

На правах рукописи

КРАСИКОВА ЮЛИЯ СЕРГЕЕВНА

**ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФАКТОРОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ
НУКЛЕОТИДОВ НА ПОВРЕЖДЁННОЙ ДНК**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

Научные руководители: д.х.н., профессор, член-корр. РАН
Лаврик Ольга Ивановна

к.х.н.
Речкунова Надежда Ивановна

Официальные оппоненты: д.х.н., профессор
Громова Елизавета Сергеевна

к.х.н.
Малыгин Алексей Аркадьевич

Ведущая организация: Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора

Защита состоится «16» марта 2012 г. в 09:30 часов
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при Институте
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
по адресу: Новосибирск, 630090, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан «10» февраля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Действие эндогенных реакционноспособных метаболитов и экзогенных факторов приводит к различным повреждениям клеточной ДНК. Генетическая стабильность организмов обеспечивается широким спектром механизмов репарации, среди которых важное место занимает эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН). Характерной особенностью системы ЭРН является способность удалять очень широкий спектр повреждений ДНК, в частности этот путь репарации является основным в клетках млекопитающих для удаления повреждений ДНК, образующихся под воздействием УФ-излучения, а также объемных ДНК-аддуктов, возникающих под действием химических канцерогенов либо в результате применения химиотерапевтических средств. Дефекты в системе ЭРН приводят к тяжелым заболеваниям, в том числе некоторым формам рака. Полный цикл процесса ЭРН включает в себя несколько стадий – узнавание повреждения, раскрытие ДНК-дуплекса вокруг повреждения, вырезание одноцепочечного повреждённого участка ДНК, застройка образовавшейся брешы и лигирование разрыва. На сегодняшний день точный механизм процесса в целом и отдельных его стадий окончательно не установлен. Не выясненной остаётся как последовательность сборки факторов ЭРН на повреждённой ДНК, так и роль отдельных белковых факторов в этом процессе. В связи с этим актуальным является определение состава и топографии ДНК-белковых комплексов, формирующихся на поврежденной ДНК на отдельных стадиях процесса. Применение физических подходов к изучению системы ЭРН ограничено размерами объекта и сложностью подготовки образцов, а исследования *in vivo* сопряжены с трудностями интерпретации наблюдаемых явлений. Перечисленные факты определяют актуальность использования химических методов исследования, в частности, метода аффинной модификации, как наиболее перспективного для исследования сложных белок-нуклеиновых комплексов, в том числе комплекса ЭРН.

Целью данной работы было определение локализации белковых факторов эксцизионной репарации нуклеотидов на поврежденной ДНК в процессе узнавания повреждения. В ходе исследования планировалось решить следующие **задачи**:

- Сконструировать модельные ДНК-субстраты, имитирующие интермедиаты этапа узнавания повреждения системой ЭРН.
- Исследовать комплексообразование факторов ЭРН ХРС-HR23b, ХРА, RPA с созданными ДНК-структурами.
- Определить места контактов указанных факторов ЭРН с ДНК.

Научная новизна. С использованием модельных ДНК-структур, имитирующих интермедиаты различных этапов процесса ЭРН, исследовано взаимодействие ключевых белковых факторов ЭРН – ХРС-HR23b, ХРА и RPA – с поврежденной ДНК на стадиях узнавания повреждения и формирования предрасщепляющего комплекса. Впервые показано совпадение мест контакта ХРС-HR23b и его дрожжевого ортолога Rad4-Rad23 с поврежденной ДНК. Данные по локализации белков, полученные методом фотоаффинной модификации, согласуются с результатами рентгеноструктурного анализа комплекса Rad4 с фрагментом поврежденной ДНК. Установлена положительная корреляция между углами изгиба поврежденных ДНК-структур и константами диссоциации комплексов ХРС-HR23b с этими ДНК. Выявлены места контактов RPA и ХРА с частично раскрытым поврежденным ДНК-дуплексом: впервые напрямую показано, что ХРА располагается с 5'-стороны от повреждения, а основным местом контакта RPA является участок неповрежденной цепи напротив повреждения. Показано, что расположение RPA и ХРА на поврежденном ДНК-дуплексе и частично раскрытом поврежденном ДНК-дуплексе совпадают.

Практическая значимость работы. Данные по взаимодействию ХРС-HR23b, ХРА и RPA с различными ДНК-структурами позволяют определить локализацию на поврежденной ДНК и взаимную ориентацию этих белковых факторов на стадии узнавания повреждения, а также в составе предрасщепляющего комплекса, формирующегося на этапе, предшествующем выщеплению поврежденного фрагмента эндонуклеазами. Решение фундаментальных вопросов о роли каждого фактора в процессе узнавания и удаления повреждения ДНК системой ЭРН может позволить перейти на уровень решения практических задач по поиску мишеней для лекарственных средств, направленных на преодоление как нарушений системы ЭРН, так и на снижение активности этого процесса репарации в раковых клетках.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: I международном конгрессе студентов и молодых учёных «World of Science» (Алма-Ата, Казахстан, 2007); IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); 33-ем конгрессе FEBS и 11-ой конференции IUBMB (Афины, Греция, 2008); «United Kingdom Environmental Mutagen Society, 32nd Annual Meeting» (Лидс, Великобритания, 2009); V международной школе «DNA and Chromosomes: Physical and Biological Approaches» (Каргезе, Франция, 2009); Российско-Швейцарском семинаре «Regulation of genome stability by DNA replication and repair» (Санкт-Петербург, 2010); «EEMS 40th Annual Meeting , 2010: Environmental

mutagenesis in the North» (Осло, Норвегия, 2010); Международной конференции «Responses to DNA damage: from molecular mechanism to human disease» (Эгмонд-ан-Зее, Нидерланды, 2011); II Международной конференции, посвященной 85-летию Академика Д.Г. Кнорре «Физико-химическая биология» (Новосибирск, 2011).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, трёх разделов, заключения, выводов и списка литературы. Она изложена на 134 страницах и включает 47 рисунков, 3 таблицы и список цитируемой литературы из 224 наименований. Работа выполнена в рамках программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта РФФИ № 10-04-00837.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Первичное узнавание поврежденного участка ДНК белковым фактором ХРС-HR23b

Основным претендентом на роль фактора, осуществляющего первичное узнавание повреждения, в настоящее время признан гетеродимер ХРС-HR23b (*Sugasawa K. et al. 2001; Batty D. et al. 2000*). Определение локализации ХРС-HR23b на повреждённой ДНК и зависимости его сродства от дестабилизации ДНК необходимо для более полного понимания роли этого белка в процессе ЭРН.

1.1. Исследование топографии комплекса ХРС-HR23b с повреждённой ДНК методом фотоаффинной модификации. Сравнение результатов с данными рентгеноструктурного анализа комплекса дрожжевого ортолога ХРС – Rad4 – с фрагментом повреждённой ДНК.

