


doi 10.18699/vjgb-25-111

# Молекулярно-динамический анализ функциональной роли аминокислотных остатков V99, F124 и S125 ДНК-диоксигеназы человека ABH2

М. Чжао <sup>1</sup>, Т.Е. Тюгашев <sup>2</sup>, А.Т. Давлетгильдеева <sup>2</sup>, Н.А. Кузнецов <sup>1, 2</sup> 

<sup>1</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 kuznetsov@1bio.ru

**Аннотация.** ДНК-диоксигеназа человека ABH2 относится к семейству AlkB-подобных негемовых диоксигеназ, которые действуют на широкий спектр субстратов и обладают сложным каталитическим механизмом с участием  $\alpha$ -кетоглутарата и иона Fe(II) в качестве кофактора. Представители семейства AlkB катализируют прямое окисление алкильных заместителей в азотистых основаниях ДНК и РНК, обеспечивая защиту от мутагенного воздействия эндогенных и экзогенных алкилирующих агентов, а также участвуя в регуляции уровня метилирования некоторых РНК. Фермент ABH2, локализованный преимущественно в ядре клетки, проявляет специфичность к двуцепочечным ДНК-субстратам и, в отличие от большинства других AlkB-подобных ферментов человека, обладает довольно широким спектром субстратной специфичности, окисляя алкильные группы таких модифицированных азотистых оснований, как, например,  $N^1$ -метиладенозин,  $N^3$ -метилцитидин,  $1,N^6$ -этенoadенозин и  $3,N^4$ -этенотидин. В данной работе с целью анализа механизма, обеспечивающего субстратную специфичность фермента, и выяснения функциональной роли аминокислотных остатков в составе активного центра нами выполнено молекулярно-динамическое моделирование комплексов фермента ABH2 дикого типа и его мутантных форм, содержащих аминокислотные замены V99A, F124A или S125A, с двумя типами ДНК-субстратов, несущих метилированные основания  $N^1$ -метиладенин или  $N^3$ -метилцитозин. Установлено, что замена V99A приводит к увеличению подвижности белковых петель L1 и L2, участвующих в связывании ДНК-субстрата, и изменяет распределение  $\pi$ - $\pi$ -контактов боковой цепи остатка F102 с азотистыми основаниями, расположенными рядом с поврежденным нуклеотидом. Замена F124A приводит к потере  $\pi$ - $\pi$ -стэкинга с поврежденным основанием, что, в свою очередь, дестабилизирует архитектуру активного центра, вызывает нарушение взаимодействия с ионом железа и препятствует оптимальному каталитическому позиционированию  $\alpha$ -кетоглутарата в активном центре. Замена S125A приводит к потере прямого взаимодействия петли L2 с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида, ослабляя связывание фермента с ДНК-субстратом. Таким образом, полученные данные позволили установить функциональную роль трех аминокислотных остатков активного центра и расширить понимание структурно-функциональных связей в процессах узнавания поврежденного нуклеотида и формирования каталитического комплекса ферментом ABH2 человека.

**Ключевые слова:** репарация ДНК; метилирование оснований; ДНК-диоксигеназа человека ABH2; МД-моделирование; функциональная роль аминокислотных остатков

**Для цитирования:** Чжао М., Тюгашев Т.Е., Давлетгильдеева А.Т., Кузнецов Н.А. Молекулярно-динамический анализ функциональной роли аминокислотных остатков V99, F124 и S125 ДНК-диоксигеназы человека ABH2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(7):1062-1072. doi 10.18699/vjgb-25-111

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания № 121031300041-4.


**Благодарности.** Работа проведена с использованием ресурсов ИВЦ НГУ.

## Molecular dynamic analysis of the functional role of amino acid residues V99, F124 and S125 of human DNA dioxygenase ABH2

М. Zhao <sup>1</sup>, T.E. Tyugashev <sup>2</sup>, A.T. Davletgildeeva <sup>2</sup>, N.A. Kuznetsov <sup>1, 2</sup> 

<sup>1</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 kuznetsov@1bio.ru

**Abstract.** The ABH2 enzyme belongs to the AlkB-like family of Fe(II)/ $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. Various non-heme dioxygenases act on a wide range of substrates and have a complex catalytic mechanism involving  $\alpha$ -ketoglutarate and an Fe(II) ion as a cofactor. Representatives of the AlkB family catalyze the direct oxidation of alkyl

substituents in the nitrogenous bases of DNA and RNA, providing protection against the mutagenic effects of endogenous and exogenous alkylating agents, and also participate in the regulation of the methylation level of some RNAs. DNA dioxygenase ABH2, localized predominantly in the cell nucleus, is specific for double-stranded DNA substrates and, unlike most other human AlkB-like enzymes, has a fairly broad spectrum of substrate specificity, oxidizing alkyl groups of such modified nitrogenous bases as, for example,  $N^1$ -methyladenosine,  $N^3$ -methylcytidine,  $1,N^6$ -ethenoadenosine and  $3,N^4$ -ethenocytidine. To analyze the mechanism underlying the enzyme's substrate specificity and to clarify the functional role of key active-site amino acid residues, we performed molecular dynamics simulations of complexes of the wild-type ABH2 enzyme and its mutant forms containing amino acid substitutions V99A, F124A and S125A with two types of DNA substrates carrying methylated bases  $N^1$ -methyladenine and  $N^3$ -methylcytosine, respectively. It was found that the V99A substitution leads to an increase in the mobility of protein loops L1 and L2 involved in binding the DNA substrate and changes the distribution of  $\pi$ - $\pi$  contacts between the side chain of residue F102 and nitrogenous bases located near the damaged nucleotide. The F124A substitution leads to the loss of  $\pi$ - $\pi$  stacking with the damaged base, which in turn destabilizes the architecture of the active site, disrupts the interaction with the iron ion and prevents optimal catalytic positioning of  $\alpha$ -ketoglutarate in the active site. The S125A substitution leads to the loss of direct interaction of the L2 loop with the 5'-phosphate group of the damaged nucleotide, weakening the binding of the enzyme to the DNA substrate. Thus, the obtained data revealed the functional role of three amino acid residues of the active site and contributed to the understanding of the structural-functional relationships in the recognition of a damaged nucleotide and the formation of a catalytic complex by the human ABH2 enzyme.

**Key words:** DNA repair; base methylation; human DNA dioxygenase ABH2; MD modeling; functional role of amino acid residues

**For citation:** Zhao M., Tyugashev T.E., Davletgildeeva A.T., Kuznetsov N.A. Molecular dynamic analysis of the functional role of amino acid residues V99, F124 and S125 of human DNA dioxygenase ABH2. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(7):1062-1072. doi 10.18699/vjgb-25-111

## Введение

Стабильность генетической информации, закодированной в виде последовательности нуклеотидов ДНК, чрезвычайно важна для нормального функционирования и выживания отдельных клеток, организмов и видов в целом (Travers, Muskheishvili, 2015). При этом клеточная ДНК всех живых организмов регулярно подвергается повреждающему воздействию различных эндогенных и экзогенных факторов, таких как химические активные реагенты и метаболиты, ионизирующее и УФ-излучение и др. (Ougland et al., 2015). У живых организмов в ходе эволюции появилось множество различных путей репарации повреждений, возникающих в геномной ДНК, некоторые из которых представлены только одним ферментом, а другие включают последовательную и согласованную работу целых ферментативных каскадов (Yi et al., 2009; Li et al., 2013; Müller, Hausinger, 2015; Ougland et al., 2015).

