого типа и мутантных форм G118V, R149I, E154A, G189D, M236T и R254I, являющихся продуктами однонуклеотидных природных полиморфизмов гена этого фермента, ассоциированных с различными заболеваниями. Результаты моделирования структуры апофермента и фермент-субстратного комплекса, позволяют, вместе с экспериментальными результатами, предположить эффекты, вызываемые соответствующими модификациями белка.

2 Тема работы

Моделирование природных полиморфизмов ДНК-полимеразы β человека

3 Состав коллектива

Кладова Ольга Алексеевна, к.х.н., м.н.с., ИХБФМ СО РАН, руководитель;

Тюгашев Тимофей Евгеньевич, в. инж., ИХБФМ СО РАН, исполнитель.

4 Информация о гранте

РНФ № 21-74-10103 «Роль природных полиморфизмов ДНК-полимеразы β в процессе эксцизионной репарации оснований», Кладова О.А. 2021-2023

5 Научное содержание работы

5.1 Постановка задачи

Полиморфизмы гена ДНК-полимеразы β могут приводить к заменам функционально значимых аминокислотных остатков, влияя на каталитическую активность фермента и способность корректного синтеза нуклеотидной цепи. При этом часть исследуемых известных замен аминокислотных остатков, находятся далеко от активных сайтов Pol β и при этом имеют ассоциацию с различными онкологическими заболеваниями, что указывает на их опосредованное влияние на активность ДНК-полимеразы, которое требует дальнейшего изучения.

5.2 Современное состояние проблемы

ДНК-полимераза β является основной репарационной полимеразой в пути эксцизионной репарации оснований в организме человека, занимая важную роль в устранении окислительных и иных повреждений ДНК человека, помимо этого принимая участие и в других процессах клеточной жизнедеятельности [1–4]. Функционально-дефицитные мутантные формы ДНК-полимеразы β ассоциированы с преждевременным старением, онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями, злокачественной клеточной трансформации и повышенной устойчивости опухолей к химиотерапевтическим агентам [5–9]. Соответственно, исследование механистического влияния аминокислотных замен природных мутантных форм этого фермента на его механизм является важной и актуальной задачей [10–15].

1. Belousova E.A., Lavrik O.I. DNA polymerases β and λ and their roles in cell // DNA Repair. 2015. Vol. 29. P. 112–126.
2. Kaufman B.A., Van Houten B. POLB: A new role of DNA polymerase beta in mitochondrial base excision repair // DNA Repair (Amst). 2017. Vol. 60. P. A1–A5.

3. Qin J. et al. DNA polymerase β deficiency promotes the occurrence of esophageal precancerous lesions in mice // *Neoplasia*. 2021. Vol. 23, № 7. P. 663–675.
4. Beard W.A., Wilson S.H. DNA polymerase beta and other gap-filling enzymes in mammalian base excision repair // *The Enzymes*. Elsevier, 2019. Vol. 45. P. 1–26.
5. Goellner E.M. et al. Targeting DNA polymerase β for therapeutic intervention // *Curr Mol Pharmacol*. 2012. Vol. 5, № 1. P. 68–87.
6. Illuzzi J.L., Wilson D.M. Base excision repair: contribution to tumorigenesis and target in anticancer treatment paradigms // *Curr Med Chem*. 2012. Vol. 19, № 23. P. 3922–3936.
7. Bucholtz N., Demuth I. DNA-repair in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease // *DNA Repair (Amst)*. 2013. Vol. 12, № 10. P. 811–816.
8. Marsden C.G. et al. Chapter Six - Base Excision Repair Variants in Cancer // *Methods in Enzymology* / ed. Eichman B.F. Academic Press, 2017. Vol. 591. P. 119–157.
9. Kothandapani A., Patrick S.M. Evidence for base excision repair processing of DNA interstrand crosslinks // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2013. Vol. 743–744. P. 44–52.
10. Kladova O.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. The Role of Natural Polymorphic Variants of DNA Polymerase β in DNA Repair // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, № 4. P. 2390.
11. Eckenroth B.E. et al. Remote Mutations Induce Functional Changes in Active Site Residues of Human DNA Polymerase β // *Biochemistry*. American Chemical Society, 2017. Vol. 56, № 18. P. 2363–2371.
12. Nemeč A.A. et al. DNA polymerase beta germline variant confers cellular response to cisplatin therapy // *Mol Cancer Res*. 2017. Vol. 15, № 3. P. 269–280.
13. Rozacky J. et al. Gastric cancer associated variant of DNA polymerase beta (Leu22Pro) promotes DNA replication associated double strand breaks // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6, № 27. P. 24474–24487.
14. Sawyer D.L., Sweasy J.B. DNA Polymerase β in the Context of Cancer // *Crit Rev Oncog*. 2022. Vol. 27, № 2. P. 17–33.
15. Beard W.A. DNA polymerase β : Closing the gap between structure and function // *DNA Repair*. 2020. Vol. 93. P. 102910.