Для определения локализации белка на поврежденной ДНК необходимо выявить контакты белка с различными участками ДНК-дуплекса.

Название олигонуклеотидов	Нуклеотидная последовательность ДНК											
1 - 6 Fg или Fa	5'-СТАТ	GGCG	AGCG	GATT	AAGT	TGGG	CAAC	GTCA	GGGT	CTTC	CGAA	CGAC-3'
	3'-GATA	CCGC	TCCG	CTAA	TTCA	ACCC	GFTG	CAGT	CCCA	GAAG	GCTT	GCTG-5'
N F11 - 4	5'-СТАТ	GGCG	AGCG	GATT	AAGT	TGGG	TAAC	GTCA	GGGT	CTTC	CGAA	CGAC-3'
	3'-GATA	CCGC	TCCG	CTAA	TTCA	ACCC	ATEG	CAGT	CCCA	GAAG	GCTT	GCTG-5'

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использованных в работе фотоактивных 48-мерных ДНК-структур. Здесь, F – Flu-dUMP; позиции 5I-dUMP обозначены стрелками и номерами.

Для решения этой задачи был использован метод фотоаффинной модификации. В качестве фотоаффинных реагентов были использованы сконструированные 48-мерные ДНК-дуплексы,

содержащие повреждение в виде флуоресцеин-замещенного производного dUMP (5-{3-[6-(карбоксамидофлуоресцеинил)амидокапромил]аллил}-2'-дезоксуридин-5'-монофосфата (Flu-dUMP)) и фотореакционноспособный остаток 5I-dUMP (5-йодо-2'-дезоксуридин-5'-монофосфата) в различных положениях повреждённой и неповреждённой цепей ДНК-дуплекса (табл.1).

На рис.1.А представлены результаты электрофоретического разделения продуктов модификации ХРС-HR23b фотоактивными ДНК-дуплексами, содержащими повреждение. Исследуемый белок

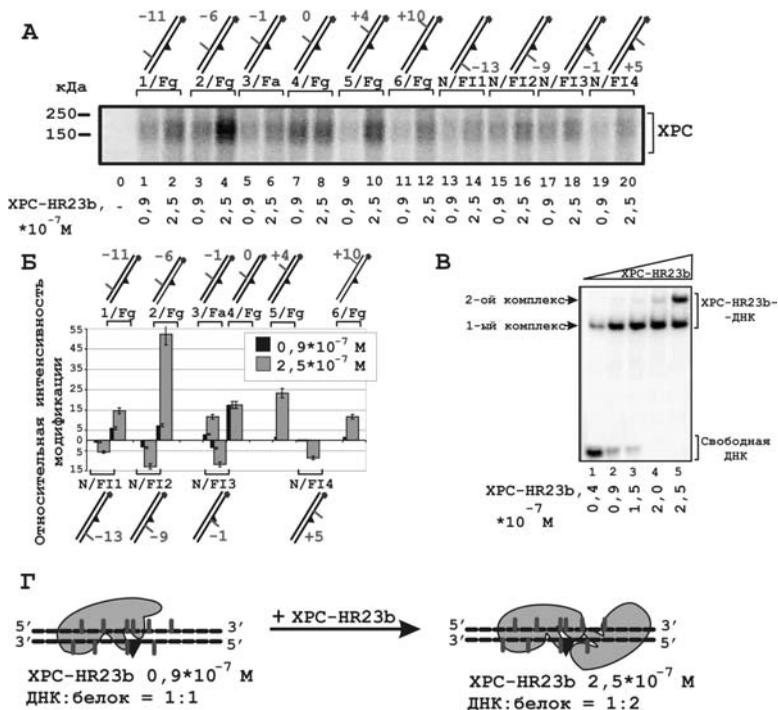


Рис. 1. Фотоаффинная модификация ХРС-HR23b повреждёнными ДНК-дуплексами. (А) Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ (акриламид : бис-акриламид = 60 : 1). На схематично представленных ДНК-структурах: позиции 5I-dUMP обозначены чёрточками, числами обозначены его позиции относительно повреждения. Треугольником обозначен остаток Flu-dUMP. (Б) Относительные уровни модификации, полученные усреднением данных трёх экспериментов. Верхняя часть гистограммы соответствует модификации неповреждённой цепью ДНК, а нижняя – повреждённой. (В) Анализ комплексообразования ХРС-HR23b с повреждённым ДНК-дуплексом методом задержки в геле. Радиоавтограф 5% нативного ПААГ (акриламид : бис-акриламид = 60 : 1). (Г) Схема расположения ХРС-HR23b на повреждённой ДНК.

модифицируется обеими цепями ДНК-дуплекса (дор. 1-12 на **рис. 1.А** соответствуют неповреждённой цепи ДНК, а дор. 13-20 – повреждённой), и профиль максимумов интенсивности модификации зависит от концентрации белка и положения фотоаналога (гистограмма **рис.1.Б**).

Результаты экспериментов по комплексообразованию показывают, что модификация ХРС-HR23b при концентрации белка $0,9 \cdot 10^{-7}$ М происходит в комплексе, соответствующем связыванию одной молекулы белка с ДНК (дор. 2 на **рис. 1.В**). Для такого типа комплекса наибольший выход белок-нуклеиновых аддуктов получен для ДНК-структуры 4/Fg, содержащей фотоаналог в «0»-позиции неповреждённой цепи, т. е. прямо напротив повреждения (дор. 7 на **рис. 1.А**). ДНК-структуры, содержащие фотоаналог в «+»-направлении от повреждения (положения «+4» и «+10» в неповреждённой цепи и «+5»-положение в повреждённой), не модифицировали ХРС-HR23b при этой концентрации. При этом белок модифицировался структурами, содержащими фотоаналог в «-»-позициях. После связывания второй молекулы ХРС-HR23b с ДНК (при концентрации $2,5 \cdot 10^{-7}$ М) уровень модификации в «0»-позиции не изменяется (сравнить дор. 7 и 8 на **рис. 1.А**), что предполагает существование постоянного контакта белка с этим нуклеотидом и подтверждает гипотезу о его важности для узнавания повреждения.

Данные по зависимости интенсивности модификации ХРС-HR23b от положения 5I-dUMP в ДНК (гистограмма на **рис. 1.Б**) позволяют сделать вывод, что белок связывается с неповреждённой цепью дуплекса с 5'-стороны от повреждения (**рис. 1.Г**). Дополнительные пики модификации, появляющиеся при увеличении концентрации ХРС-HR23b (дор. 10, 12 и 20 на **рис. 1.А**), указывают позиции связывания второй молекулы белка с ДНК (**рис. 1.Б** и **Г**). Наиболее вероятно, что вторая молекула связывается неспецифически с неповреждённым участком ДНК-дуплекса.

