

## Роль консервативных аминокислотных остатков активного центра в ДНК-полимеразной и праймазной активностях PrimPol человека

Научный руководитель – Макарова Алёна Владимировна

Болдинова Е.О.<sup>1</sup>, Манукян А.А.<sup>2</sup>

1 - Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия, E-mail: lizaboldinova@yandex.ru; 2 - Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия, E-mail: annamg183@gmail.com

Праймаза-полимераза человека PrimPol играет важную роль в поддержании стабильности ядерной и митохондриальной ДНК. PrimPol участвует в механизме толерантности клеток к повреждениям ДНК, блокирующим репликацию, — реинициации синтеза ДНК после повреждений. PrimPol также эффективно включает нуклеотиды напротив ряда повреждений ДНК, действуя как транслезиянная полимеразы (translesion DNA synthesis, TLS). Механизм праймазной и ДНК-полимеразной активностей PrimPol еще мало изучен. На данный момент получена единственная структура каталитического кодра PrimPol в комплексе с неповрежденной ДНК и идентифицированы основные структурные элементы и аминокислотные остатки, которые, предположительно, участвуют в катализе.

В данной работе впервые проведены биохимические исследования роли консервативных остатков активного центра PrimPol Lys10, Arg47 и Arg76, контактирующих с ДНК, и Arg288 и Asn289, взаимодействующие со входящим нуклеотидом. Методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные варианты PrimPol с заменами указанных аминокислотных остатков на аланин.

Тестирование ДНК-полимеразной активности мутантных вариантов PrimPol на неповрежденной ДНК показало снижение активности в разной степени для всех вариантов PrimPol. Наименьшее влияние на ДНК-полимеразную активность PrimPol оказала замена остатка Lys10, располагающегося в N-концевой  $\alpha$ -спирали белка. Замена K10A привела к незначительному снижению ДНК-полимеразной активности PrimPol в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup> и не повлияла на активность в присутствии ионов Mn<sup>2+</sup>. У мутантных вариантов с заменами R47A, R288A и N289A ДНК-полимеразная активность снизилась в значительной степени в присутствии как ионов Mg<sup>2+</sup>, так и Mn<sup>2+</sup>, а мутантная форма R76A полностью потеряла активность в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup>, а в присутствии ионов Mn<sup>2+</sup> проявляла активность только при высоком избытке белка над субстратом и длительном времени инкубирования.

Для вариантов R47A и R76A, участвующих в образовании контактов с ДНК, было проведено исследование праймазной активности и анализ способности связывать ДНК. Было показано, что мутантная форма PrimPol R47A обладает сниженной праймазной активностью по сравнению с ферментом дикого типа, а форма с заменой R76A полностью теряет способность к инициации синтеза *de novo*. В согласии с этими данными было показано, что замена R47A существенно снижает способность PrimPol образовывать комплекс с ДНК, а для мутантной формы PrimPol с заменой R76A показать способность связывать ДНК не удалось.

Для всех мутантных вариантов был также проведен анализ влияния аминокислотных замен на точность и эффективность синтеза ДНК на неповрежденных ДНК матрицах и ДНК-субстратах, содержащих распространенные повреждения ДНК: 8-оксо-гуанин (8-оксо-Г), ДНК-цисплатиновую сшивку и ряд объемных N2-аддуктов гуанина. Было показано, что замены R47A, R76A и R288A повышают точность включения нуклеотидов на неповрежденной ДНК, в то время как замена K10A почти не оказывает влияния на спектр включения dNTP. Транслезиянная активность мутантных вариантов K10A, R47A и N289A

была значительно снижена на ДНК-матрицах с повреждениями по сравнению с диким типом в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$ . Мутантные варианты R76A и R288A полностью потеряли активность на ДНК матрицах, содержащих 8-оксо-Г и N2-аддукты гуанина, соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что остатки Arg47 и Arg76 активного центра PrimPol играют критическую роль в связывании фермента с неповрежденной матричной ДНК, а остаток Arg288 и Asn289 - в связывании нуклеотидных субстратов.

Данная работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 19-34-90147 («аспиранты») и № 19-54-45035.