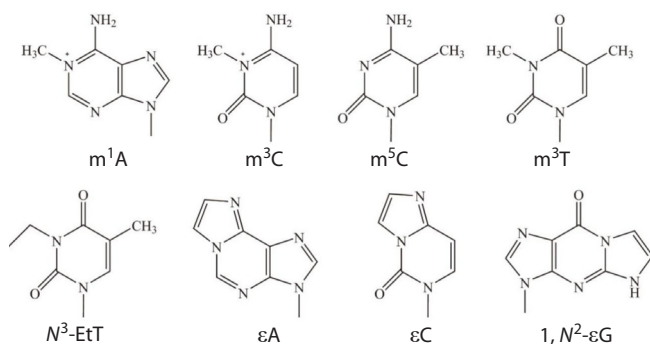
Среди ферментов, принимающих участие в узнавании и удалении необъемных единичных повреждений азотистых оснований ДНК, можно выделить следующие: 1) ДНК-гликозилазы, удаляющие поврежденные азотистые основания с образованием в ДНК апуриновых/апиримидиновых сайтов, которые далее процессируются с восстановлением исходной структуры ДНК другими ферментами системы эксцизионной репарации оснований (BER) (Ringvoll et al., 2006; Chen et al., 2010; Li et al., 2013); 2)  $O^6$ -алкилгуанин-ДНК-алкилтрансферазы (AGT), переносящие алкильный аддукт на собственный цистеиновый остаток (Ringvoll et al., 2006); 3) фотолиазы, отвечающие за удаление УФ-индуцированных фотоповреждений, таких как циклобутан-пиримидиновые димеры и пиримидин-пиримидиновые фотопродукты (Yi, He, 2013); 4) диоксигеназы семейства AlkB, входящие в суперсемейство Fe(II)/ $\alpha$ -кетоглутарат( $\alpha$ KG)-зависимых диоксигеназ, которые используют негемовое железо в качестве кофактора и  $\alpha$ KG в качестве косубстрата для прямого окисления алкильных

групп в поврежденных основаниях ДНК (Yang et al., 2009; Yi et al., 2009; Kuznetsov et al., 2021). Следует отметить, что разнообразие путей репарации необъемных повреждений ДНК связано с большим разнообразием возможных химических модификаций азотистых оснований.

Представители семейства Fe(II)/ $\alpha$ KG-зависимых диоксигеназ AlkB, обнаруженные у человека, в последние годы вызывают особый интерес из-за участия их в репарации алкилированных оснований ДНК. Считается, что ферменты данного семейства могут играть важную роль в прогрессировании некоторых онкологических заболеваний, поскольку они часто сверхэкспрессируются в опухолевых клетках и нивелируют эффект алкилирующих препаратов, используемых в химиотерапии. ABH2 – один из первых идентифицированных у человека представителей семейства AlkB-подобных диоксигеназ (Duncan et al., 2002; Aas et al., 2003). Изменение уровня экспрессии ABH2 оказывает влияние на эффективность удаления некоторых токсичных повреждений ДНК в опухолевых клетках, что делает этот фермент потенциальным маркером для диагностики онкологических заболеваний и возможной терапевтической мишенью (Wilson et al., 2018).

Известно, что ABH2 проявляет активность как минимум по отношению к восьми различным алкилированным основаниям ДНК, а именно: к  $N^1$ -метиладенозину ( $m^1A$ ),  $N^3$ -метилцитидину ( $m^3C$ ),  $N^3$ -метилтимидину ( $m^3T$ ),  $N^3$ -этилтимидину ( $N^3$ -EtT),  $1,N^6$ -этенотеноаденозину ( $\epsilon A$ ),  $3,N^4$ -этенотимидину ( $\epsilon C$ ),  $1,N^2$ -этенотеногуанозину ( $1,N^2$ - $\epsilon G$ ) и 5-метилцитидину ( $m^5C$ ) (рис. 1) (Falnes, 2004; Ringvoll et al., 2006, 2008; Bian et al., 2019).

Метилирование – самый распространенный тип повреждений оснований ДНК, вызванных воздействием алкилирующих агентов (Sall et al., 2022), а  $m^1A$  и  $m^3C$  являются субстратами, наиболее эффективно удаляемыми ABH2 из двуцепочечной ДНК (дцДНК) (Duncan et al., 2002; Aas et al., 2003; Xu et al., 2021). D.H. Lee с коллега-



**Рис. 1.** Алкилированные азотистые основания, являющиеся субстратами для ДНК-диоксигеназы человека ABH2.

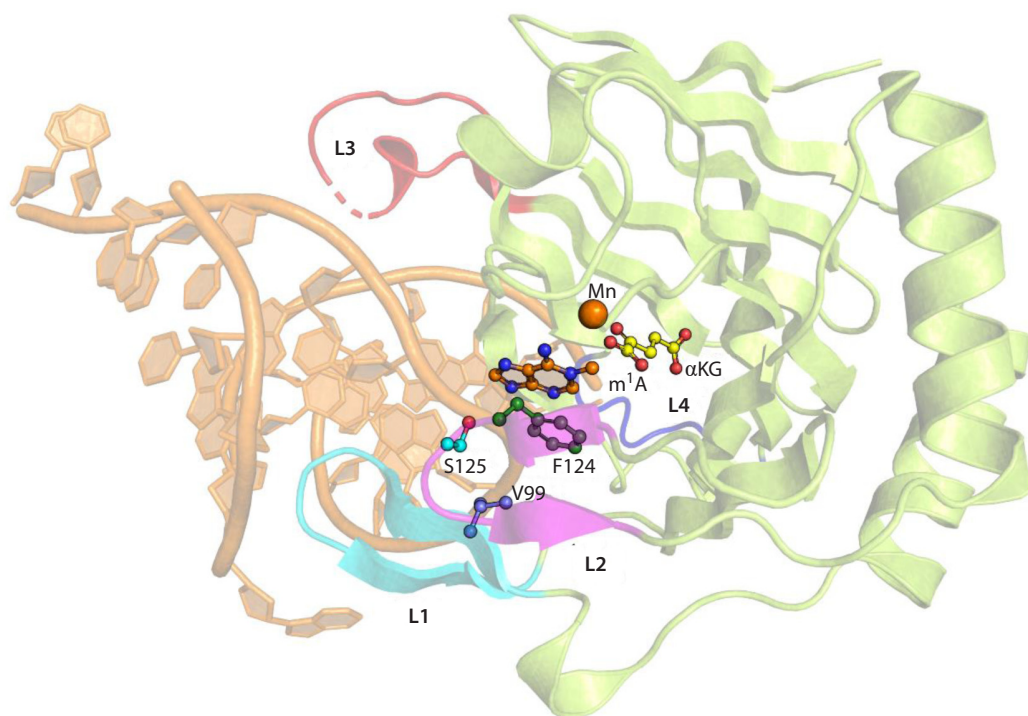
ми показали, что ABH2 окисляет  $m^1A$  и  $m^3C$  в контексте дцДНК как минимум в два раза эффективнее, по сравнению с одноцепочечной ДНК (оцДНК) (Lee et al., 2005).

Известные на сегодняшний день структурные данные позволяют предположить особенности функционирования фермента ABH2 и механизм, обеспечивающий его субстратную специфичность. ABH2 содержит высококонсервативный каталитический домен – двуцепочечный  $\beta$ -спиральный домен (DSBH) суперсемейства Fe(II)/ $\alpha$ KG-зависимых диоксигеназ. Неструктурированный N-концевой фрагмент ABH2 также включает мотив связывания ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) (Xu et al., 2021). Триплет, состоящий из двух аминокислотных остатков гистидина и одного аспартата (H171, H236 и D173), координирует кофактор Fe(II) в активном центре фермента (Giri et al., 2011; Xu et al., 2021). Амино-

кислотный остаток D173 посредством взаимодействия с остатком R254 также принимает участие в формировании сети водородных связей, включающей аминокислотные остатки N159, Y161, R248, T252 и R254, координирующие косубстрат  $\alpha$ KG в активном центре фермента (Waheed et al., 2020).

Активный центр ABH2 окружен четырьмя функциональными петлями, L1–L4 (рис. 2). Эти петли играют ключевую роль в стабилизации положения ДНК-субстрата в активном центре фермента (Xu et al., 2021). Петля L1, включающая аминокислотные остатки 98–107, содержит гидрофобную шпильку V101-F102-G103, с помощью которой происходит «тестирование» стабильности пар оснований в субстрате. Если поврежденное основание формирует нестабильную пару со своим партнером из комплементарной цепи, остатки V101 и F102 индуцируют выворачивание поврежденного нуклеотида в активный центр. При этом освободившееся пространство в дуплексе ДНК заполняется остатком F102, стабилизирующим вывернутое положение нуклеотида за счет  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия с окружающими основаниями (Chen et al., 2010, 2014; Yi et al., 2012; Xu et al., 2021).