Полученные данные по локализации ХРС-HR23b на повреждённой ДНК согласуются с предположением о том, что ХРС-HR23b узнаёт не само повреждение, а участок неспаренных оснований в ДНК, возникающий вследствие дестабилизации дуплекса из-за наличия повреждения (*Buterin T. et al. 2005; Maillard O., Solyom S. and Naegeli H. 2007*). Это предположение было подтверждено данными рентгеноструктурного анализа комплекса Rad4, дрожжевого ортолога ХРС, с фрагментом поврежденной ДНК (*Min J.-H. and Pavletich N.P. 2007*).

Чтобы применить принцип укладки доменов Rad4 на ДНК для объяснения данных по фотоаффинной модификации ХРС-HR23b, нужно было выяснить, как согласуются результаты этого метода с данными РСА. Для решения этой задачи была проведена модификация Rad4-Rad23 теми же фотореакционноспособными ДНК-структурами. Препарат Rad4-Rad23 был полностью идентичен белку, использованному для кристаллографии. При

формировании комплекса с соотношением белок : ДНК = 1 : 1 максимумы интенсивности модификации Rad4-Rad23 расположены с 5'-стороны от повреждения. Как и в случае ХРС-HR23b, наибольший уровень модификации соответствует положению фотоаналога непосредственно напротив повреждения (рис. 2).

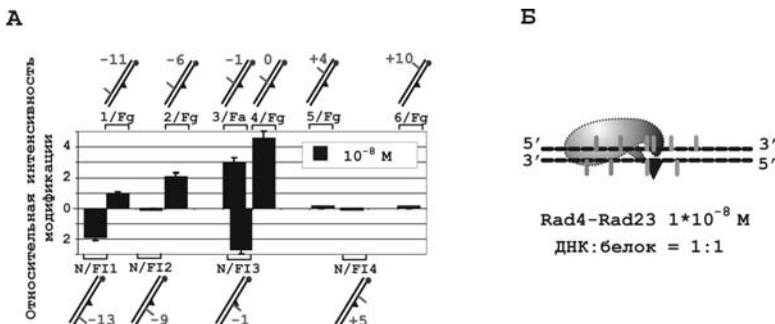


Рис. 2. Фотоаффинная модификация Rad4-Rad23 повреждёнными ДНК-дуплексами. (А) Относительные уровни модификации, полученные усреднением данных трёх экспериментов. На схематично представленных ДНК-структурах позиции фотоаналога 5I-dUMP обозначены чёрточками, числа соответствуют его положению относительно повреждения. Треугольником обозначен остаток Flu-dUMP. (Б) Локализация Rad4-Rad23 на повреждённой ДНК.

Позиции фотоаналога, в которых были получены максимумы интенсивности модификации Rad4-Rad23, совпадают с местами контакта Rad4-Rad23 с ДНК по данным PCA.



Рис. 3. Данные по локализации XPC-HR23b и Rad4-Rad23 на повреждённой ДНК, полученные методом фотоаффинной модификации, согласуются с результатами PCA комплекса Rad4-Rad23 с фрагментом поврежденной ДНК (*Min J.-H. and Pavletich N.P. 2007*). Обозначения: чёрточки – позиции фотоаналога 5I-dUMP, треугольник – остаток Flu-dUMP, «Т-Т» – циклобутанпиримидиновый димер.

Основываясь на данных по структуре Rad4 и результатах модификации дрожжевого и человеческого ортологов, можно говорить о совпадении характера взаимодействий и, следовательно, о применимости

предлагаемой модели расположения XPC-HR23b на повреждённой ДНК (рис. 3).

Одинаковая локализация белков XPC-HR23b и Rad4-Rad23 на повреждённой ДНК говорит об универсальности принципа структурной организации факторов, «сканирующих» ДНК на наличие повреждения. Можно предположить, что позиционирование этих факторов с 5'-стороны на неповреждённой цепи задаёт последующую асимметрию предрасщепляющего комплекса, формирующегося на повреждённой ДНК перед выщеплением повреждённого фрагмента.

1.2. Связывание XPC-HR23b с поврежденной ДНК

Предполагается, что особенности структуры Rad4/XPC позволяют этому белку сканировать ДНК на наличие дестабилизации двойной спирали, возникающей вследствие наличия повреждения. Были проведены детальные исследования влияния отдельных нарушений структуры дуплекса, таких как объемное повреждение и/или область неспаренных оснований – «пузырь» (табл. 2) – на связывание XPC-HR23b с ДНК.

Название олигонуклеотидов†	Нуклеотидная последовательность ДНК
Nm 48с	5'-СТАТ GCG AGGC GATT AAGT TGGG CAAC GTCA GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCGC TCCG CТАА TTCA ACCC GTTG CAGT CСCA GAAG GСTT GСTG-5'
Nm Fg	5'-СТАТ GCG AGGC GATT AAGT TGGG CAAC GTCA GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCGC TCCG CТАА TTCA ACCC G ^F TTG CAGT CСCA GAAG GСTT GСTG-5'
V 48с	5'-СТАТ GCG AGGC GATT ATCA ACCC ATTG CAGT GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCGC TCCG CТАА TTCA ACCC GTTG CAGT CСCA GAAG GСTT GСTG-5'
V Fg	5'-СТАТ GCG AGGC GATT ATCA ACCC ATTG CAGT GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCGC TCCG CТАА TTCA ACCC G ^F TTG CAGT CСCA GAAG GСTT GСTG-5'

Таблица 2.

Последовательности использованных в работе 48-мерных ДНК-дуплексов. Здесь, F – остаток Flu-dUMP; рамкой выделена область неспаренных оснований размером 15 н.о. – «пузырь».

Эффективность комплексообразования XPC-HR23b с ДНК анализировали методом задержки в геле. Реакционные смеси, содержащие меченую ДНК, титровали увеличивающейся концентрацией XPC-HR23b в отсутствие и в присутствии пятикратного избытка немеченого неповреждённого 48-мерного ДНК-дуплекса (рис. 4.А и Б). Самую низкую эффективность связывания XPC-HR23b демонстрирует с неповреждённым ДНК-дуплексом (дор. 1-6 на рис. 4.А и дор. 1-5 на рис. 4.Б). Для ДНК, содержащей повреждение, уровень комплексообразования в присутствии конкурентной ДНК приблизительно в 2 раза выше (дор. 6-10 на рис. 4.Б). Следующими в ряду увеличения сродства XPC-HR23b находятся ДНК-структуры, содержащие «пузырь». Наибольшая разница в сродстве наблюдается между неповреждённым ДНК-дуплексом Nm/48с и ДНК-дуплексом V/Fg, содержащим повреждение в области «пузыря» – уровни связывания в присутствии конкурентной ДНК составляли 15 и 85% соответственно (рис. 4.Б).

