

Природные полиморфизмы ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК как фактор эффективности удаления повреждений

Алексеева И.В., Кладова О.А., Кузнецов Н.А.*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

* nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: репарация ДНК; однонуклеотидный полиморфизм; ферментативная активность

Мотивация и цель: Стабильность генетической информации в живой клетке — ключ к ее нормальному функционированию. На сегодняшний день не остается сомнений, что повреждения ДНК играют ключевую роль в возникновении различных заболеваний, в том числе онкологических. Процесс эксцизионной репарации оснований (BER) включает действие множества ферментов и отвечает за удаление из ДНК огромного числа повреждений. Необходимо отметить, что уменьшение общего уровня репарационной активности у человека может быть вызвано природными однонуклеотидными полиморфизмами (SNPs) в генах ферментов репарации ДНК. Действительно, SNPs широко распространены в популяции людей, а взаимосвязь между SNP и этиологией некоторых заболеваний человека остается открытой областью исследований. При этом один из актуальных вопросов заключается в выяснении роли SNPs в предрасположенности к развитию онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Следует также отметить, что SNP-ассоциированные замены аминокислотных остатков ферментов репарации могут приводить как к потере функциональных свойств отдельных ферментов, так и к нарушению белок-белковой координации участников процесса репарации. Целью данной работы являлся систематический анализ природных полиморфных вариантов ряда ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК человека, а именно ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4, AP-эндонуклеазы APE1 и ДНК-полимеразы β .

Методы и алгоритмы: С использованием базы данных dbSNP NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) было установлено, что в генах ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4, AP-эндонуклеазы APE1 и ДНК-полимеразы β зарегистрированы тысячи SNPs. Методами биоинформационного анализа показано, что некоторые из них могут оказывать влияние на эффективность действия ферментов. Проведено молекулярное моделирование ряда выбранных мутантных вариантов ферментов для оценки возможного влияния замен аминокислотных остатков на каталитическую активность и способность формировать белок-белковые комплексы. Для верификации полученных результатов проведен экспериментальный анализ ферментативных свойств ряда рекомбинантных вариантов, который выявил существенное влияние отобранных природных замен как на каталитическую активность ферментов, так и на их координацию с другими участниками процесса репарации.

Результаты: В настоящий момент существует большое количество биоинформатических подходов, позволяющих предсказывать влияние

однонуклеотидных (SNP) замен на функцию белка. Нами был проведен анализ известных полиморфизмов ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4, AP-эндонуклеазы APE1 и ДНК-полимеразы β человека с целью выявления полиморфных вариантов, способных оказывать повреждающее воздействие на функционирование данных ферментов. Информация об известных однонуклеотидных полиморфизмах была получена из базы данных NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Особое внимание было уделено полиморфизмам, которые (1) приводили к смене класса аминокислотного остатка, (2) аминокислотные остатки располагались в функционально важных участках белковой глобулы и/или (3) данные SNP встречались в опухолях. Эти критерии позволили отобрать ряд SNP-ассоциированных замен в четырех ферментах для их дальнейшего анализа.

Анализ влияния природных полиморфизмов на ферментативную активность APE1 (R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q, P311S) и ДНК-гликозилаз SMUG1 (G90C, P240H, N244S и N248Y) и MBD4 (S470L, G507S, R512W и H557D) показал, что, если для некоторых вариантов ДНК-гликозилаз обнаружена практически полная потеря ферментативной активности (SMUG1 G90C и P240H, MBD4cat S470L, G507S и R512W), то в случае APE1, по-видимому, активность фермента не может быть ниже порогового значения, необходимого для поддержания минимального уровня репарационной активности, достаточного для выживания организма. Такое различие в результатах может быть связано с тем, что в случае ДНК-гликозилаз их субстратная специфичность может дублироваться другими ферментами этого класса, в то время как снижение активности APE1 приводит к крайне негативным для организма последствиям.

При определении активности мутантных вариантов POL β в трансферазной реакции установлено, что все исследованные мутантные формы (L19P, G66R, G118V, R149I, E154A, G189D, M236T, R254I, G274R, G290C, R333W) обладали более медленной способностью заполнять 1 нт бреши в ДНК, чем фермент дикого типа. Следует отметить, что для мутантных форм, несущих замены G274R и R333W, не удалось зарегистрировать накопление продукта реакции, что указывает на значительную степень инактивации ферментов, при возникновении замен аминокислотных остатков в положении G274 и R333.

