

На правах рукописи

МЕЧЕТИН ГРИГОРИЙ ВЕНИАМИНОВИЧ

**ПРОЦЕССИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭКСЦИЗИОННОЙ  
РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата химических наук

Новосибирск - 2011

Работа выполнена в Институте химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

д.б.н., доцент Жарков Дмитрий Олегович

Официальные оппоненты:

д.х.н., доцент Грайфер Дмитрий Маратович

к.б.н. Синицына Ольга Ивановна

Ведущая организация:

Институт молекулярной генетики РАН

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2011 г. в \_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при  
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
по адресу: 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

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

С авторефератом можно ознакомиться на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2011 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент

Коваль В.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** ДНК-*N*-гликозилазы и АП-эндонуклеазы являются ключевыми ферментами одного из наиболее значимых путей исправления повреждений в ДНК — системы эксцизионной репарации оснований (ЭРО). Как главные компоненты ЭРО, эти ферменты должны обладать способностью быстро обнаруживать модифицированные звенья в геноме значительных размеров на фоне избытка неповрежденных нуклеотидов. На сегодняшний день рассматривается несколько не зависящих от гидролиза НТР механизмов поиска белками специфических сайтов узнавания в ДНК. При *коррелированном* механизме поиска белок движется по ДНК случайным образом некоторое время без диссоциации (*слайдинг*), или же во время движения по ДНК может происходить увеличение расстояния между поверхностями ДНК и белка на несколько молекулярных слоев воды без полной потери взаимодействия ДНК–белок (*хоппинг*). *Дистрибутивный* механизм заключается в частых событиях ассоциации белка и ДНК с последующей диссоциацией этого комплекса. При *интерсегментном переносе* поиск осуществляется благодаря сближению в пространстве двух сегментов ДНК, далеких друг от друга по контуру ДНК, и переносу фермента с одного сегмента на другой. Этот механизм требует наличия более одного ДНК-связывающего домена у белка.

К настоящему моменту существует два распространенных биохимических метода изучения механизма поиска повреждений ферментами репарации: с использованием содержащих повреждения конкатемерного ДНК-субстрата или суперскрученной плазмиды. Однако, данные методы имеют ряд недостатков. Например, в методе суперскрученной плазмиды в субстрат можно вводить лишь ограниченный спектр повреждений, и невозможно контролировать их расположение. Оба метода не позволяют оценить параметры транслокации фермента по ДНК, а дают лишь оценку вклада коррелированного и дистрибутивного механизмов в процесс поиска ферментом мишени в ДНК; затруднены вариации структуры субстрата и введение дополнительных модификаций в субстрат.

**Цель настоящей работы** Цель настоящей работы состояла в развитии нового биохимического подхода для изучения механизма поиска повреждений ДНК ферментами репарации, позволяющего оценить параметры этого процесса, а также в изучении влияния различных факторов на механизм поиска, используемый ферментами

репарации. В ходе исследования необходимо было решить следующие задачи:

- развить метод, позволяющий количественно описать механизм транслокации ферментов репарации вдоль двойной цепи;
- для урацил-ДНК-гликозилазы из *E. coli* (*Eco*-Ung) изучить влияние ионов  $K^+$  и  $Mg^{2+}$ , эффекта вытесненного объема, ДНК-связывающих белков, разрывов и брешей разной протяжённости в ДНК на процесс поиска повреждений;
- сравнить механизмы поиска повреждений, осуществляемого полноразмерной ядерной изоформой урацил-ДНК-*N*-гликозилазы человека (hUNG) и ее каталитическим доменом (hUNGΔN93);
- изучить поиск повреждений в ДНК АП-эндонуклеазами *E. coli* (*Eco*-Nfo) и человека (hAPEX1).
- оценить кинетические параметры одномерной диффузии фермента Ung вдоль ДНК.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** В работе развита новый биохимический метод изучения механизмов поиска фермент-специфических модификаций ДНК ферментами ЭРО, позволяющий оценить константу скорости транслокации фермента вдоль цепи ДНК и константу скорости диссоциации комплекса фермент–ДНК при нахождении фермента на конце линейной ДНК. В отличие от ранее использованных биохимических подходов, метод позволяет значительно расширить спектр модификаций, вводимых в используемый ДНК-субстрат, а также полностью контролировать структуру субстрата. Подход позволяет исследовать механизмы поиска повреждений в одноцепочечной ДНК, чего нельзя было сделать ранее используемыми методами. Впервые изучено влияние дополнительного N-концевого домена белка hUNG на механизм поиска мишеней. Впервые показано, что ионы  $Mg^{2+}$  оказывают большее влияние на коррелированный поиск мишеней ферментом Ung в двуцепочечной ДНК, чем ионы  $K^+$ . Даны первые количественные оценки коррелированного поиска мишеней АП-эндонуклеазами человека и *E. coli*. Помимо ферментов ЭРО, метод может быть использован для изучения коррелированного поиска любыми ДНК-зависимыми белками, узнающими и расщепляющими специфические модификации или последовательности ДНК.