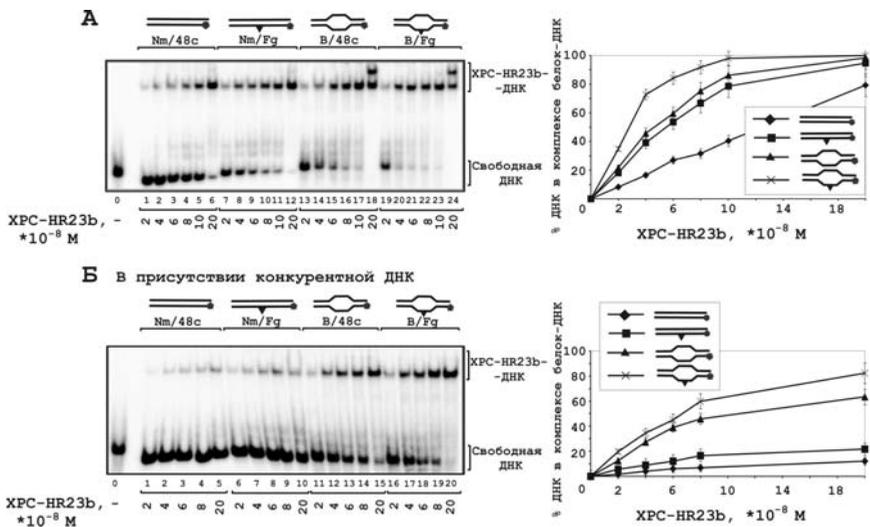


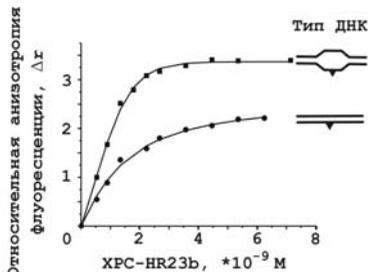
Рис. 4. Связывание XPC-HR23b с различными типами ДНК-структур (А). В случае (Б) связывание проводилось в присутствии пятикратного избытка неповреждённого немеченого 48-мерного ДНК-дуплекса. Радиоавтографы 5% нативных ПЛААГ (акриламид : бис-акриламид = 60 : 1). Представленные в пунктах (А) и (Б) графики были построены по усреднённым данным из трёх экспериментов.

Эксперименты по связыванию Rad4-Rad23 с теми же ДНК-структурами показали, что оба ортолога имеют общий ряд увеличения сродства: неповреждённая ДНК < повреждённая ДНК < ДНК, содержащая «пузырь» < ДНК, содержащая «пузырь» и повреждение.

1.3. Количественные характеристики взаимодействия XPC-HR23b с различными типами ДНК-структур

Константы диссоциации комплекса XPC-HR23b с исследуемыми ДНК-структурами (табл. 2) были определены по анизотропии флуоресценции. В качестве репортерной группы выступал остаток флуоресцеина, моделирующий объёмное повреждение. Анализ данных проводился в рамках модели, предполагающей эквимоллярное связывание XPC-HR23b : ДНК. На рис. 5А представлены типичные кривые титрования повреждённого ДНК-дуплекса и ДНК-дуплекса, содержащего повреждение в составе «пузыря», увеличивающейся концентрацией XPC-HR23b. Значения констант диссоциации для использованных ДНК-структур приведены в таблице на рис. 5Б.

А



Б

Обозначение ДНК \ Тип ДНК	K_D, M	Угол изгиба
Nm/48с	$(5 \pm 2) * 10^{-9}$	180°
Nm/Fg	$(5 \pm 2) * 10^{-10}$	$140 \pm 3^\circ$
B/48с	$(2,5 \pm 0,6) * 10^{-10}$	$124 \pm 3^\circ$
B/Fg	$(8 \pm 1) * 10^{-11}$	$116 \pm 2^\circ$

Рис. 5. (А) Изменение анизотропии флуоресценции в процессе связывания ХРС-НР23b с 1 нМ повреждённым дуплексом или ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря». Каждая точка получена как среднее значение анизотропии из трёх экспериментов. Отклонение от среднего значения составило < 5%. **(Б)** Константы диссоциации комплекса ХРС-НР23b с ДНК-структурами и угол изгиба этих ДНК. Значения констант для нефлуоресцентных ДНК определены из данных по конкурентному титрованию. Ошибки являются отклонением от среднего значения.

Наиболее высокое сродство ХРС-НР23b демонстрирует к ДНК-структуре, содержащей повреждение в составе «пузыря» – $K_D \sim 8 * 10^{-11}$ М. Константа диссоциации комплекса с повреждённым ДНК-дуплексом Nm/Fg приблизительно в 6 раз выше – $K_D \sim 5 * 10^{-10}$ М.

Константы диссоциации комплексов для ДНК-структур, не содержащих флуоресцеин, были получены из экспериментов по конкурентному титрованию. Сродство к неповреждённому ДНК-дуплексу (Nm/48с) примерно в 10 раз ниже, чем к ДНК-дуплексу, содержащему повреждение (Nm/Fg). В случае ДНК-структур, содержащих «пузыри» (B/48с и B/Fg), сродство ХРС-НР23b к структуре с повреждением (B/Fg) в 3 раза выше. Количественные характеристики, полученные методом флуоресцентного титрования, соответствуют ряду увеличения сродства белка к ДНК:

Неповреждённая ДНК < Повреждённая ДНК < ДНК с «пузырём» < ДНК с «пузырём» и повреждением

Для того чтобы понять, насколько сродство белка отражает природу повреждения, было необходимо сопоставить полученные константы диссоциации ХРС-НР23b с параметрами ДНК-структур, которые могли бы отражать степень их дестабилизации. Одной из таких характеристик показывающих, в какой степени дестабилизирована двойная спираль, является угол изгиба ДНК-дуплекса.

В работе авторов (Thompson J.F. and Landy A. 1988; Виноградова О.А. и др. 2009) было показано, что электрофоретическая подвижность ДНК-дуплекса в нативном ПААГ пропорциональна расстоянию между концами

этого дуплекса (его контурной длине). Исходя из этого предположения и простых геометрических соображений авторы (*Thompson J.F. and Landy A. 1988*) вывели формулу для расчёта угла изгиба (γ):

$$\gamma = 180^\circ - \alpha'$$

$$\alpha = 2 * \arccos (M/N),$$

где α' – величина угла α в градусах; М – электрофоретическая подвижность ДНК-дуплекса, содержащего повреждение в центральной позиции; N – электрофоретическая подвижность ДНК-дуплекса, содержащего повреждение на одном из концов (вводится для исключения эффекта увеличения массы за счёт повреждения). Описанные алгоритмы были использованы для расчёта угла изгиба ДНК-дуплексов. Результаты расчётов представлены в таблице на **рис. 5.Б**. Полученные данные показывают, что сродство ХРС-HR23b напрямую зависит от характера повреждения. Эта закономерность может быть проиллюстрирована следующим рядом: больше дестабилизация дуплекса → больше угол изгиба → больше сродство белка.

