

## **1 Аннотация**

С помощью молекулярно-динамического моделирования в программном пакете GROMACS проведено исследование ДНК-полимеразы  $\beta$  человека дикого типа и ряда мутантных форм: L19P, G66R, G274R, G290C и R333W. Эти мутации являются результатом однонуклеотидных полиморфизмов гена данного фермента и ассоциированы с различными заболеваниями. Анализ структуры апофермента и комплексов фермента с субстратами позволил, в сочетании с экспериментальными данными, предположить функциональные эффекты, вызываемыми указанными аминокислотными заменами.

## **2 Тема работы**

Моделирование природных полиморфизмов ДНК-полимеразы  $\beta$  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  $\beta$  в процессе эксцизионной репарации оснований», Кладова О.А. 2021-2023

## **5 Научное содержание работы**

### **5.1 Постановка задачи**

Полиморфизмы гена ДНК-полимеразы  $\beta$  могут приводить к замене функционально значимых аминокислотных остатков, что, в свою очередь, может влиять на каталитическую активность фермента и его способность обеспечивать точный синтез нуклеотидной цепи. Многие известные замены, ассоциированные с онкологическими заболеваниями локализованы и вне активного центра Pol  $\beta$ , что указывает на возможное опосредованное влияние данных мутаций на активность фермента, требующее дальнейшего исследования.

### **5.2 Современное состояние проблемы**

ДНК-полимераза  $\beta$  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], [2]. Функционально-дефицитные мутантные формы ДНК-полимеразы  $\beta$  ассоциированы с преждевременным старением, онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями, злокачественной клеточной трансформации и повышенной устойчивости опухолей к химиотерапевтическим агентам [3], [4], [5]. Соответственно, исследование механистического влияния аминокислотных замен природных мутантных форм этого фермента на его механизм является важной и актуальной задачей [6], [7], [8], [9], [10], [11].

[1] E. A. Belousova and O. I. Lavrik, 'DNA polymerases  $\beta$  and  $\lambda$  and their roles in cell', *DNA Repair*, vol. 29, pp. 112–126, May 2015, doi: 10.1016/j.dnarep.2015.02.001.

- [2] W. A. Beard and S. H. Wilson, ‘DNA polymerase beta and other gap-filling enzymes in mammalian base excision repair’, in *The Enzymes*, vol. 45, Elsevier, 2019, pp. 1–26. doi: 10.1016/bs.enz.2019.08.002.
- [3] E. M. Goellner, D. Svilar, K. H. Almeida, and R. W. Sobol, ‘Targeting DNA polymerase  $\beta$  for therapeutic intervention’, *Curr Mol Pharmacol*, vol. 5, no. 1, pp. 68–87, Jan. 2012, doi: 10.2174/1874467211205010068.
- [4] J. L. Illuzzi and D. M. Wilson, ‘Base excision repair: contribution to tumorigenesis and target in anticancer treatment paradigms’, *Curr Med Chem*, vol. 19, no. 23, pp. 3922–3936, 2012, doi: 10.2174/092986712802002581.
- [5] C. G. Marsden, J. A. Dragon, S. S. Wallace, and J. B. Sweasy, ‘Chapter Six - Base Excision Repair Variants in Cancer’, in *Methods in Enzymology*, vol. 591, B. F. Eichman, Ed., in DNA Repair Enzymes: Cell, Molecular, and Chemical Biology, vol. 591., Academic Press, 2017, pp. 119–157. doi: 10.1016/bs.mie.2017.03.003.
- [6] O. A. Kladova, O. S. Fedorova, and N. A. Kuznetsov, ‘The Role of Natural Polymorphic Variants of DNA Polymerase  $\beta$  in DNA Repair’, *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 4, p. 2390, Feb. 2022, doi: 10.3390/ijms23042390.
- [7] B. E. Eckenroth, J. B. Towle-Weicksel, A. A. Nemeč, D. L. Murphy, J. B. Sweasy, and S. Doublé, ‘Remote Mutations Induce Functional Changes in Active Site Residues of Human DNA Polymerase  $\beta$ ’, *Biochemistry*, vol. 56, no. 18, pp. 2363–2371, May 2017, doi: 10.1021/acs.biochem.6b01287.
- [8] A. A. Nemeč *et al.*, ‘DNA polymerase beta germline variant confers cellular response to cisplatin therapy’, *Mol Cancer Res*, vol. 15, no. 3, pp. 269–280, Mar. 2017, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0227-T.
- [9] J. Rozacky, A. A. Nemeč, J. B. Sweasy, and D. Kidane, ‘Gastric cancer associated variant of DNA polymerase beta (Leu22Pro) promotes DNA replication associated double strand breaks’, *Oncotarget*, vol. 6, no. 27, pp. 24474–24487, Jun. 2015.
- [10] D. L. Sawyer and J. B. Sweasy, ‘DNA Polymerase  $\beta$  in the Context of Cancer’, *Crit Rev Oncog*, vol. 27, no. 2, pp. 17–33, 2022, doi: 10.1615/CritRevOncog.2022043477.
- [11] W. A. Beard, ‘DNA polymerase  $\beta$ : Closing the gap between structure and function’, *DNA Repair*, vol. 93, p. 102910, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102910.

