

1 Аннотация

С помощью молекулярно-динамического моделирования в программном пакете GROMACS проведено исследование терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы человека дикого типа и ряда мутантных форм, предположительно обладающих измененной субстратной специфичностью: D395E, D395N, D395Q, D395K, E456Q, E456N, D395N+E456N, D395Q+E456N, D395K+E456Q. Результаты моделирования позволили предложить объяснение известной селективности фермента и получить мутантные формы, отличающиеся измененной селективностью по присоединяемым дНТФ.

2 Тема работы

Моделирование фермент-субстратных комплексов терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы человека и мутантных форм

3 Состав коллектива

Кузнецова Александра Александровна, к.х.н., с.н.с., ИХБФМ СО РАН, руководитель;

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

4 Информация о гранте

РНФ № 21-64-00017 «Модификация нуклеиновых кислот и репарация ДНК как источник новых инструментов управления геномами», Кузнецов Н.А. 2021-2024

5 Научное содержание работы

5.1 Постановка задачи

Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT), характерный для позвоночных представитель семейства PolX ДНК-полимераз, обладает способностью к безматричному 3'-5' синтезу ДНК. Эта особенность, обусловленная удлинённой формой петли 1, отражает участие TdT в V(D)J-рекомбинации, механизме обеспечивающем разнообразие антител и T-клеточных рецепторов в B- и T-клетках, нашла применение в биотехнологии — в методе детекции апоптоза TUNEL, в мечении 3'-концов ДНК, в ферментативном синтезе олигонуклеотидов. При этом безматричная полимеразная активность не является полностью случайной, человеческая TdT показывает выраженную селективность дГТФ \gg дТТФ \approx дАТФ $>$ дЦТФ при присоединении нуклеотидов к оцДНК-праймеру, что может выступать затруднением при ДНК-синтезе.

5.2 Современное состояние проблемы

Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (TdT) — ДНК-полимераза семейства X, представленная только у позвоночных, способна присоединять дезоксирибонуклеотиды, и не только, к 3'-концу одноцепочечной ДНК без использования матрицы. Впервые TdT была выделена из экстракта тимуса телят ещё в 1960-е и с тех пор стала остается популярным объектов исследований [1–3].

Основная биологическая роль TdT заключается в участии в V(D)J-рекомбинации — процессе формирования разнообразных иммуноглобулинов и T-клеточных рецепторов. Фермент случайным образом добавляет 1–10 нуклеотидов к одноцепочечной ДНК на соединениях V-D и D-J, что значительно увеличивает иммунологическое разнообразие. Помимо этого, TdT участвует в механизме негомологичного соединения концов (NHEJ), который служит для восстановления двуцепочечных разрывов ДНК [4,5].

Способность TdT осуществлять реакцию удлинения оцДНК праймера, определяется наличием вблизи активного центра фермента подвижного участка Loop1, взаимодействующего и с одноцепочечным ДНК-субстратом, и с присоединяемым азотистым основанием [6–8].

Субстратная специфичность TdT достаточно широка: фермент может использовать различные модифицированные нуклеотиды и не требует строгого соответствия структуре сахара в праймере [9,10]. При этом фермент всё же обладает определённой селективностью по присоединяемым дНТФ, и известные результаты противоречивы [6,11,12].

TdT как уже имеет применение в методах мечения или удлинения 3'-концов, таких как TUNEL, так и рассматривается в качестве элемента перспективного ферментативного синтеза ДНК, для чего требуется дополнительная модификация ферментативных свойств полимеразы [3,13–15].

1. Kato K.I. et al. Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal deoxynucleotidyltransferase // *J Biol Chem*. 1967. Vol. 242, № 11. P. 2780–2789.
2. Hansen J.D. Characterization of rainbow trout terminal deoxynucleotidyl transferase structure and expression. TdT and RAG1 co-expression define the trout primary lymphoid tissues // *Immunogenetics*. 1997. Vol. 46, № 5. P. 367–375.
3. Zhang C. et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase: Properties and applications // *Engineering Microbiology*. 2025. Vol. 5, № 1. P. 100179.
4. Gilfillan S. et al. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire // *Science*. 1993. Vol. 261, № 5125. P. 1175–1178.
5. Motea E.A., Berdis A.J. Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. Vol. 1804, № 5. P. 1151–1166.
6. Gouge J. et al. Structures of intermediates along the catalytic cycle of terminal deoxynucleotidyltransferase: dynamical aspects of the two-metal ion mechanism // *J. Mol. Biol.* 2013. Vol. 425, № 22. P. 4334–4352.
7. Romain F. et al. Conferring a template-dependent polymerase activity to terminal deoxynucleotidyltransferase by mutations in the Loop1 region // *Nucleic Acids Res*. 2009. Vol. 37, № 14. P. 4642–4656.
8. Gouge J. et al. Structural basis for a novel mechanism of DNA bridging and alignment in eukaryotic DSB DNA repair // *EMBO J*. 2015. Vol. 34, № 8. P. 1126–1142.
9. Berdis A.J., McCutcheon D. The Use of Non-natural Nucleotides to Probe Template-Independent DNA Synthesis // *ChemBioChem*. 2007. Vol. 8, № 12. P. 1399–1408.
10. Horáková P. et al. Tail-labelling of DNA probes using modified deoxynucleotide triphosphates and terminal deoxynucleotidyl transferase. Application in electrochemical DNA hybridization and protein-DNA binding assays // *Org. Biomol. Chem*. 2011. Vol. 9, № 5. P. 1366.
11. Chang L.M., Bollum F.J. Multiple roles of divalent cation in the terminal deoxynucleotidyltransferase reaction // *J Biol Chem*. 1990. Vol. 265, № 29. P. 17436–17440.
12. Kuznetsova A.A. et al. Insight into the mechanism of DNA synthesis by human terminal deoxynucleotidyltransferase // *Life Sci Alliance*. 2022. Vol. 5, № 12. P. e202201428.
13. Palluk S. et al. De novo DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates // *Nat. Biotechnol*. 2018. Vol. 36, № 7. P. 645–650.
14. Barthel S. et al. Enhancing Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity on Substrates with 3' Terminal Structures for Enzymatic De Novo DNA Synthesis // *Genes*. 2020. Vol. 11, № 1. P. 102.
15. Sarac I., Hollenstein M. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in the Synthesis and Modification of Nucleic Acids // *Chembiochem*. 2019. Vol. 20, № 7. P. 860–871.