1.4. Влияние RPA и XPA на взаимодействие ХРС-HR23b с ДНК

Белки RPA и XPA обладают повышенным сродством к нарушениям двойной спирали. Тем не менее, их сродство к повреждённой ДНК на порядок ниже, чем у ХРС-HR23b (*Hey T., Lipps G. and Krauss G. 2001, Hey T. et al. 2002*). Однако существуют повреждения, которые не вносят сильных искажений в структуру двойной спирали и потому плохо узнаются ХРС-HR23b (*Mocquet V. et al. 2007*). Возможно, узнавание таких повреждений обеспечивается комплексом ХРС-HR23b, XPA и RPA, в котором специфичность к повреждённой ДНК повышается благодаря аддитивному эффекту (*Reardon J.T. and Sancar A. 2003*). В связи с этим представляло интерес исследовать влияние факторов RPA и XPA на взаимодействие ХРС-HR23b с повреждённой ДНК. Результаты экспериментов по связыванию показывают, что RPA стимулирует формирование комплексов ХРС-HR23b с ДНК. Из литературных данных известно, что XPA физически взаимодействует с ХРС-HR23b (*You J.-S., Wang M. and Lee S.-H. 2003*), а при совместном присутствии XPA и ХРС-HR23b в реакционной смеси наблюдается синергизм во взаимодействии этих белков с ДНК.

Эксперименты по фотоаффинной модификации показали, что RPA и XPA стимулируют образование ковалентных аддуктов ХРС-HR23b-ДНК и влияют на расположение ХРС-HR23b на повреждённой ДНК (**рис. 6**).

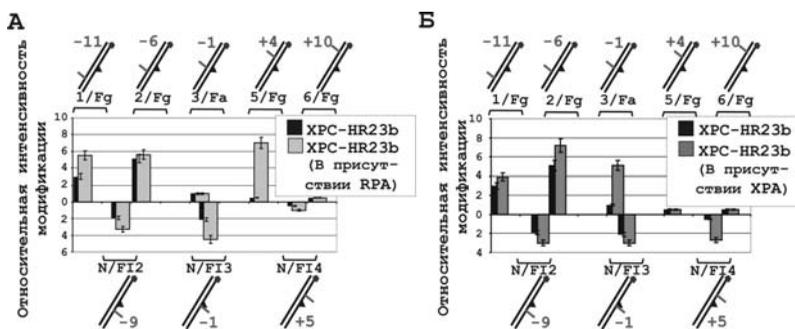


Рис. 6. Влияние RPA (А) и XPA (Б) на фотоаффинную модификацию XPC-HR23b. На гистограммах представлены усреднённые количественные данные из пяти экспериментов по модификации.

Можно предположить, что эффект стимуляции модификации XPC объясняется повышением специфичности контакта белка с поврежденным участком ДНК и, как следствие, увеличением общего сродства. Появление пиков модификации XPC в «+4»-положении неповрежденной цепи в присутствии RPA и «+5»-положении поврежденной цепи в присутствии XPA может говорить о появлении дополнительных контактов XPC с ДНК в присутствии этих белков. Возможно, XPC-HR23b переходит в более компактную (или «сжатую») конформацию за счёт белок-белковых взаимодействий.

Стимулирующее влияние XPA и RPA на связывание и модификацию XPC-HR23b показывает универсальность механизма последовательной сборки комплекса ЭРН и говорит о важной роли кооперативных взаимодействий в его формировании.

2. Белки XPA и RPA – основные структурные элементы прерасщепляющего комплекса

Согласно модели «двойного узнавания субстрата», после первичного узнавания места дестабилизации двойной спирали происходит проверка этого участка на наличие повреждения и определение поврежденной цепи ДНК (Hess M.T. et al. 1997). Предполагается, что в верификации обнаруженной XPC-HR23b области дестабилизации ДНК участвуют белковые факторы XPA и RPA. В экспериментах *in vitro* было показано, что эти факторы привлекаются на ДНК-интермедиат, представляющий собой дуплекс с ~15 неспаренными нуклеотидами (Tapias A. et al. 2004). Предполагается, что узнавание поврежденной цепи ДНК происходит уже в таком частично раскрытом ДНК-дуплексе. Таким образом, исследование взаимодействия XPA и RPA с ДНК-структурами, имитирующими этот

ДНК-интермедиат, необходимо для понимания механизма формирования предрасщепляющего комплекса, обеспечивающего удаление поврежденного участка и сохранение целостности нативной цепи ДНК.

2.1. Взаимодействие RPA и XPA с различными типами ДНК-структур

Для определения того, насколько селективно XPA и RPA способны взаимодействовать с ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря», относительно такой же, но неповрежденной, были проведены эксперименты по связыванию этих белков с модельными ДНК-дуплексами в присутствии избытка конкурентной ДНК (рис. 7).

Наибольшая разница в средстве наблюдается между дуплексными ДНК (дор. 0-10 на рис. 7.А и Б) и ДНК-структурами, содержащими «пузырь» (дор. 11-20 на рис. 7.А и Б). Уровни комплексообразования с этими типами ДНК-структур отличаются на 50% для XPA и на 60% для RPA. Разница в уровне комплексообразования между структурами с «пузырём» составляет около 10% для XPA и 20% для RPA (дор. 11-15 и 16-20 на рис. 7.А и Б). При этом XPA демонстрирует высокую селективность в связывании с поврежденным ДНК-дуплексом относительно нативной ДНК – разница уровней комплексообразования составляет более 20% (дор. 0-5 и 6-10 на рис. 7.А).

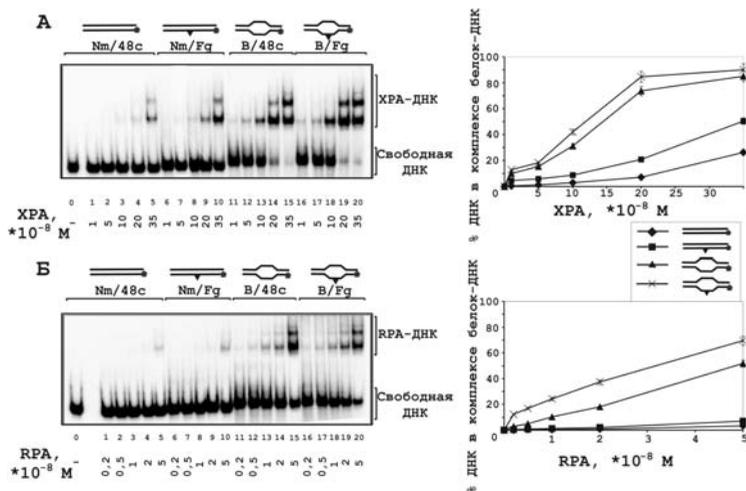


Рис. 7. Связывание XPA (А) и RPA (Б) с поврежденными и неповрежденными ДНК-дуплексами в присутствии пятикратного избытка неповрежденного немеченого 48-мерного ДНК-дуплекса. Радиоавтографы 5% нативных ПААГ (акриламид : бис-акриламид = 60 : 1). На представленных в пунктах (А) и (Б) графиках каждая точка была получена как среднее значение из пяти экспериментов.