Эффективность координированных взаимодействий между APE1 и ферментами, выполняющими свои функции как до (ДНК-гликозилазы: OGG1, UNG2, AAG), так и после APE1 (POL β) в процессе BER, а также с белковыми факторами (XRCC1 и PCNA) была определена по способности белков-эффекторов оказывать влияние на активность APE1 дикого типа и ряд ее природных полиморфных вариантов. Показано, что аминокислотные остатки Arg221 и Arg237, располагающиеся на поверхности белковой глобулы, важны для регуляции активности APE1 другими белками репарационного комплекса, но при этом оказывают различное влияние на активность APE1. Тогда как Asn222, по-видимому, принимает активное участие в контактах не со всеми протестированными белками. Так, например, белки-эффекторы OGG1, UNG2 и AAG практически не ведут к изменению активности этого SNP-варианта. Внесение аминокислотных замен в ДНК-связывающий центр APE1 приводит к нарушению координированных взаимодействий с другими участниками BER. В пользу этого вывода свидетельствует факт, что оба SNP варианта APE1, M270T и R274Q, наименее чувствительны к стимуляции протестированными белками-эффекторами по сравнению с другими полиморфными вариантами APE1.

Появление дополнительного положительного заряда в белковой глобуле в случае замены G241R приводит к снижению эффекта стимуляции. На вариант P311S наибольший стимулирующий эффект оказывают AAG и PCNA. Кроме того, для дикого типа урацил-ДНК-гликозилаз SMUG1 и MBD4^{cat}, а также их полиморфных вариантов SMUG1 N248Y и MBD4^{cat} H557D показан стимулирующий эффект каталитически неактивной формы AP-эндонуклеазы APE1 D210N.

Определение влияния белков-эффекторов (APE1, AAG, MBD4, NEIL1, NTHL1, OGG1 и TDG) на накопление продукта трансферазной реакции POL β выявило, что добавление фермента APE1 в реакцию либо полностью ингибировало, либо замедляло (WT POL β , G66R, R149I) накопление продукта для всех исследованных вариантов POL β . Кроме того, для вариантов POL β , обладающих низкой константой полимеризации (например, L19P, G118V, G189D), было зафиксировано образование продуктов экзонуклеазной активности APE1. ДНК-гликозилазы AAG, NEIL1 и NTHL1 снижали активность исследованных вариантов POL β более чем на 20 %. Присутствие в реакции ферментов MBD4^{cat} и TDG практически не влияло на накопление продукта реакции отдельных вариантов POL β , тогда как добавление фермента OGG1 приводило к небольшому снижению накопления продукта реакции, однако не ингибировало активность вариантов POL β по сравнению с ферментом APE1.

Выводы: За время выполнения проекта проведен экспериментальный анализ 26 природных вариантов SMUG1, MBD4, APE1 и POL β , который выявил существенное влияние ряда природных замен как на каталитическую активность ферментов, так и на их координацию с другими участниками процесса репарации. Полученные данные подтверждают связь некоторых природных полиморфизмов с общим понижением репарационной активности и, таким образом, могут выступать основой для создания маркерной панели полиморфизмов, ассоциированных с накоплением мутаций в ДНК.

Финансирование: Исследование проведено в рамках государственного задания № 121031300041-4, мутагенез, очистка и анализ свойств полиморфных вариантов POL β выполнены в рамках проекта РНФ № 21-74-10103.

Natural polymorphisms of DNA base excision repair enzymes as a factor in the efficiency of damage removal

Alekseeva I.V., Kladova O.A., Kuznetsov N.A.*

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Key words: DNA repair; single-nucleotide polymorphism; enzymatic activity

Motivation and Aim: The stability of genetic information in a living cell is the key to its normal functioning. Today, there is no doubt that DNA damage plays a key role in the occurrence of various diseases, including cancer. The process of base excision repair (BER) involves the action of many enzymes and is responsible for removing a huge number of lesions from DNA. It should be noted that a decrease in the overall level of repair activity in humans can be caused by natural single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of DNA repair enzymes. Indeed, SNPs are widely distributed in the human population, and the relationship between SNPs and the etiology of several human

diseases remains an open area of research. At the same time, one of the pressing issues is to clarify the role of SNPs in the predisposition to the development of cancer and neurodegenerative diseases. It should also be noted that SNP-associated substitutions of amino acid residues of repair enzymes can lead to both the loss of functional properties of individual enzymes and disruption of protein-protein coordination of participants in the repair process. The purpose of this work was a systematic analysis of natural polymorphic variants of a number of human DNA base excision repair enzymes, namely DNA glycosylases SMUG1 and MBD4, AP endonuclease APE1 and DNA polymerase β .

Methods and Algorithms: Using the NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), it was found that thousands of SNPs were registered in the genes of DNA glycosylases SMUG1 and MBD4, AP endonuclease APE1 and DNA polymerase β . Bioinformation analysis methods have shown that some of them can affect the efficiency of enzymes. Molecular modeling of a number of selected mutant variants of enzymes was carried out to assess the possible effect of substitutions of amino acid residues on catalytic activity and the ability to form protein-protein complexes. To verify the results obtained, an experimental analysis of the enzymatic properties of a number of recombinant variants was carried out, which revealed a significant influence of selected natural substitutions both on the catalytic activity of enzymes and on their coordination with other participants in the repair process.