5.3 Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

Для молекулярно-динамических расчётов использовали структуры комплексов фермент–ДНК и фермент–ДНК–дНТФ TdT человека дикого типа и мутантных форм, построенные на основе известных кристаллических данных для TdT мыши и других полимераз семейства X. 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⁺⁺. 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 от 100 до 500 нс в нескольких повторениях. Температура поддерживалась термостатом V-rescale, давление — баростатом S-rescale при 310 К.

5.4 Полученные результаты

Экспериментальные результаты для TdT показали выраженную селективность при присоединении нуклеотидов к оцДНК-праймеру: дГТФ \gg дТТФ \approx дАТФ $>$ дЦТФ.

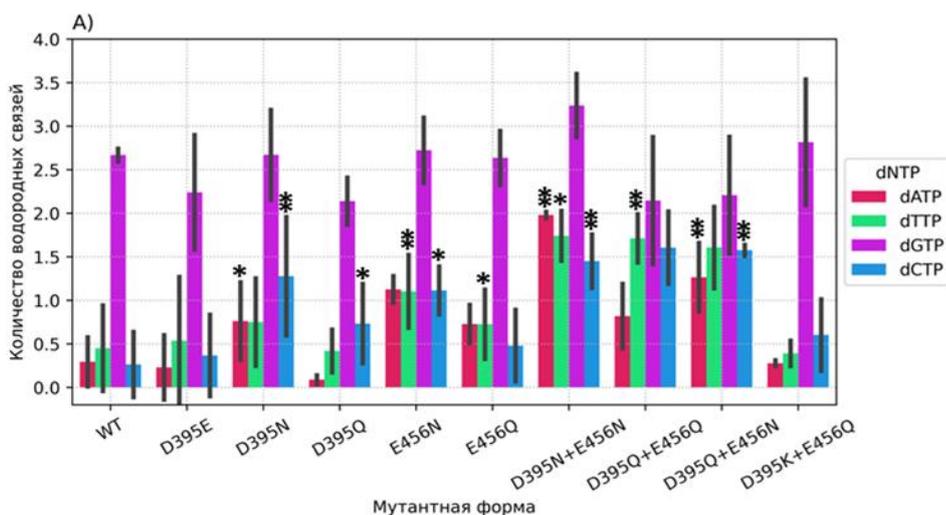
Молекулярно-динамические расчеты позволили объяснить эту селективность, связав её с динамикой водородных связей в комплексе белка дикого типа с азотистым основанием присоединяемого нуклеотида. Моделирование показало, что остатки Asp395 и Glu456 образуют стабильные водородные связи с dGTP (наиболее эффективно встраиваемым нуклеотидом), но практически не взаимодействуют с другими dNTP. Это позволило предположить, что именно эти аминокислоты определяют субстратную селективность фермента

Поскольку боковые цепи аспартата и глутамата выступают акцепторами водородных связей, были предложены их замены на Asn и Gln, способные также выступать донорами. Это должно было увеличить число водородных связей между dNTP и белком. Один из этих остатков (Glu456) взаимодействует как с азотистым основанием, так и с 3'-концом ДНК-праймера, а второй (Asp395) расположен в активном центре и контактирует только с основанием присоединяемого нуклеотида.

Молекулярно-динамические расчеты показали, что в мутантной форме D395E (соответствующей распространённому среди ортологов варианту) уменьшилось число контактов между белком и dGTP. В то же время мутантные формы D395N и E456N сформировали в среднем на одну дополнительную водородную связь с dATP, dCTP и dTTP. Наибольший эффект наблюдался у двойных мутантов: D395N+E456N, D395Q+E456Q и D395Q+E456N образовали до двух дополнительных водородных связей, причём форма D395N+E456N продемонстрировала наибольшую стабильность этих связей в ходе симуляции.

На основе выполненных молекулярно-динамических расчетов были получены соответствующие мутантные формы, эксперименты с которыми подтвердили выдвинутое предположение о изменении селективности фермента.

5.5 Иллюстрации



Илл. 1: Среднее

количество водородных связей между дНТФ и аминокислотными остатками активного центра фермента, дикого типа и мутантных форм в комплексе фермент-оцДНК-дНТФ

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

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 Перечень публикаций

E. O. Ukladov, T. E. Tyugashev, and N. A. Kuznetsov, 'Computational Modeling Study of the Molecular Basis of dNTP Selectivity in Human Terminal Deoxynucleotidyltransferase', *Biomolecules*, vol. 14, no. 8, p. 961, Aug. 2024, doi: 10.3390/biom14080961. IF: 4,8.

[2]

A. A. Kuznetsova, T. E. Tyugashev, I. V. Alekseeva, N. A. Timofeyeva, O. S. Fedorova, and N. A. Kuznetsov, 'Insight into the mechanism of DNA synthesis by human terminal deoxynucleotidyltransferase', *Life Sci Alliance*, vol. 5, no. 12, p. e202201428, Dec. 2022, doi: 10.26508/lsa.202201428. IF: 3,3.

8 Опционально: ваши впечатления

Отключения являются заметным неудобством.