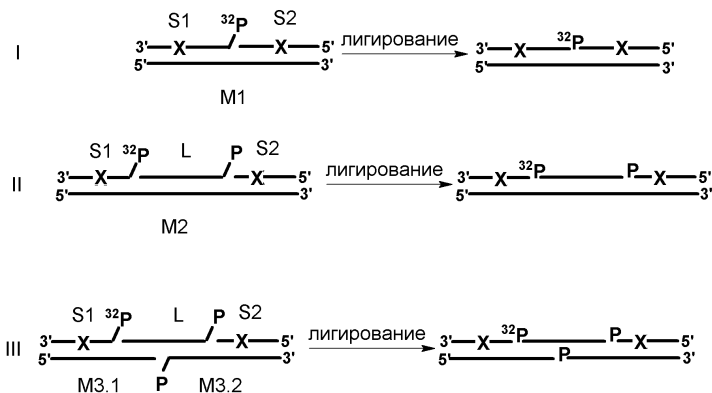
**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 4 печатных работы. Результаты работы были представлены на международных конференциях «Russian–European Workshop on DNA Repair and Epigenetic Regulation of Genome Stability» (Санкт-Петербург, Россия, 2008), «Медицинская геномика и протеомика» (Новосибирск, Россия, 2009), «Replication meets repair» (Йена, Германия, 2010).

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, и списка литературы. Работа изложена на 110 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка, 6 таблиц и 1 приложение. Библиография включает 242 литературных источника.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Основы предложенного метода**

Метод основан на расщеплении специально сконструированного ДНК-субстрата, представляющего собой одноцепочечный (оц-) или двуцепочечный (дц-) олигодезоксирибонуклеотид (ОДН) с двумя специфическими сайтами расщепления для данного фермента, разделенными неспецифической ДНК определенной длины, и  $^{32}\text{P}$ -фосфатом в центре субстрата между сайтами расщепления. Субстрат конструируется лигированием двух коротких оц-ОДН, каждый из которых содержит по одному сайту расщепления, а один оц-ОДН – радиоактивную метку на 5'-конце, с использованием комплементарного оц-ОДН равного (или большего для получения оц-субстрата) размера (рис. 1, I). Для синтеза более протяженных субстратов те же оц-ОДН лигировали на более длинной матрице (или двух матрицах, каждая из которых комплементарна половине получаемого субстрата, а одна содержит фосфат на 5'-конце для возможности последующего лигирования), используя дополнительный линкерный ОДН с фосфатом на 5'-конце, соответствующий последовательности между оц-ОДН с сайтами расщепления (рис. 1, II, III).



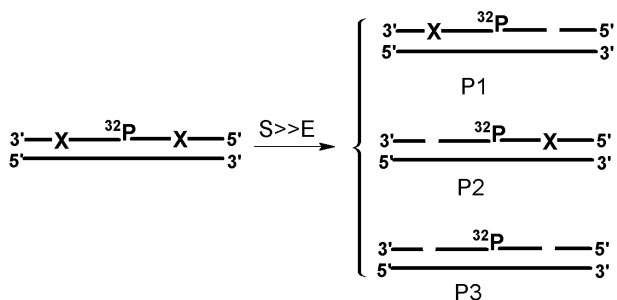
**Рис. 1.** Конструирование используемого в методе субстрата. S1, S2 — оц-ОДН, содержащие фермент-специфический сайт расщепления (X). M1, M2, M3.1, M3.2 — комплементарные оц-ОДН, служащие матрицей для лигирования. L — линкерный оц-ОДН.