Results: Currently, there are a large number of bioinformatics approaches that make it possible to predict the effect of single nucleotide (SNP) substitutions on protein function. We analyzed known polymorphisms of DNA glycosylases SMUG1 and MBD4, AP endonuclease APE1 and human DNA polymerase β in order to identify polymorphic variants that can have a damaging effect on the functioning of these enzymes. Information on known single nucleotide polymorphisms was obtained from the NCBI dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Particular attention was paid to polymorphisms that (1) led to a change in the class of amino acid residue, (2) were located in functionally important regions of the protein globule, and (3) were found in tumors. These criteria made it possible to select a number of SNP-associated substitutions in these enzymes for further analysis.

Analysis of the influence of natural polymorphisms on the enzymatic activity of APE1 (R221C, N222H, R237A, G241R, M270T, R274Q, P311S) and DNA glycosylases SMUG1 (G90C, P240H, N244S and N248Y) and MBD4 (S470L, G507S, R512W and H557D) showed that, if for some variants of DNA glycosylases an almost complete loss of enzymatic activity was detected (SMUG1 G90C and P240H, MBD4cat S470L, G507S and R512W), then in the case of APE1, apparently, the enzyme activity cannot be below the threshold value required to maintain the minimum level of repair activity sufficient for the survival of the organism. This difference in results may be due to the fact that in the case of DNA glycosylases, their substrate specificity can be duplicated by other enzymes of this class, while a decrease in APE1 activity leads to extremely negative consequences for the body.

When determining the activity of mutant POL β variants in the transferase reaction, it was found that all the studied mutant forms (L19P, G66R, G118V, R149I, E154A, G189D, M236T, R254I, G274R, G290C, R333W) had a slower ability to fill 1 nt gaps in DNA, than the wild type enzyme. It should be noted that for mutant forms carrying the G274R and R333W substitutions, it was not possible to register the accumulation of

the reaction product, which indicates a significant degree of enzyme inactivation when substitutions of amino acid residues occur at positions G274 and R333.

The efficiency of coordinated interactions between APE1 and enzymes that perform their functions both upstream (DNA glycosylases: OGG1, UNG2, AAG) and downstream of APE1 (POL β) in the BER process, as well as with protein factors (XRCC1 and PCNA) was determined by the ability effector proteins influence the activity of wild-type APE1 and a number of its natural polymorphic variants. It has been shown that amino acid residues Arg221 and Arg237, located on the surface of the protein globule, are important for the regulation of APE1 activity by other proteins of the repair complex, but at the same time have different effects on APE1 activity. While Asn222 apparently does not actively participate in contacts with all proteins tested, for example, the effector proteins OGG1, UNG2, and AAG lead to virtually no changes in the activity of this SNP variant. Introduction of amino acid substitutions into the DNA-binding center of APE1 leads to disruption of coordinated interactions with other BER participants. This conclusion is supported by the fact that both APE1 SNP variants M270T and R274Q are least sensitive to stimulation by the tested effector proteins compared to other APE1 polymorphic variants. The appearance of an additional positive charge in the protein globule in the case of G241R substitution leads to a decrease in the stimulation effect. AAG and PCNA have the greatest stimulating effect on the P311S variant. In addition, for the wild type uracil DNA glycosylases SMUG1 and MBD4cat, as well as their polymorphic variants SMUG1 N248Y and MBD4cat H557D, the stimulating effect of the catalytically inactive form of the AP endonuclease APE1 D210N was shown.

Determination of the influence of effector proteins (APE1, AAG, MBD4, NEIL1, NTHL1, OGG1 and TDG) on the accumulation of the product of the POL β transferase reaction revealed that the addition of the APE1 enzyme to the reaction either completely inhibited or slowed down (WT POL β , G66R, R149I) the accumulation of the product for all POL β variants studied. In addition, for POL β variants with a low polymerization constant (for example, L19P, G118V, G189D), the formation of products of APE1 exonuclease activity was recorded. DNA glycosylases AAG, NEIL1 and NTHL1 reduced the activity of the studied POL β variants by more than 20 %. The presence of the MBD4 cat and TDG enzymes in the reaction had virtually no effect on the accumulation of the reaction product of individual POL β variants, while the addition of the OGG1 enzyme led to a slight decrease in the accumulation of the reaction product, but did not inhibit the activity of the POL β variants compared to the APE1 enzyme.

Conclusions: During the implementation of the project, an experimental analysis of 26 natural variants of SMUG1, MBD4, APE1 and POL β was carried out, which revealed a significant effect of a number of natural substitutions both on the catalytic activity of the enzymes and on their coordination with other participants in the repair process. The data obtained confirm the connection of some natural polymorphisms with a general decrease in repair activity and, thus, can serve as the basis for creating a marker panel of polymorphisms associated with the accumulation of mutations in DNA.

Funding: The study was supported by the Russian Ministry of Science and Higher Education project No. 121031300041-4; the part of the work involving mutagenesis, enzyme purification, and kinetic analysis of POL β was specifically funded by the Russian Science Foundation, grant No. 21-74-10103.