Высокое сродство ХРА и RPA к ДНК-структурам, содержащим «пузырь», может свидетельствовать о том, что эти белковые факторы локализованы на одноцепочечных участках, составляющих «пузырь». Чтобы выяснить, с какой из цепей «пузыря», повреждённой или неповреждённой, взаимодействуют ХРА и RPA, было исследовано связывание этих белковых факторов с одноцепочечными нативной и повреждённой ДНК, повреждённым дуплексом и ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря» (рис. 8).

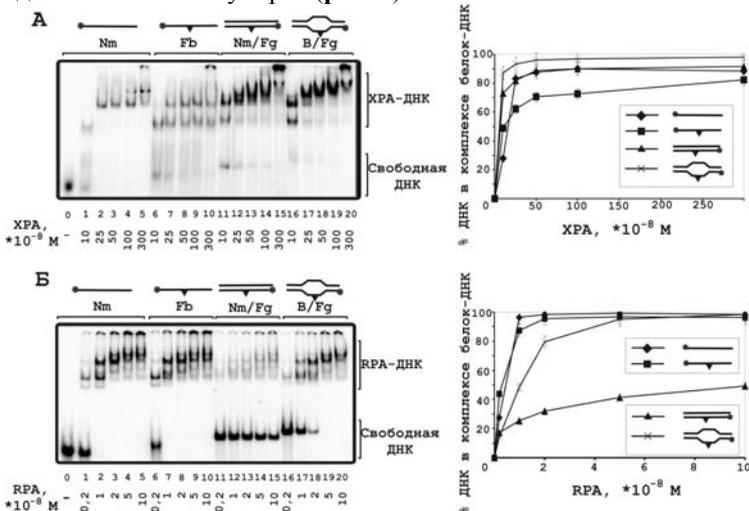
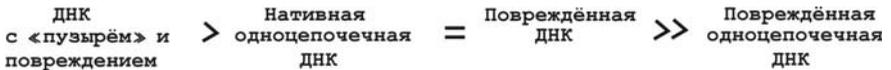
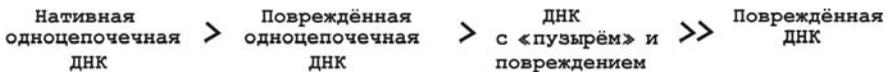


Рис. 8. Связывание ХРА (А) и RPA (Б) с различными типами ДНК-структур. Радиоавтограф 5% нативного ПААГ (акриламид : бис-акриламид = 60 : 1). Представленные кривые построены по усреднённым данным из трёх экспериментов.

В этих экспериментах ХРА демонстрировал наибольшее сродство к ДНК-дуплексу, содержащему повреждение в составе «пузыря» (дор. 16-20 на рис. 8.А). Сродство к повреждённому дуплексу (дор. 11-15 на рис. 8.А) было выше, чем сродство к неповреждённой одноцепочечной ДНК (дор. 1-5 на рис. 8.А). Ряд увеличения сродства ХРА к ДНК имеет следующий вид:



В ряду исследованных ДНК-структур RPA имеет самое высокое сродство к нативной одноцепочечной ДНК (дор. 0-5 на рис. 8.Б), а самое низкое – к повреждённому дуплексу (дор. 11-15 на рис. 8.Б):



Кроме того, с повреждённым дуплексом RPA связывается высококооперативно, о чем свидетельствует одновременное присутствие свободной ДНК и нескольких комплексов белок-ДНК с различной электрофоретической подвижностью (дор. 11-15 на **рис. 8.Б**).

Таким образом, можно заключить, что для связывания XPA важно наличие разветвлённых участков в ДНК, а именно, перехода одноцепочечная-двухцепочечная ДНК, а эффективность связывания RPA зависит от присутствия одноцепочечных участков, к которым RPA имеет намного большее сродство, чем к двухцепочечной ДНК. Полученные результаты подтверждают существующее в литературе предположение о том, что XPA и RPA включаются в комплекс ЭРН уже на стадии частично раскрытого дуплекса.

2.2. Локализация XPA и RPA на ДНК-дуплексах, содержащих повреждение

Для определения локализации XPA и RPA на частично раскрытом повреждённом ДНК-дуплексе было проведено картирование расположения этих белков на ДНК методом фотоаффинной модификации. Полученный результат сравнивался с аналогичными данными для повреждённого ДНК-дуплекса.

Использованные ДНК-структуры содержали фотореакционноспособный аналог нуклеотида в различных положениях повреждённой или неповреждённой цепей (**табл. 3**). На **рис. 9** представлено схематичное расположение XPA и RPA на ДНК, суммирующее результаты фотоаффинной модификации и экспериментов по связыванию.

Название олигонуклеотидов	Нуклеотидная последовательность ДНК
1 - 6 Fb	<p style="text-align: center;"> ↓-10 ↓-5 ↓0 ↓+4 ↓+10 5'-CTAT GCG AGGC GATT AGT TGGG CAAC GTCA GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCG TCCG CTAА TAGT TGGG FAAC GTCA CCCA GAAG GCTT GCTG-5' </p>
B F11 - 4	<p style="text-align: center;"> ↓-10 ↓-5 ↓+5 5'-CTAT GCG AGGC GATT TCA ACCC ATTG CAGT GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCG TCCG CTAА TCA ACCC ATFG CAGT CCCA GAAG GCTT GCTG-5' </p>

Таблица 3.

Последовательности использованных в работе 48-мерных ДНК-дуплексов. Здесь, F – остаток Flu-dUMP; позиции 5I-dUMP обозначены стрелками и номерами; рамкой выделена область «пузыря».

Сопоставление позиций, для которых наблюдаются максимумы модификации, с картой расположения 5I-dUMP в ДНК показывает, что XPA локализован с 5'-стороны от повреждения вблизи перехода одноцепочечная-двухцепочечная ДНК (**рис. 9**). Полученный результат впервые напрямую показывает локализацию XPA на ДНК-структуре, содержащей повреждение в области неспаренных оснований. В литературе существуют данные о том, что XPA взаимодействует с фактором ERCC1,

являющимся субъединицей структурно-специфичной эндонуклеазы XPF-ERCC1, которая расщепляет повреждённую цепь с 5'-стороны от повреждения (*Li L. et al. 1994*). Белок-белковые взаимодействия между XPA и ERCC1 абсолютно необходимы для процесса ЭРН (*Orelli B. et al. 2010*). Можно предположить, что представленное на **рис. 9** расположение XPA необходимо для корректного расположения XPF-ERCC1 на ДНК в составе предрасщепляющего комплекса.