Петля L2, включающая аминокислотные остатки 122–129, вместе с петлей L1 образует так называемую крышку распознавания нуклеотидов (NRL). Аминокислотный остаток Y122 участвует в сети водородных связей, формирующей каталитически компетентное состояние активного центра фермента (Davletgildeeva et al., 2023); остаток S125 образует водородную связь с 5'-фосфатом вывернутого поврежденного нуклеотида; аминокислотные остатки F124 и H171 образуют  $\pi$ - $\pi$ -стэкинг с вывернутым азотистым основанием (Chen et al., 2010, 2014;



**Рис. 2.** Кристаллографическая структура комплекса ABH2 с дцДНК, содержащей  $m^1A$  (PDB ID 3BUC).

Отмечены петли L1–L4; показаны поврежденное азотистое основание  $m^1A$ ,  $\alpha$ KG и ион Mn<sup>2+</sup>, а также рассматриваемые в данной работе аминокислотные остатки V99, F124 и S125.

Lenz et al., 2020). Аминокислотный остаток S125 также участвует в формировании стенки кармана, связывающего повреждение, наряду с остатками V99, R110 и I168 (Davletgildeeva et al., 2023).

Следует отметить, что V99 занимает важное положение в сети гидрофобных остатков, сформированных V101, V108, F124 и L127 (Monsen et al., 2010). Петля L3, включающая аминокислотные остатки 198–213, и петля L4, состоящая из аминокислотных остатков 237–247, играют важную роль в связывании с дцДНК субстратом. Аминокислотные остатки R198, R203 и K205 в петле L3 и последовательность RKK (R241-K242-K243) в петле L4 формируют контакты с цепью ДНК, комплементарной поврежденной цепи, тем самым обеспечивая эффективное связывание дцДНК субстрата ферментом ABH2 (Yang et al., 2008; Yi et al., 2009; Waheed et al., 2020).

Молекулярно-динамический анализ структурных данных и экспериментальная проверка активности рекомбинантных препаратов ABH2 дикого типа и ряда его мутантных форм, проведенные нашей группой ранее, позволили установить роль аминокислотных остатков Y122, I168 и D173, которые образуют прямые контакты с основаниями  $m^1A$ ,  $m^3C$ , а также  $m^5C$  в кармане активного центра (Davletgildeeva et al., 2023). Сравнительный анализ ферментов выявил влияние замен данных аминокислотных остатков на каталитическую активность фермента и лишь незначительное уменьшение эффективности связывания ДНК. Полученные данные позволили предположить, что эти остатки отвечают за прецизионное позиционирование вывернутого поврежденного нуклеотида в кармане активного центра, которое обеспечивает эффективное протекание каталитической реакции (Davletgildeeva et al., 2023).

Нужно отметить, что широкий спектр субстратной специфичности фермента ABH2 и сложный каталитический механизм действия, включающий кофактор и косубстрат для осуществления реакции, осложняют детальные исследования молекулярного механизма узнавания поврежденной ДНК и формирования каталитически компетентного комплекса, а также локальных конформационных изменений, влияющих на эффективность каталитической реакции. В связи с этим в настоящем исследовании с целью дальнейшего выяснения механизма субстратной специфичности ДНК-диоксигеназы ABH2 с применением метода молекулярной динамики проведен анализ функциональной роли трех аминокислотных остатков, V99, F124 и S125, участвующих в формировании кармана, в котором располагается вывернутый нуклеотид, содержащий поврежденное основание.

## Материалы и методы

Модели комплексов были построены на основе рентгенографических структур комплексов ABH2-дцДНК с ионом металла ( $Mn^{2+}$ ) и  $\alpha KG$ : 3BUC (для  $m^1A$ ) и 3RZJ (для  $m^3C$ ) (Yang et al., 2008; Yi et al., 2012). Изменение последовательности ДНК, исправление неразрешенных аминокислотных остатков и модификаций фермента выполнены с помощью Chimera и Modeller (Šali, Blundell, 1993), оптимизация протонирования ионизируемых групп – с использованием сервера H++ (Anandakrishnan et al., 2012). МД-моделирование осуществляли в GROMACS (Abraham

et al., 2015). Комплекс был помещен в додэкаэдрическую ячейку с TIP3P водой и 50 mM KCl (Jorgensen et al., 1983; Joung, Cheatham, 2008), для описания комплекса использовали силовое поле AMBER14SB/OL15 (Cornell et al., 1995; Zgarbová et al., 2011, 2015; Maier et al., 2015).

Параметризация для  $m^1A$ ,  $m^3C$  и  $\alpha KG$  проведена с использованием модуля Antechamber (пакет AMBER); заряды RESP рассчитаны на сервере REDD; топологии модифицированных остатков преобразованы в формат GROMACS с помощью ACPYPE (Bayly et al., 1993; Wang et al., 2004, 2006; Vanquelef et al., 2011; Sousa da Silva, Vranken, 2012).

С целью сохранения октаэдрической координационной геометрии иона  $Fe^{2+}$  при возможных возмущениях активного центра, вносимых заменой аминокислотных остатков, для описания иона применяли модель с разнесенными зарядами (Jiang et al., 2016). Для МД-расчетов применяли следующие параметры: минимизация энергии системы методом наискорейшего спуска; пороговое значение ван-дер-ваальсовых взаимодействий установлено на 10 Å; учет дальнедействующих кулоновских взаимодействий по методу PME (particle mesh Ewald) (Essmann et al., 1995); ограничение колебаний ковалентных связей атомов водорода методом LINCS (Hess et al., 1997).

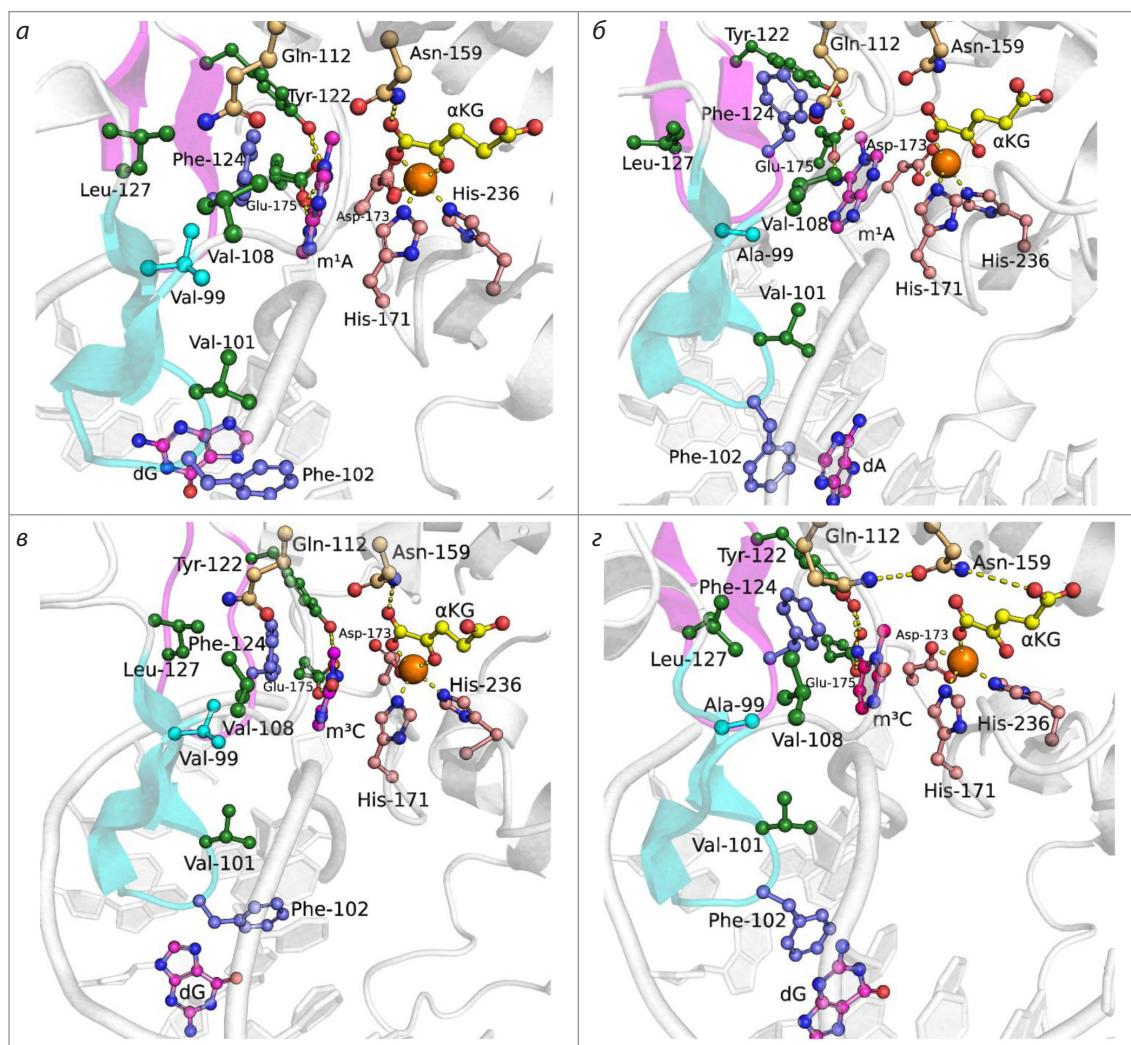
После минимизации система нагревалась до 310 K в NVT-ансамбле в течение 500 пс с использованием термостата V-rescale (Bussi et al., 2007). Затем проводили уравнивание в NPT-ансамбле в течение 1 нс, давление поддерживалось на уровне 1 бар с помощью баростата Парринелло–Рахмана (Parrinello, Rahman, 1981).