### 5.3 Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

Для молекулярно-динамических расчётов использовали структуры апофермента, комплексов фермент–ДНК и фермент–ДНК–дНТФ ДНК-полимеразы  $\beta$  человека дикого типа и мутантных форм, построенные на основе известных кристаллических данных. Структура апофермента была получена методом гомологичного моделирования с помощью Modeller на основе структуры апофермента мыши. Для описания белка и ДНК применялись силовые поля AMBER 14SB-15OL, с параметрами TIP3P для воды и JC — для ионов калия и хлора. Каталитические ионы магния моделировались с октаэдрической координацией и разнесённым зарядом; дНТФ дополнительно параметризовались. Протонирование остатков определено с использованием литературных источников и веб-сервера H<sup>++</sup>. Моделирование проводилось в пакете GROMACS. Системы помещались в додекаэдрическую периодическую ячейку с минимальным расстоянием 1 нм до границы, заполнялась водой и ионами KCl концентрации 50 мМ. Взаимодействия рассчитывались с радиусом обрезания 1,0 нм, дальнедействующие электростатические — методом PME, связи атомов водорода — алгоритмом LINCS, шаг интегрирования составлял 2 фс. Релаксация выполнялась последовательно в ансамблях NVT и NPT с гармоническими ограничениями на тяжёлые атомы комплекса, по 0,5 нс на этап. После релаксации генерировались независимые траектории длительностью до 500 нс в нескольких повторениях. Температура поддерживалась термостатом V-rescale, давление — баростатом C-rescale при 310 К.

## 5.4 Полученные результаты

Моделирование N-домена фрагмента мутантной формы L19P ДНК-полимеразы  $\beta$  показало дестабилизацию укладки  $\alpha 1$ -спирали в этом домене, приводя к удлинению неструктурированного N-концевого участка фермента и относительному смещению  $\alpha 2$ - и  $\alpha 3$ -спиралей, нарушая характерную для фермента дикого типа сеть водородных контактов, образованных положительно заряженными боковыми цепями аминокислотных остатков N-концевого домена. Замена G66R привела к нарушению связывания остова ДНК петлей между  $\alpha 3$ - и  $\alpha 4$ -спиралями. Экспериментально это нашло отражение в значительном снижении ДНК-связывающей, ДНК-полимеразной и dRP-лиазной активности этих мутантных форм фермента.

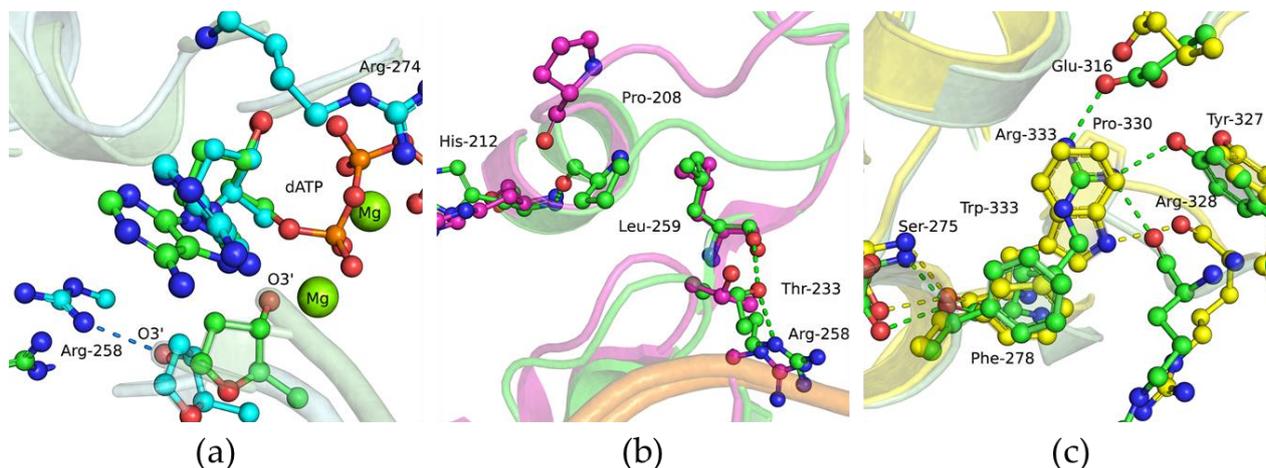
Моделирование мутантной формы апофермента G274R показало образование водородных связей с каталитически важными остатками Asp-190, Asp-192 и Asp-256, что должно затруднять связывание ДНК в активном центре фермента. Для мутантной формы R333W моделирование показало утрату сети водородных связей, стабилизирующих C-концевой домен фермента, вплоть до частичного расплавления C-концевого участка.