Наиболее высокий уровень фотопришивок RPA демонстрирует с ДНК-структурами, содержащими фотоаналог в неповреждённой цепи напротив повреждения и с 5'-стороны от него (**рис. 9**). Результаты экспериментов по связыванию (дор. 11-15 для повреждённого ДНК-дуплекса и дор. 16-20 для ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря», на **рис. 8**) показывают, что в использованном диапазоне концентраций с повреждённым дуплексом формируется комплекс белок–ДНК, содержащий четыре молекулы RPA, а с ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря», – две молекулы RPA. Исходя из этих данных можно предположить, что в формировании предрасщепляющего комплекса участвуют две молекулы RPA: одна молекула взаимодействует с одноцепочечным участком неповрежденной цепи, а вторая молекула RPA расположена вблизи перехода одноцепочечная-двуцепочечная ДНК с 3'-стороны от повреждения. Такое расположение RPA согласуется с литературными данными о полярном связывании этого белка с ДНК, содержащей бреши (*Kolpashchikov D.M. et al. 2001*). Предполагается, что полярное связывание является необходимым условием для позиционирования высокоспецифичных нуклеаз XPF и XPG (*De Laat W.L. et al. 1998*).

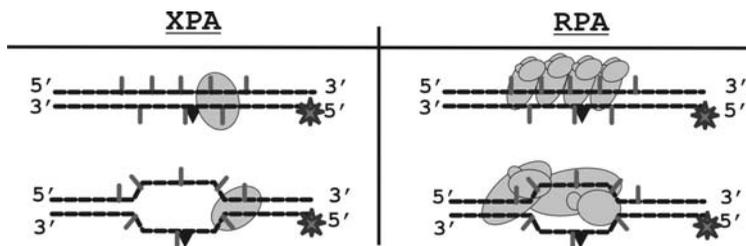


Рис. 9. Схематичное расположение максимумов модификации XPA и RPA на повреждённой ДНК.

Сравнивая расположение максимумов интенсивности модификации XPA и RPA на повреждённом дуплексе и на ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря», можно говорить о совпадении характеров локализации исследуемых белковых факторов на указанных ДНК-структурах.

Полученный результат демонстрирует способность ХРА и RPA к правильному позиционированию в отсутствие других участников процесса.

2.3. Взаимодействие факторов RPA и ХРА при связывании с ДНК

Из литературных данных известно, что комплекс RPA-ХРА может быть выделен иммунопреципитацией любого из этих белков из экстракта клеток HeLa (*Matsuda T. et al. 1995*) и вместе эти два белка имеют гораздо большее сродство к повреждённой ДНК, чем каждый из них по отдельности (*He Z. et al. 1995; Li L. et al. 1995*). Кроме того, RPA оказывает сильное стимулирующее действие на способность ХРА связываться с ДНК-дуплексами, несущими повреждение, а делеционные мутанты ХРА, не способные взаимодействовать с RPA1, не поддерживают реакцию ЭРН (*Li L. et al. 1995*). Этот комплекс организует ядро предрасщепляющего комплекса за счёт белок-белковых взаимодействий со всеми участниками процесса.

Название олигонуклеотидов	Нуклеотидная последовательность ДНК
5 П	5'-CTAT GGCG AGGC GATT AAGT TGGG CAAC GTCA GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-TTG CAGT CCCA GAAG GCTT GCTG-5'
5 3П	5'-CTAT GGCG AGGC GATT AAGT TGGG CAAC GTCA GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCGC TCCG CТАА TTCA ACCC G-5'
5 П/3П	5'-CTAT GGCG AGGC GATT AAGT TGGG CAAC GTCA GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCGC TCCG CТАА TTCA ACCC G TTG CAGT CCCA GAAG GCTT GCTG-5'
5 48с	5'-CTAT GGCG AGGC GATT AAGT TGGG CAAC GTCA GGGT CTTC CGAA CGAC-3' 3'-GATA CCGC TCCG CТАА TTCA ACCC GTTG CAGT CCCA GAAG GCTT GCTG-5'

Таблица 4.

Последовательности использованных в работе 48-мерных ДНК-структур. Здесь, F – остаток Flu-dUMP; позиции 5I-dUMP обозначены стрелкой.

На **рис. 10.A** представлены результаты сравнительного анализа эффективности образования комплекса RPA-ХРА-ДНК при совместном связывании этих белков с различными ДНК-структурами (**табл. 4**). При использовании ДНК-дуплексов, содержащих выступающие одноцепочечные участки (дор. 8 и 12 на **рис. 10.A**), образуется продукт с меньшей электрофоретической подвижностью, чем комплексы, образующиеся при взаимодействии RPA и ХРА по отдельности. Были получены подтверждения того, что данный продукт является тройным комплексом RPA-ХРА-ДНК, причём для ДНК-структуры с 3'-выступающим одноцепочечным участком полоса, соответствующая тройному комплексу RPA-ХРА-ДНК, наиболее интенсивна (дор. 8 на **рис. 10.A**). В случае ДНК-дуплекса, содержащего разрыв, количество предполагаемого комплекса RPA-ХРА-ДНК крайне мало и находится на грани чувствительности метода обнаружения (дор. 16 на **рис. 10.A**). Взаимное влияние RPA и ХРА на образование контактов белков с ДНК (структуры представлены в **табл. 4**)

исследовали методом фотоаффинной модификации. Для ДНК-структур, содержащих выступающие одноцепочечные участки, наблюдается усиление интенсивности модификации субъединицы RPA1 в присутствии ХРА.

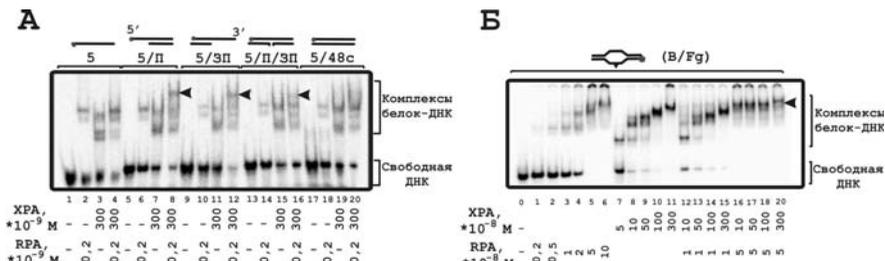


Рис. 10. Взаимодействие RPA и ХРА в процессе связывания различных ДНК-структур (А) и в процессе связывания ДНК, содержащей повреждение в структуре «пузыря» (Б). Радиоавтографы 5% нативных ПААГ (акриламид : бис-акриламид = 60 : 1).