Расчеты методом классической молекулярной динамики выполняли длительностью 250 нс не менее трех раз. Анализ траекторий проводили с использованием встроенных средств GROMACS и библиотеки MDTraj (McGibbon et al., 2015). Изменение распределения между устойчивыми состояниями комплексов фермента ABH2 дикого типа и его мутантных форм с ДНК-субстратами показано в графиках распределения расстояний между ключевыми атомами при моделировании. Распределение межатомных расстояний в МД-траектории представлено в виде гистограммы с шагом 0.1 Å и высотой шага, равной процентной доле кадров траектории, в которых расстояние попадает в соответствующий диапазон значений. Для каждой траектории сумма долей на всем диапазоне расстояний равна 100 %.

## Результаты и обсуждение

### Модель фермент-субстратного комплекса ABH2 V99A с поврежденной ДНК

При моделировании фермент-субстратных комплексов и с  $m^1A$ -содержащим дцДНК-субстратом (далее  $m^1A$ -ДНК, рис. 3, а, б), и с  $m^3C$ -содержащим дцДНК-субстратом (далее  $m^3C$ -ДНК, см. рис. 3, в, г) замена V99A приводила к изменениям как в области петель L1 и L2, взаимодействующих с вывернутым в активный центр фермента нуклеотидом и близлежащим участком дцДНК, так и в области связывания косубстрата. Так, в модели комплекса с  $m^1A$ -ДНК боковая цепь аминокислотного остатка F124 утратила  $\pi$ - $\pi$ -стэкинговые взаимодействия с осно-



**Рис. 3.** Репрезентативные МД-структуры ABH2 WT в комплексе с  $m^1A$ -ДНК (а) и  $m^3C$ -ДНК (б) и ABH2 V99A в комплексе с  $m^1A$ -ДНК (в) и  $m^3C$ -ДНК (г).

Показаны ключевые аминокислотные остатки активного центра, поврежденное азотистое основание,  $\alpha KG$  и ион  $Mn^{2+}$ . Петли L1 и L2 выделены голубым и розовым цветом соответственно.

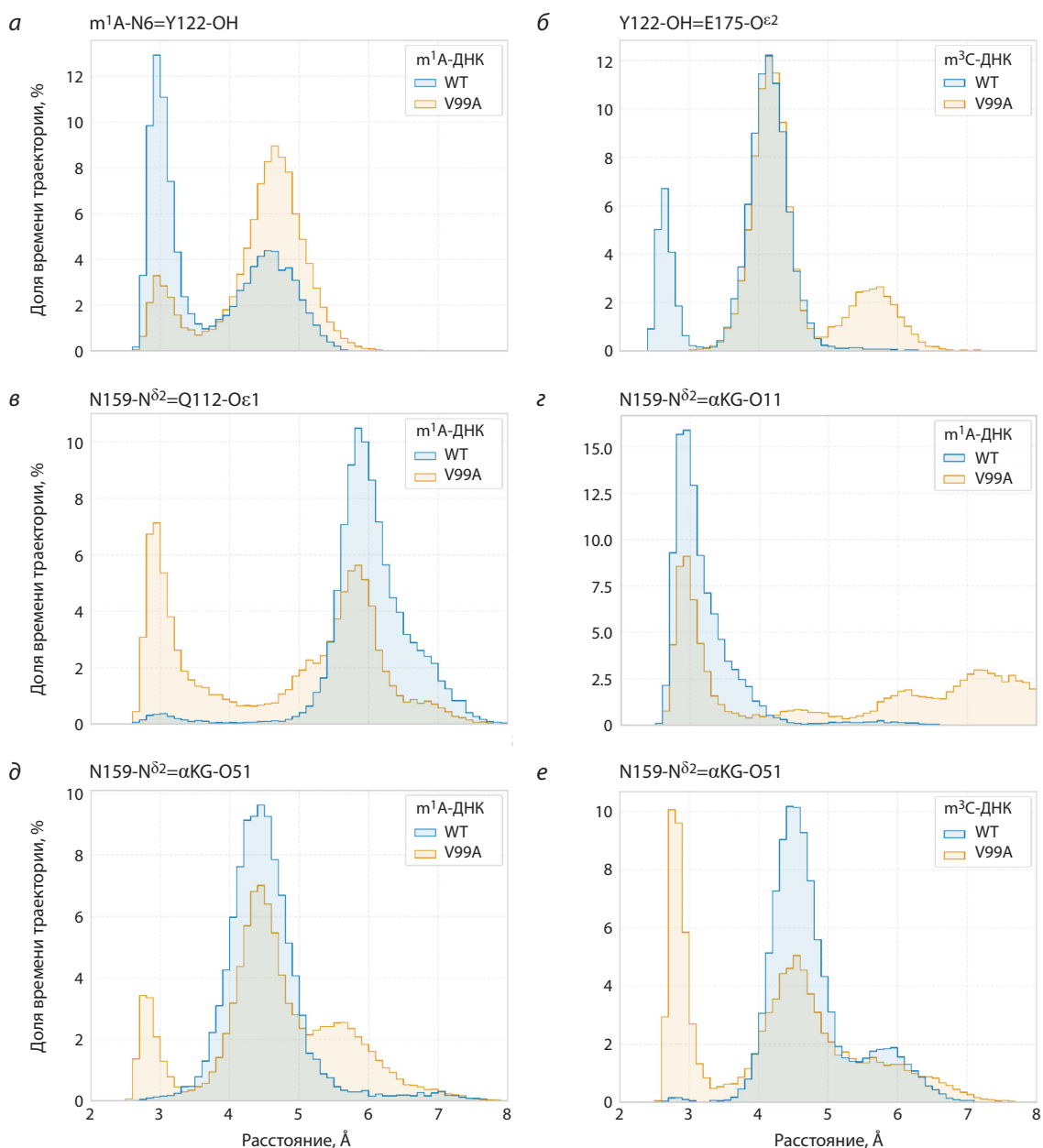
ванием вывернутого в активный центр нуклеотида (см. рис. 3, а, б). При этом уменьшилось время существования водородной связи между гидроксильной группой Y122 и экзоциклической аминогруппой поврежденного основания (рис. 4, а). В модели комплекса с  $m^3C$ -содержащим дцДНК-субстратом также происходила частичная потеря контакта между гидроксильной группой боковой цепи Y122 и карбоксильной группой боковой цепи E175 (см. рис. 4, б), что также нарушает сеть контактов, стабилизирующих вывернутое основание.

Замена V99A индуцировала изменение положения интеркалирующего в ДНК остатка F102, входящего в состав петли L1. При этом в комплексе с  $m^1A$ -ДНК происходило перераспределение  $\pi$ - $\pi$ -контактов, формируемых F102, от азотистого основания комплементарной цепи у WT фермента (см. dG на рис. 3, а) к азотистому основанию поврежденной цепи в случае ABH2 V99A (см. dA на рис. 3, б).

Значения двугранного угла C- $\alpha$ -C $\beta$ -C $\gamma$  у остатка F102 составляли  $148.1 \pm 55.3^\circ$  для WT фермента и  $127.2 \pm 47.7^\circ$

для мутантной формы V99A, что свидетельствует о стабильности данных положений в процессе молекулярной динамики. Тогда как в комплексе с  $m^3C$ -ДНК замена V99A индуцировала значительное увеличение подвижности его боковой цепи (двугранный угол C- $\alpha$ -C $\beta$ -C $\gamma$  равен  $135.6 \pm 58.6$  и  $100.2 \pm 100.3^\circ$  для WT и V99A соответственно). Повышение подвижности остатка F102 приводит к тому, что комплементарный  $m^3C$  гуанин (см. dG на рис. 3, в, г), в комплексе фермента дикого типа бывший полностью вывернутым из двойной цепи ДНК, в комплексе мутантной формы фермента имеет возможность вернуться внутрь структуры ДНК, вступая в  $\pi$ - $\pi$ -контакт с боковой цепью F102.