Моделирование фермент-субстратных комплексов мутантных форм показало для G274R нарушение связывания и ДНК, и дНТФ в модели активного центра фермента, согласуясь с экспериментально наблюдаемым отсутствием активности этой формы.

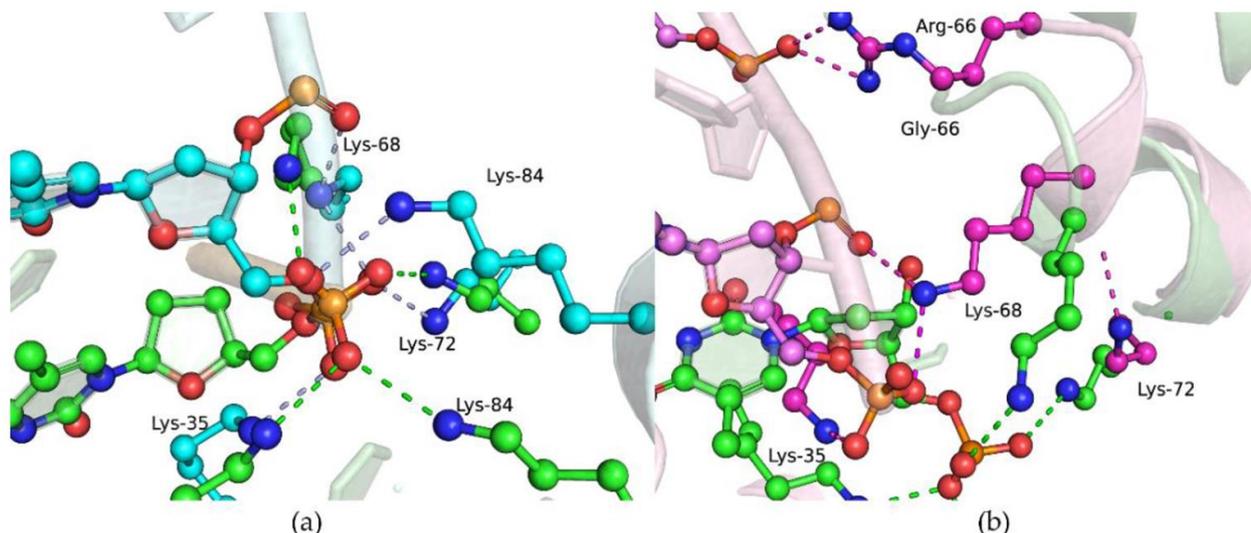
Для G290C наблюдалось перераспределение водородных связей в области связывания ДНК, достаточно удаленной от местоположения замены, преимущественно за счёт изменения позиционирования Thr-233, утратившего в мутантной форме контакт с фосфатным остовом ДНК, это сопровождалось увеличением подвижности петлевого участка 203-209.

Разрушение сети водородных связей в модели мутантной формы R333W согласуется с экспериментально наблюдаемой слабой ДНК-связывающей способностью фермента и утратой каталитической активности. замена аргинина на триптофан привела к наиболее выраженному изменению в системе контактных взаимодействий, что согласуется с резким снижением способности этого мутанта связываться с ДНК.

## 5.5 Иллюстрации



Илл. 1: Наложение структур комплексов белок-ДНК-дНТФ для *pol β* дикого типа (зеленый) и мутантных форм G274A (а, голубой), G290C (b, розовый), R333W (c, желтый)



Илл. 2: Наложение структур dRP-лиазного домена для комплексов белок-ДНК и для *pol β* дикого типа (зеленый) и мутантных форм L19P (а, голубой), G66R (b, розовый)

## 6 Эффект от использования кластера в достижении целей работы

Моделирование большого количества различных комбинаций комплексов и мутантных форм ферментов с учетом необходимых реплик требует соответственно больших вычислительных мощностей.

7

## 8 Перечень публикаций

Kladova, O.A., Tyugashev, T.E., Yakimov, D.V., Mikushina, E.S., Novopashina, D.S., Kuznetsov, N.A. & Kuznetsova, A.A. The Impact of SNP-Induced Amino Acid Substitutions L19P and G66R in the dRP-Lyase Domain of Human DNA Polymerase  $\beta$  on Enzyme Activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(8):4182. doi 10.3390/ijms25084182 IF:4.9

Kladova, O.A., Tyugashev, T.E., Miroshnikov, A.A., Novopashina, D.S., Kuznetsov, N.A. & Kuznetsova, A.A. SNP-Associated Substitutions of Amino Acid Residues in the dNTP Selection Subdomain Decrease Pol $\beta$  Polymerase Activity. *Biomolecules*. 2024;14(5):547. doi 10.3390/biom14050547 IF: 4.8

## **9      Опционально: ваши впечатления**

Аварийные отключения являются заметным неудобством.