Исследование взаимодействия RPA и ХРА в процессе связывания ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря», показало, что при эквимоллярном соотношении концентраций RPA : ДНК регистрируется слабая полоса продуктов комплексообразования RPA-ХРА-ДНК (сравнить дор. 12-15 с дор. 3 и 7-11 на **рис. 10.Б**). Однако уже небольшой избыток RPA приводит к формированию интенсивной полосы, соответствующей комплексу RPA-ХРА-ДНК (сравнить дор. 16-20 с дор. 5 и 7-11 на **рис. 10.Б**).

Результаты экспериментов по комплексообразованию RPA и ХРА с ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря», указывают на то, что комплекс RPA-ХРА-ДНК, по-видимому, формируется на фрагменте ДНК-структуры, содержащем дуплекс с выступающим одноцепочечным участком.

Исходя из данных по локализации RPA и ХРА (**рис. 9**) и результатов экспериментов по совместному связыванию этих белков (**рис. 10**), для детального исследования взаимодействия между RPA и ХРА была использована ДНК, содержащая повреждение в составе «пузыря», и фотоаналог 5I-dUMP в «+5»-положениях повреждённой и неповреждённой цепей дуплекса (**рис. 11**). Из представленного на **рис. 11.А** радиоавтографа геля видно, что эффективность модификации RPA и ХРА зависит как от концентраций белков, так и от соотношения их количеств. В присутствии эквимоллярного по отношению к ДНК количества RPA эффективность модификации ХРА обеими цепями уменьшалась. По мере увеличения концентрации ХРА росла эффективность модификации RPA (сравнить дор. 1 с 6-8 и дор. 12 с 17-19 на **рис. 11**). В присутствии небольшого избытка RPA, наблюдалось ингибирование модификации обоих белков неповреждённой цепью ДНК (дор. 9-11 в сравнении с 2 и 3-5 на **рис. 11**),

способность этих белков защищать ДНК от расщепления нуклеазой Mung Bean. Показано, что RPA и XPA защищают одноцепочечную часть ДНК от расщепления эффективнее, чем дуплексную, а одновременное присутствие RPA и XPA в реакционной смеси приводит к кооперативной защите ДНК от расщепления.

Результаты исследований взаимодействия XPA и RPA с частично открытой повреждённой ДНК позволяют предположить локализацию и взаимную ориентацию этих белковых факторов в составе предрасщепляющего комплекса ЭРН (рис. 12).

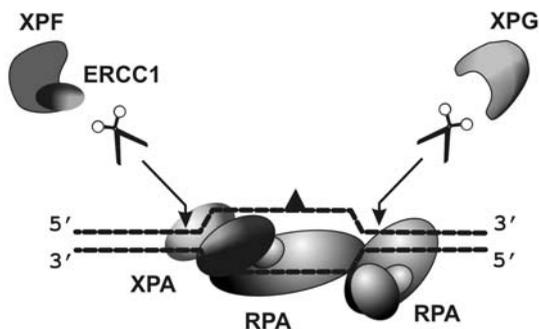


Рис. 12. Схематичное представление локализации RPA и XPA на ДНК в составе предрасщепляющего комплекса ЭРН. Стрелками обозначены предполагаемые места контактов специфических нуклеаз ЭРН — XPF-ERCC1 и XPG.

Полученные результаты в сочетании с литературными данными позволяют заключить, что RPA и XPA необходимы как для привлечения, так и для правильного позиционирования и координации других факторов ЭРН в составе предрасщепляющего комплекса.

ВЫВОДЫ

1. Методом фотоаффинной модификации показано, что ключевой белок, узнающий повреждения ДНК – ХРС-HR23b – взаимодействует с неповреждённой цепью с 5'-стороны от повреждения и с участком неповреждённой цепи напротив повреждения. Результат согласуется с данными фотоаффинной модификации по расположению на повреждённой ДНК дрожжевого ортолога ХРС – Rad4 – и с литературными данными по РСА комплекса Rad4 с фрагментом повреждённой ДНК.

- Одинаковый принцип локализации белков ХРС-HR23b и Rad4-Rad23 на повреждённой ДНК свидетельствует об универсальности структурной организации факторов, «сканирующих» ДНК на наличие повреждения.

2. Установлена положительная корреляция между углом изгиба ДНК-дуплекса и расстоянием к нему ХРС-HR23b.

3. Обнаружено стимулирующее влияние белковых факторов ХРА и РРА на связывание с ДНК и модификацию ХРС-HR23b, демонстрирующее вклад белок-белковых взаимодействий в узнавание повреждения и формирование предрасщепляющего комплекса.

4. Установлены места контактов ХРА и РРА с частично раскрытым повреждённым ДНК-дуплексом:

- ХРА располагается с 5'-стороны от повреждения вблизи перехода одноцепочечная-двуцепочечная ДНК. Такое положение ХРА согласуется с его функцией по привлечению и позиционированию эндонуклеазы ERCC1-XPF, расщепляющей поврежденную цепь с 5'-стороны от повреждения.
- В формировании предрасщепляющего комплекса участвуют две молекулы РРА: одна молекула взаимодействует с одноцепочечным участком неповрежденной цепи в частично открытом ДНК-дуплексе, а вторая молекула РРА расположена вблизи перехода одноцепочечная-двуцепочечная ДНК с 3'-стороны от повреждения.

5. Контакты ХРА и РРА с повреждённым ДНК-дуплексом и ДНК, содержащей повреждение в составе «пузыря», практически совпадают, что свидетельствует о способности этих белковых факторов к правильному позиционированию в отсутствие других участников процесса.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Красикова Ю.С., Речкунова Н.И., Мальцева Е.А., Петрусёва И.О., Сильников В.Н., Зацепин Т.С., Орецкая Т.С., Шерер О.Д., Лаврик О.И. Взаимодействие факторов эксцизионной репарации нуклеотидов ХРС-HR23В, ХРА, и RPA с повреждённой ДНК // Биохимия. –2008. –Т. 73. –С. 1101–1113.
2. Dickson A.M., Krasikova Y., Pstryakov P., Lavrik O., Wold M.S. Essential functions of the 32-kDa subunit of yeast Replication Protein A // Nucleic Acids Res. –2009. –V. 37. –P. 2313–2326.
3. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Petrusseva I.O., Lavrik O.I. Localization of xeroderma pigmentosum group A protein and replication protein A on damaged DNA in nucleotide excision repair // Nucleic Acids Res. –2010. –V. 38. –P. 8083–8094.
4. Речкунова Н.И., Красикова Ю.С., Лаврик О.И. Эксцизионная репарация нуклеотидов: узнавание повреждений ДНК и формирование предрасщепляющего комплекса // Биохимия. –2011. –Т. 76. –С. 32–45.