Замена V99A также индуцировала изменения во взаимодействии с косубстратом, которые привели к тому, что на половине общего времени траектории моделирования  $\alpha KG$  принимает каталитически неблагоприятную конформацию. Изменения положения гидрофобных остатков V108, F124, L127 и L129 в петлях L1 и L2 приводят к переориентации аминокислотных остатков Q112 и



**Рис. 4.** Распределение расстояний между ключевыми атомами при моделировании комплексов фермента ABH2 дикого типа и его мутантной формы V99A с ДНК-субстратами.

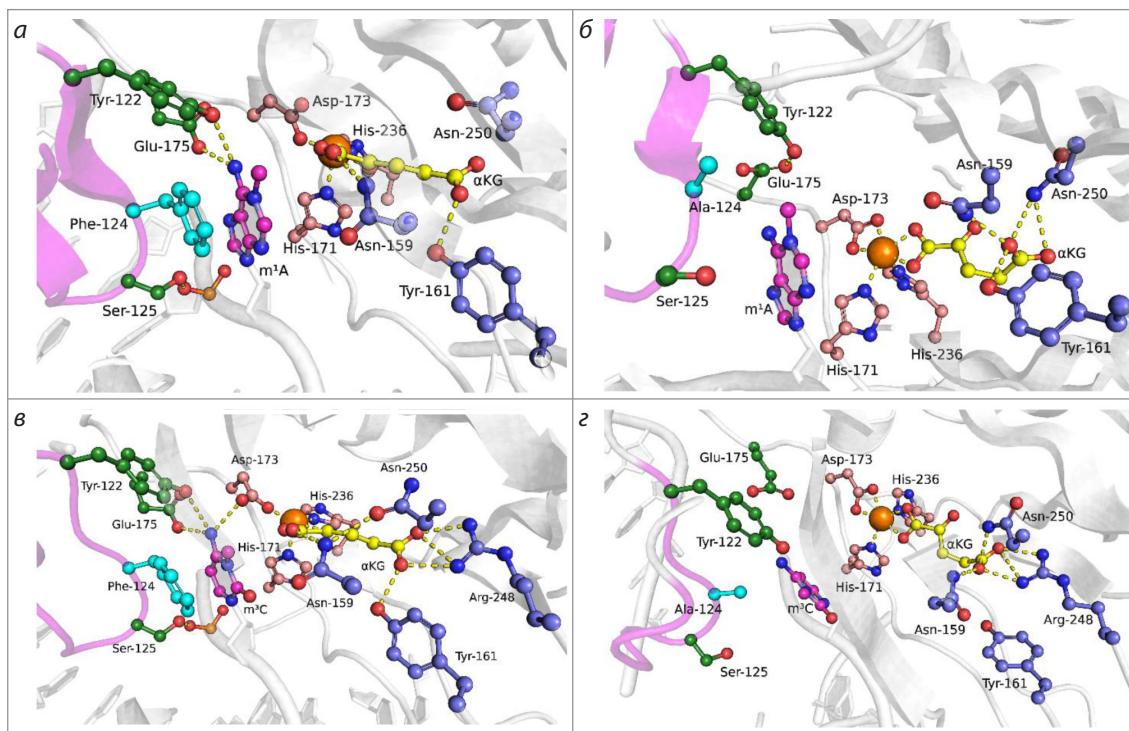
N159. В свою очередь, в ферменте дикого типа боковая цепь N159 является одним из элементов сети контактов, поддерживающих каталитически компетентную ориентацию косубстрата, образуя водородную связь с  $\alpha$ -карбоксильной группой  $\alpha$ KG. Сближение боковых цепей Q112 и N159 в мутантной форме ABH2 V99A (см. рис. 4, в) приводит к переносу водородной связи амидной группы N159 с  $\alpha$ -карбоксильной группы  $\alpha$ KG (см. рис. 4, з) на  $\omega$ -карбоксильную группу  $\alpha$ KG (см. рис. 4, д, е), провоцируя его смещение из оптимального для катализа положения.

Таким образом, результаты моделирования позволяют предположить, что замена V99A, приводя к нарушениям связывания и субстрата, и косубстрата в активном центре фермента, должна вызвать значительное снижение актив-

ности. Эти данные хорошо согласуются с экспериментальными результатами, полученными ранее для мутантной формы V99A и выявившими значительное снижение (Monsen et al., 2010) или полную потерю (Davletgildeeva et al., 2025) каталитической активности ABH2 V99A по отношению к дцДНК-субстратам, содержащим m<sup>1</sup>A или m<sup>3</sup>C в качестве повреждения.

#### Модель фермент-субстратного комплекса ABH2 F124A с поврежденной ДНК

Для определения функциональной роли остатка F124 выполнено моделирование комплексов мутантной формы ABH2 F124A с m<sup>1</sup>A- и m<sup>3</sup>C-содержащими дцДНК (рис. 5). Детальный анализ изменения распределения расстояний между ключевыми атомами активного центра в случае



**Рис. 5.** Репрезентативные МД-структуры комплексов ABH2 WT с m<sup>1</sup>A-ДНК (а) и m<sup>3</sup>C-ДНК (б) и ABH2 F124A с m<sup>1</sup>A-ДНК (б) и m<sup>3</sup>C-ДНК (г).

Показаны ключевые аминокислотные остатки активного центра, поврежденное азотистое основание,  $\alpha$ KG и ион Mn<sup>2+</sup>. Петля L2 выделена розовым цветом.

замены F124A выявил дестабилизацию и вывернутого метилированного азотистого основания, и  $\alpha$ KG в активном центре фермента.

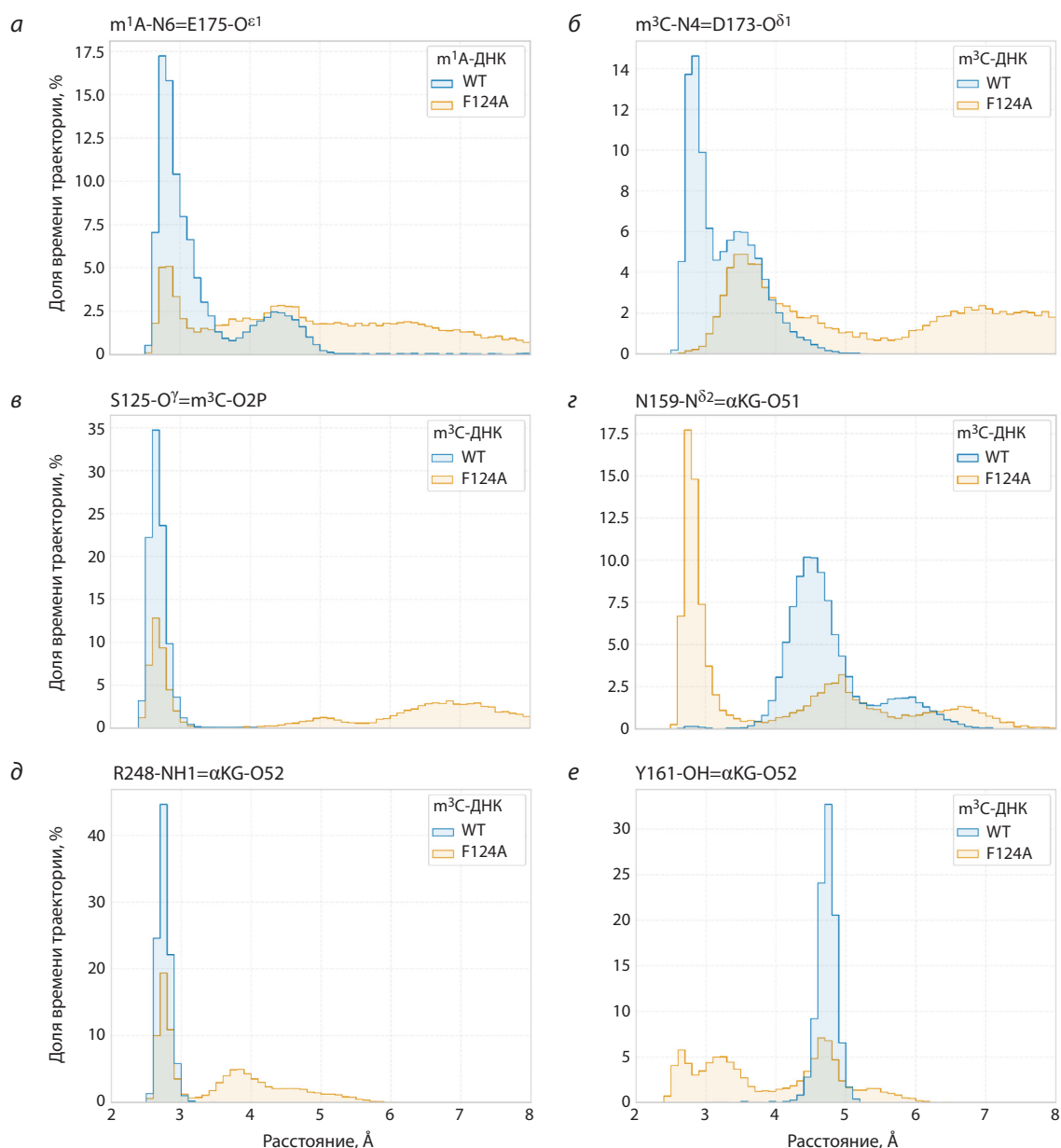
Так, замена F124A, непосредственно приводящая к потере  $\pi$ - $\pi$ -стекинга между боковой цепью F124 и азотистым основанием, индуцировала поворот и смещение вывернутого основания из активного центра фермента с сопутствующей потерей водородных связей с боковыми цепями остатков Y122, D173, E175 (рис. 6, а, б). При этом утрачивается и водородная связь между гидроксильной группой остатка S125 и соответствующей фосфатной группой остова нуклеотида, отражая ухудшение контакта между петлями L2 и ДНК (см. рис. 6, в).