5.3 Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

Для молекулярно-динамических расчетов использовались структуры апофермента, комплекса фермент-ДНК и комплекса фермент-ДНК-дНТФ ДНК-полимеразы β человека дикого типа и мутантных форм, построенные на основе известных кристаллографических данных. Структура апофермента ДНК-полимеразы β человека была построена методом гомологичного моделирования с помощью Modeller на основе известной структуры апофермента ДНК-полимеразы β мыши. Использовались силовые поля AMBER версии 14SB-150L для описания белка и ДНК, с параметрами растворителя и ионов TIP3P и JC, с моделированием каталитических ионов магния с октаэдрическим разнесением заряда, и дополнительной параметризацией дНТФ. Субстратная ДНК, содержащая однонуклотидный гэп, моделировалась в укороченном, относительно используемой экспериментальной последовательности, виде, с наложением ограничений на изменение расстояний между азотистыми основаниями концевых нуклеотидных пар с целью предотвращения избыточного плавления ДНК при моделировании. Протонирование аминокислотных остатков оценивалось на основе литературных данных и с помощью веб-сервера H++. Молекулярно-динамические расчеты и анализ выполнялись с помощью пакета ПО GROMACS. Структура помещалась в додекаэдрическую периодическую ячейку, заполняемую молекулами воды и ионами, с минимальным расстоянием 1,1 нм до границы ячейки. Радиус обрезания дальних взаимодействий составлял 1 нм, электростатические взаимодействия рассчитывались

методом PME, ковалентные связи с атомами водорода обрабатывались методом LINCS, шаг интегрирования составлял 2 фс. Релаксация системы выполнялась последовательно в ансамблях NVT и NPT с гармоническими ограничениями на подвижность тяжелых атомов фермент-субстратного комплекса, длительностью 0,5 нс для каждого этапа. После релаксации системы генерировались независимые молекулярно-динамические траектории длительностью 100 нс троекратно для каждого варианта комплекса. Использовались термостат Бусси с установленной температурой 300 К и баростат Паринелло – Рамана.

5.4 Полученные результаты

Моделирование ДНК-полимеразы β в апоферментной форме показало, что если фермент дикого типа и мутантная форма G189D сохраняют полностью открытую конформацию, с максимальным взаимодалением доменов «8 кДа» и «пальцы», то мутантные формы G118V, R149I, R254I и M236T претерпевают компактизацию, что может быть объяснено появлением объемного гидрофобного заместителя боковой цепи мутантной аминокислоты, и согласуется с изменением экспериментального КД-спектра и ухудшением связывания ДНК этими мутантными формами. Апофермент E154A переходит в конформацию, близкую к конформации «открытого» комплекса фермент-ДНК, со сближением доменов «пальцы» и «8 кДа», вероятно, как следствие утраты солевого мостика R253-E154, участвующего в модерации конформационного перехода фермента при связывании ДНК.

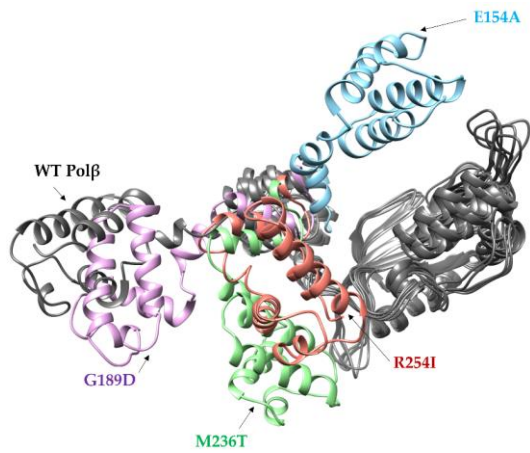
При моделировании комплекса фермент-ДНК дикого типа было отмечено формирование солевого мостика между боковой цепью остатка R149 и боковой цепью остатка E9 домена «8 Кда», наиболее характерное для фермента дикого типа, в меньшей степени — для мутанта G118V, и, соответственно, отсутствующее в комплексе мутанта R149I, которое может являться частью процесса перехода от «открытого» к «закрытому» при связывании дезоксирибонуклеотидтрифосфата, что, вместе с участием боковой цепи этого аминокислотного остатка во взаимодействии с пирофосфатной группой дНТФ, объясняет экспериментально наблюдаемое значительное снижение полимеразной активности этой формы.

