

**Изучение строения мутантной формы ДНК-гликозилазы hNEIL2 K50A
методом HDX-MS**

Научный руководитель – Черноносков Александр Анатольевич

Гольшикин Арсений Антонович

Аспирант

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
РАН, Новосибирск, Россия
E-mail: arseniy.golyshkin@1bio.ru

Изучение механизмов эксцизионной репарации оснований в организме человека на молекулярном уровне требует глубокого анализа структур ДНК-гликозилаз как ключевых участников процесса. Однако разрешение структур данных ферментов классическим методом рентгеноструктурного анализа часто может быть осложнено наличием больших неупорядоченных участков в структурах белков. Необходимость изучения структур белков в нативной форме способствовало развитию метода водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (HDX-MS), который позволяет регистрировать конформационную динамику пространственных структур белков в растворе на разных временных промежутках благодаря реакции обмена между амидными протонами полипептидной цепи и сольватной оболочки. Данное исследование было направлено на характеризацию строения мутантной формы ДНК-гликозилазы hNEIL2 K50A методом HDX-MS с целью разрешения её структуры и определения её конформационных особенностей.

В ходе работы были оптимизированы условия для протеолитического расщепления ДНК-гликозилазы hNEIL2 K50A и последующего хромато-масс-спектрометрического анализа полученных пептидов в условиях HDX-MS. Для проведения расщепления в условиях HDX-MS использовали иммобилизованный пепсин, являющийся стандартным ферментом для реализации данного метода, а также свободные пролин-специфичные протеазы, выбранные в качестве альтернативных ферментов. Регистрацию ионов расщеплённых пептидов проводили с помощью тандемного масс-спектрометра Waters Xevo G2-XS QToF. Было показано, что использование иммобилизованного пепсина позволяет добиться наибольшей степени покрытия белка (~80%) без разрешения пролин-богатого неупорядоченного мотива (L58-R128), в то время как использование пролин-специфичных протеаз демонстрирует образование меньшего количества пептидов (покрытие ~65%) с преобладанием их в пролин-богатой области. В результате проведённого анализа кинетических серий HDX с использованием иммобилизованного пепсина была зафиксирована разница в скорости накопления дейтерия для различных участков hNEIL2 K50A, обусловленная особенностями третичной структуры белка, а также сопоставлены профили дейтерирования мутантной формы белка с данными для фермента дикого типа [1]. Результаты сравнения профилей дейтерирования для свободного и связанного с ДНК-лигандом hNEIL2 K50A продемонстрировали общую согласованность полученных экспериментальных данных с известными теоретическими структурами hNEIL2, а также позволили зарегистрировать структурные перестройки в неупорядоченной петле и её участие в образовании комплекса белок-ДНК.

*Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН
№ FWGN-2025-0020*

Источники и литература

- 1) Zhdanova P. V. et al. Dynamics and Conformational Changes in Human NEIL2 DNA Glycosylase Analyzed by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry // J. Mol. Biol. Academic Press, 2022. Vol. 434, № 2. P. 167334.