Косубстрат также теряет каталитически компетентное положение в результате перестроения сети водородных связей с участием координирующих его аминокислотных остатков. Амидная группа N159 поддерживает водородную связь преимущественно с  $\omega$ -карбоксильной группой  $\alpha$ KG вместо  $\alpha$ -карбоксильной группы (см. рис. 6, г). Дестабилизация положения косубстрата отражается в изменении характера контактов между боковыми цепями остатков Y161 и R248 и  $\omega$ -карбоксильной группой  $\alpha$ KG. Если в комплексе фермента дикого типа сохраняются устойчивые водородные связи между гуанидиновой группой R248 и атомом O2  $\omega$ -карбоксильной группы  $\alpha$ KG и между гидроксильной группой Y161 и атомом O1  $\omega$ -карбоксильной группы, то в комплексе мутантной формы ABH2 F124A происходит расширение распределения данных расстояний, свидетельствующее о дестабилизации контактов (см. рис. 6, д, е).

Результаты моделирования указывают на то, что аминокислотный остаток F124 играет важную роль в структуре активного центра фермента ABH2. Этот вывод согласуется с данными работ (Chen et al., 2010; Monsen et al., 2010), а также с результатами, полученными ранее (Davletgildeeva et al., 2025), согласно которым мутантная форма ABH2 F124A полностью утратила каталитическую активность по отношению к m<sup>1</sup>A- и m<sup>3</sup>C-содержащим ДНК субстратам.

#### Модель фермент-субстратного комплекса ABH2 S125A с поврежденной ДНК

Замена S125A в ферменте ABH2 вызывает потерю водородной связи между гидроксильной группой аминокислотного остатка и 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида, что приводит к потере прямого взаимодействия петли L2 с m<sup>1</sup>A- (рис. 7, а, б) и m<sup>3</sup>C-ДНК (см. рис. 7, в, г). Анализ изменения расстояний между ключевыми остатками активного центра показал, что в комплексе фермента и m<sup>1</sup>A-ДНК потеря взаимодействия петли L2 с ДНК вызывает потерю водородной связи между гидроксильной группой остатка Y122 из L2 и экзоциклической аминогруппой m<sup>1</sup>A (рис. 8, а). При этом происходит сближение гуанидиновых групп остатков R110 и R172 с O3' атомом нуклеотида вывернутого азотистого основания и O5' атомом нуклеотида, расположенного с 5'-стороны от вывернутого азотистого основания, соответственно (см. рис. 8, б, в). Таким образом, в случае ДНК-субстрата, содержащего m<sup>1</sup>A, замена S125A приводит к тому, что аминокислотные остатки R110 и R172 более прочно связываются с сахарофосфатным остовом ДНК.



**Рис. 6.** Распределение расстояний между ключевыми атомами при моделировании комплексов фермента ABH2 дикого типа и его мутантной формы F124A с ДНК-субстратами.

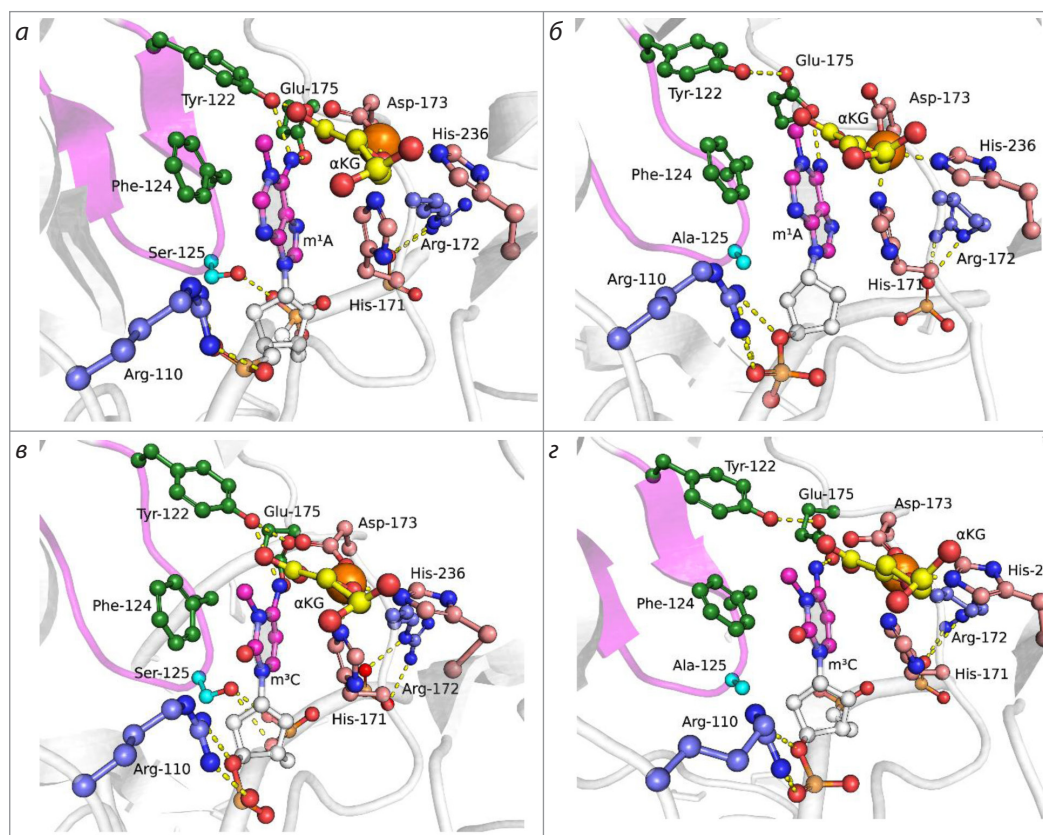
В отличие от комплекса фермента ABH2 S125A с  $m^1A$ -ДНК, в модели комплекса с  $m^3C$ -ДНК не происходит сближения гуанидиновых групп остатков R110 и R172 с сахарофосфатным остовом (см. рис. 7, в, з). При этом по сравнению с ферментом WT в случае замены S125A снижается стабильность водородной связи между боковой цепью остатка E175 и экзоциклической аминогруппой  $m^3C$  (см. рис. 8, з).