Моделирование мутантной формы G189D показало относительно небольшие отличия по сравнению с ферментом дикого типа для апофермента и комплекса фермент-ДНК, но введение боковой цепи аспартата в активный центр приводит к нарушению связывания и каталитического иона магния и нуклеотидтрифосфата.

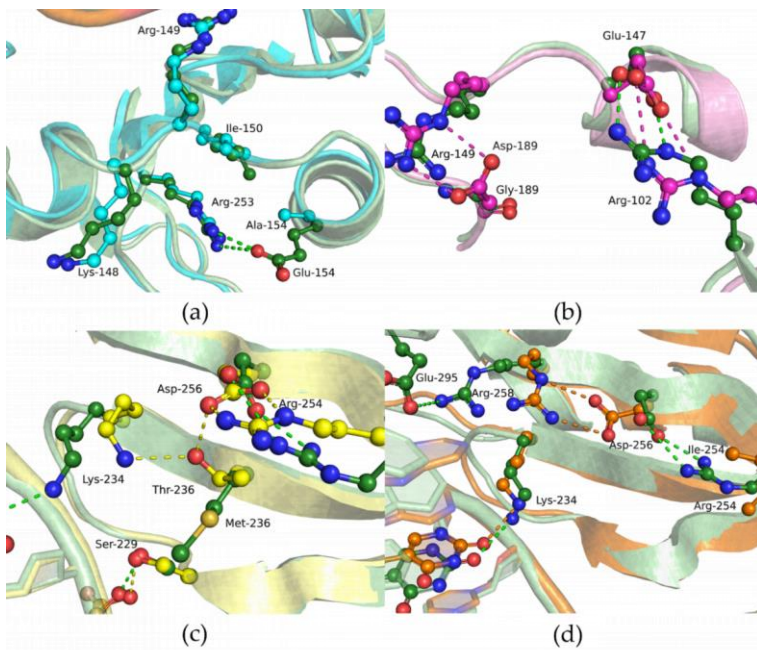
Замена M236T приводит к перераспределению сети водородных связей на участке связывания ДНК с уменьшением контактов фермент-ДНК, что выражается в соответствующих высоких значениях экспериментально определенной константы связывания ДНК.

Замена R254I нарушает существующие в ферменте дикого типа солевые мостики, приводя к переориентации боковой цепи остатка D256, важного для депротонирования 3'-конца ДНК-субстрата с участием координируемого иона магния, что экспериментально отражается и в ухудшении связывания ДНК, и в уменьшении каталитической эффективности мутанта.

5.5 Иллюстрации



Илл. 1: Наложение репрезентативных кадров симуляции структур для апофермента дикого типа и отдельных мутантных форм.



Илл. 2:

Репрезентативные кадры моделирования комплекса фермент-ДНК для фермента дикого типа (зеленый) и мутантных форм: (a) E154A (голубой), (b) G189D (розовый), (c) M236T (желтый), (d) R254I (рыжий)

6 Эффект от использования кластера в достижении целей работы

Моделирование большого количества различных комбинаций комплексов и мутантных форм ферментов с учетом необходимых реплик требует вычислительных мощностей непрактичных в ограничениях собственной рабочей станции.

7 Перечень публикаций

Kladova O.A. et al. The Activity of Natural Polymorphic Variants of Human DNA Polymerase β Having an Amino Acid Substitution in the Transferase Domain: 9 // Cells. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. Vol. 12, № 9. P. 1300. [10.3390/ijms24065892](https://doi.org/10.3390/ijms24065892) IF 6.208

Kladova O.A. et al. Human Pol β Natural Polymorphic Variants G118V and R149I Affects Substate Binding and Catalysis: 6 // International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023. Vol. 24, № 6. P. 5892. [10.3390/cells12091300](https://doi.org/10.3390/cells12091300) IF 7.666

8 Опционально: ваши впечатления

Аварийные отключения являются заметным неудобством.

Именно для моих задач было бы вполне достаточно GPU потребительского класса.