Ухудшение прямого контакта с вывернутым основанием и возможная компенсаторная перестройка при замене S125A в активном центре ABH2 согласуются с результатами, полученными В. Chen с коллегами (2010), поскольку в их работе показано, что мутантная форма ABH2 S125A сохраняет каталитическую активность по отношению к дцДНК, содержащей в качестве повреждения  $m^1A$ . Однако в более поздней работе (Davletgildeeva et al., 2025) про-

демонстрировано, что данная замена приводит к потере каталитической активности ABH2 по отношению как к  $m^3C$ -, так к  $m^1A$ -содержащей ДНК в использованных реакционных условиях. Это позволяет предположить, что компенсаторные перестройки, возникающие, согласно данным моделирования, в структуре ABH2 при замене S125A, не способны в полной степени сохранять каталитическую активность фермента на всех типах ДНК-субстратов.

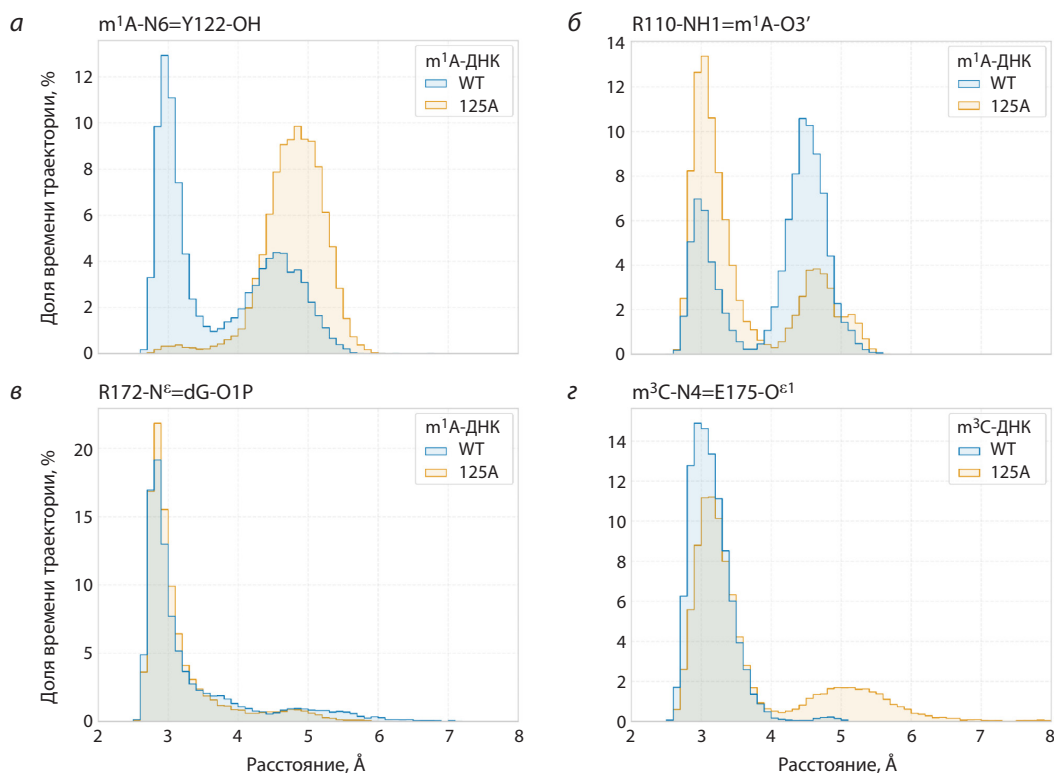
## Закключение

Введение замены V99A в фермент ABH2 оказывало влияние на другие аминокислотные остатки, формирующие гидрофобную сеть, частью которой является заменяемый остаток. Это оказывало негативное влияние на функциональные петли L1 и L2, вызывая дестабилизацию их по-



**Рис. 7.** Репрезентативные МД-структуры комплексов ABH2 WT с m<sup>1</sup>A-ДНК (а) и m<sup>3</sup>C-ДНК (б) и ABH2 S125A с m<sup>1</sup>A-ДНК (в) и m<sup>3</sup>C-ДНК (г).

Показаны ключевые аминокислотные остатки активного центра, поврежденное азотистое основание, αKG и ион Mn<sup>2+</sup>. Петля L2 выделена розовым цветом.



**Рис. 8.** Распределение расстояний между ключевыми атомами при моделировании комплексов фермента ABH2 дикого типа и его мутантной формы S125A с ДНК-субстратами.

ложения, что, в свою очередь, вызывало переориентацию или сдвиг ключевых аминокислотных остатков Y122, E175 и F102, входящих в эти петли. Кроме того, замена V99A обуславливала неблагоприятную для катализа конформацию  $\alpha$ KG в активном центре фермента. Полученные данные подтверждают роль аминокислотного остатка V99 в качестве важного участника внутрибелковой координации, необходимой для эффективного окисления метильных групп в поврежденных основаниях ДНК ферментом ABH2.

Замена аминокислотного остатка F124, локализованного в NRL, приводила к тому, что из-за потери  $\pi$ - $\pi$ -стэкинга с поврежденным азотистым основанием и петли L1 и L2, и само поврежденное основание значительно смещались относительно друг друга. Также данная замена была причиной изменения координации иона  $Fe^{2+}$  как за счет изменения типа координации молекулой  $\alpha$ KG, так и возникновения дополнительной координации аминокислотным остатком D173. Полученные данные позволяют предположить чрезвычайную важность аминокислотного остатка F124 в каталитическом процессе, осуществляемом ДНК-диоксигеназой ABH2.

Замена S125A вызывала потерю прямого взаимодействия петли L2 с 5'-фосфатной группой поврежденного нуклеотида, однако, согласно данным МД-моделирования, этот контакт может быть частично компенсирован путем возникновения связей аминокислотных остатков R110 и R172 с сахарофосфатным остовом ДНК. Следует отметить, что такая компенсация контакта была обнаружена лишь в случае комплекса ABH2 S125A с  $m^1A$ -содержащим ДНК субстратом, но не в случае  $m^3C$ , что косвенно свидетельствует о более сложном механизме, отвечающем за узнавание различных повреждений в активном центре фермента.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные МД-моделирования комплексов мутантных форм ДНК-диоксигеназы человека ABH2, содержащих аминокислотные замены V99A, F124A или S125A, с  $m^1A$ - и  $m^3C$ -содержащими ДНК субстратами указывают на важную роль всех трех аминокислотных остатков для обеспечения формирования каталитически компетентного состояния активного центра при взаимодействии с поврежденной ДНК.

## Список литературы / References

Aas P.A., Otterlei M., Falnes P., Vågbo C.B., Skorpen F., Akbari M., Sundheim O., Bjørås M., Slupphaug G., Seeberg E., Krokan H.E. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*. 2003;421:859-863. doi 10.1038/nature01363

Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19-25. doi 10.1016/j.softx.2015.06.001

Anandakrishnan R., Aguilar B., Onufriev A.V. *H++* 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:W537-W541. doi 10.1093/nar/gks375

Bayly C.I., Cieplak P., Cornell W., Kollman P.A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J Phys Chem*. 1993;97:10269-10280. doi 10.1021/j100142a004

Bian K., Lenz S.A.P., Tang Q., Chen F., Qi R., Jost M., Drennan C.L., Essigmann J.M., Wetmore S.D., Li D. DNA repair enzymes ALKBH2, ALKBH3, and AlkB oxidize 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine *in vitro*. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(11):5522-5529. doi 10.1093/nar/gkz395

Bussi G., Donadio D., Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys*. 2007;126(1):014101. doi 10.1063/1.2408420

Chen B., Liu H., Sun X., Yang C.-G. Mechanistic insight into the recognition of single-stranded and double-stranded DNA substrates by ABH2 and ABH3. *Mol Biosyst*. 2010;6(11):2143-2149. doi 10.1039/c005148a

Chen B., Gan J., Yang C. The complex structures of ALKBH2 mutants cross-linked to dsDNA reveal the conformational swing of  $\beta$ -hairpin. *Sci China Chem*. 2014;57:307-313. doi 10.1007/s11426-013-5029-z

Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J Am Chem Soc*. 1995;117(19):5179-5197. doi 10.1021/ja00124a002

Davletgildeeva A.T., Tyugashev T.E., Zhao M., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M., Kuznetsova A.A. Individual contributions of amide acid residues Tyr122, Ile168, and Asp173 to the activity and substrate specificity of human DNA dioxygenase ABH2. *Cells*. 2023;12(14):1839. doi 10.3390/cells12141839

Davletgildeeva A.T., Tyugashev T.E., Zhao M., Ishchenko A.A., Saparbaev M., Kuznetsov N.A. Role of individual amino acid residues directly involved in damage recognition in active demethylation by ABH2 dioxygenase. *Int J Mol Sci*. 2025;26:6912. doi 10.3390/ijms26146912

Duncan T., Treweek S.C., Koivisto P., Bates P.A., Lindahl T., Sedgwick B. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(26):16660-16665. doi 10.1073/pnas.262589799

Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G. A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys*. 1995;103:8577-8593. doi 10.1063/1.470117

Falnes P. Repair of 3-methylthymine and 1-methylguanine lesions by bacterial and human AlkB proteins. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:6260-6267. doi 10.1093/nar/gkh964

Giri N.C., Sun H., Chen H., Costa M., Maroney M.J. X-ray absorption spectroscopy structural investigation of early intermediates in the mechanism of DNA repair by human ABH2. *Biochemistry*. 2011;50(22):5067-5076. doi 10.1021/bi101668x

Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem*. 1997;18(12):1463-1472. doi 10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H

Jiang Y., Zhang H., Tan T. Rational design of methodology-independent metal parameters using a nonbonded dummy model. *J Chem Theory Comput*. 2016;12(7):3250-3260. doi 10.1021/acs.jctc.6b00223

Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys*. 1983;79(2):926-935. doi 10.1063/1.445869

Joung I.S., Cheatham T.E. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *J Phys Chem B*. 2008;112:9020-9041. doi 10.1021/jp8001614

Kuznetsov N.A., Kanazhevskaya L.Y., Fedorova O.S. DNA demethylation in the processes of repair and epigenetic regulation performed by 2-ketoglutarate-dependent DNA dioxygenases. *Int J Mol Sci*. 2021;22:10540. doi 10.3390/ijms221910540

Lee D.H., Jin S.G., Cai S., Chen Y., Pfeifer G.P., O'Connor T.R. Repair of methylation damage in DNA and RNA by mammalian AlkB homologues. *J Biol Chem*. 2005;280(47):39448-39459. doi 10.1074/jbc.M509881200

- Lenz S.A.P., Li D., Wetmore S.D. Insights into the direct oxidative repair of etheno lesions: MD and QM/MM study on the substrate scope of ALKBH2 and AlkB. *DNA Repair (Amst)*. 2020;96:102944. doi 10.1016/j.dnarep.2020.102944
- Li P., Gao S., Wang L., Yu F., Li J., Wang C., Li J., Wong J. ABH2 couples regulation of ribosomal DNA transcription with DNA alkylation repair. *Cell Rep*. 2013;4:817-829. doi 10.1016/j.celrep.2013.07.027
- Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput*. 2015;11:3696-3713. doi 10.1021/acs.jctc.5b00255
- McGibbon R.T., Beauchamp K.A., Harrigan M.P., Klein C., Swails J.M., Hernández C.X., Schwantes C.R., Wang L.-P., Lane T.J., Pande V.S. MDTraj: a modern open library for the analysis of molecular dynamics trajectories. *Biophys J*. 2015;109:1528-1532. doi 10.1016/j.bpj.2015.08.015
- Monsen V.T., Sundheim O., Aas P.A., Westbye M.P., Sousa M.M.L., Slupphaug G., Krokan H.E. Divergent  $\beta$ -hairpins determine double-strand versus single-strand substrate recognition of human AlkB homologues 2 and 3. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:6447-6455. doi 10.1093/nar/gkq518
- Müller T.A., Hausinger R.P. AlkB and its homologues. DNA repair and beyond. In: Schofield C., Hausinger R. (Eds) 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. Royal Society Chemistry. 2015;246-262. doi 10.1039/9781782621959-00246
- Ougland R., Rognes T., Klungland A., Larsen E. Non-homologous functions of the AlkB homologs. *J Mol Cell Biol*. 2015;7(6):494-504. doi 10.1093/jmcb/mjv029
- Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J Appl Phys*. 1981;52(12):7182-7190. doi 10.1063/1.328693
- Ringvoll J., Nordstrand L.M., Vagbo C.B., Talstad V., Reite K., Aas P.A., Lauritzen K.H., Liabakk N.B., Bjork A., Doughty R.W., Falnes P.O., Krokan H.E., Klungland A. Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA. *Embo J*. 2006;25:2189-2198. doi 10.1038/sj.emboj.7601109
- Ringvoll J., Moen M.N., Nordstrand L.M., Meira L.B., Pang B., Bekkelund A., Dedon P.C., Bjelland S., Samson L.D., Falnes P.O., Klungland A. AlkB homologue 2 – mediated repair of ethenoadenine lesions in mammalian DNA. *Cancer Res*. 2008;68(11):4142-4149. doi 10.1158/0008-5472.CAN-08-0796
- Šali A., Blundell T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993;234(3):779-815. doi 10.1006/jmbi.1993.1626
- Sall S.O., Berens J.T.P., Molinier J. DNA damage and DNA methylation. In: Jasiulionis M.G. (Ed.) Epigenetics and DNA Damage. Academic Press, 2022;3-16. doi 10.1016/B978-0-323-91081-1.00005-4
- Sousa da Silva A.W., Vranken W.F. ACPYPE – AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res Notes*. 2012;5:367. doi 10.1186/1756-0500-5-367
- Travers A., Muskhelishvili G. DNA structure and function. *FEBS J*. 2015;282(12):2279-2295. doi 10.1111/febs.13307
- Vanquelf E., Simon S., Marquant G., Garcia E., Klimerak G., Delepine J.C., Cieplak P., Dupradeau F.-Y. R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:W511-W517. doi 10.1093/nar/gkr288
- Waheed S.O., Ramanan R., Chaturvedi S.S., Lehnert N., Schofield C.J., Christov C.Z., Karabenchewa-Christova T.G. Role of structural dynamics in selectivity and mechanism of non-heme Fe(II) and 2-oxoglutarate-dependent oxygenases involved in DNA repair. *ACS Cent Sci*. 2020;6(5):795-814. doi 10.1021/acscentsci.0c00312
- Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem*. 2004;25:1157-1174. doi 10.1002/jcc.20035
- Wang J., Wang W., Kollman P.A., Case D.A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J Mol Graph Model*. 2006;25(2):247-260. doi 10.1016/j.jmglm.2005.12.005
- Wilson D.L., Beharry A.A., Srivastava A., O'Connor T.R., Kool E.T. Fluorescence probes for ALKBH2 allow the measurement of DNA alkylation repair and drug resistance responses. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2018;57(39):12896-12900. doi 10.1002/anie.201807593
- Xu B., Liu D., Wang Z., Tian R., Zuo Y. Multi-substrate selectivity based on key loops and non-homologous domains: new insight into ALKBH family. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78:129-141. doi 10.1007/s00018-020-03594-9
- Yang C.G., Yi C., Duguid E.M., Sullivan C.T., Jian X., Rice P.A., He C. Crystal structures of DNA/RNA repair enzymes AlkB and ABH2 bound to dsDNA. *Nature*. 2008;452:961-965. doi 10.1038/nature06889
- Yang C.G., Garcia K., He C. Damage detection and base flipping in direct DNA alkylation repair. *ChemBiochem*. 2009;10(3):417-423. doi 10.1002/cbic.200800580
- Yi C., He C. DNA repair by reversal of DNA damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a012575. doi 10.1101/cshperspect.a012575
- Yi C., Yang C.G., He C. A non-heme iron-mediated chemical demethylation in DNA and RNA. *Acc Chem Res*. 2009;42(4):519-529. doi 10.1021/ar800178j
- Yi C., Chen B., Qi B., Zhang W., Jia G., Zhang L., Li C.J., Dinner A.R., Yang C.-G., He C. Duplex interrogation by a direct DNA repair protein in search of base damage. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19:671-676. doi 10.1038/nsmb.2320
- Zgarbová M., Otyepka M., Šponer J., Mládek A., Banáš P., Cheatham T.E., Jurečka P. Refinement of the Cornell et al. nucleic acids force field based on reference quantum chemical calculations of glycosidic torsion profiles. *J Chem Theory Comput*. 2011;7(9):2886-2902. doi 10.1021/ct200162x
- Zgarbová M., Šponer J., Otyepka M., Cheatham T.E., Galindo-Murillo R., Jurečka P. Refinement of the sugar-phosphate backbone torsion beta for AMBER force fields improves the description of Z- and B-DNA. *J Chem Theory Comput*. 2015;11(12):5723-5736. doi 10.1021/acs.jctc.5b00716

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 06.06.2025. После доработки 12.09.2025. Принята к публикации 12.09.2025.