В условиях большого избытка субстрата над ферментом, когда практически исключена возможность повторной ассоциации молекулы фермента с одной и той же молекулой ДНК, в ходе реакции будут формироваться два продукта расщепления по одному из сайтов (продукты P1, P2), и продукт расщепления по обоим сайтам (продукт P3, рис. 2А). Продукт P3 может образоваться только в том случае, если, расщепив первый сайт, фермент достигнет второго сайта без диссоциации комплекса фермент–ДНК. Таким образом, накопление продукта P3 соответствует коррелированному механизму поиска поврежденных звеньев ферментом. Взяв отношение начальной скорости накопления P3 к суммарной скорости расщепления субстрата (которые можно определить как углы наклона прямых накопления продуктов расщепления от времени, рис. 2Б), можно получить вероятность коррелированного расщепления ДНК:

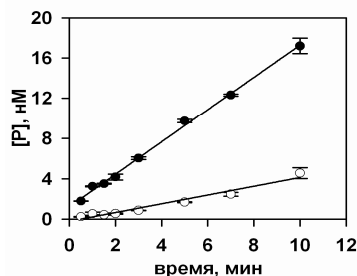
$$P_{cc} = \frac{V_{P3}}{V_{P1} + V_{P2} + V_{P3}}. \text{ Величина } P_{cc} \text{ зависит от исследуемого фермента}$$

и заданного расстояния между сайтами расщепления, и представляет собой условную вероятность расщепления второго поврежденного сайта при условии, что первый сайт уже расщеплен.

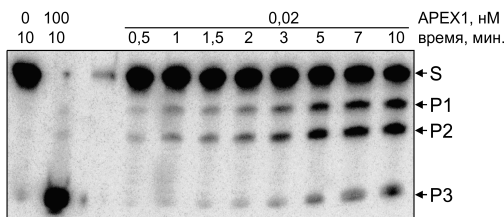
A



Б



В



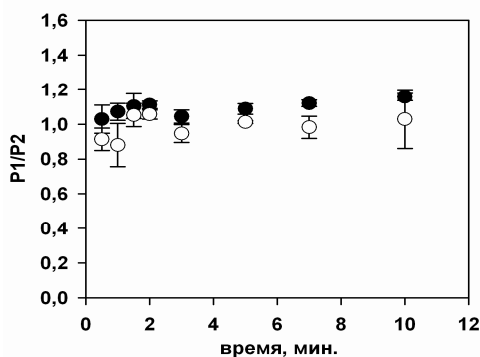
**Рис. 2.** Расщепление используемого в методе субстрата. А — образование продуктов расщепления по одному из сайтов (P1, P2), и по обоим сайтам (P3), X — фермент-специфический сайт расщепления. Б — график накопления продуктов расщепления субстрата, содержащего два остатка тетрагидрофуранового аналога АП-сайта, АП-эндонуклеазой АРЕХ1 при концентрации KCl 100 мМ. Стандартное отклонение приведено для трех независимых экспериментов. ● — P1 + P2, ○ — P3. В — типичный радиоавтограф электрофореграммы разделения продуктов реакции в 20%-ном полиакриламидном геле в присутствии 8 М мочевины.

Величина  $P_{cc}$  может быть представлена как произведение вероятности транслокации фермента между первым и вторым сайтами расщепления без диссоциации ( $P_T$ ) на вероятность расщепления второго сайта ( $P_E$ ), которая обычно имеет значения, близкие к единице. Значение  $P_E$  может быть определено независимо при помощи методов предстационарной кинетики.

Поскольку при расчете  $P_{cc}$  предполагается равная вероятность расщепления субстрата по каждому из сайтов, необходимо было убедиться в эквивалентности кинетических параметров расщепления олигонуклеотидов S1 и S2 (рис. 1), соответствующих каждой половине субстрата. Как можно видеть из табл. 1, параметры расщепления таких олигонуклеотидов мало отличались для одного и того же фермента, а отношение продуктов расщепления по одному из сайтов для субстратов, содержащих два расщепляемых звена, не менялось с течением времени и было близко к единице (рис. 3).

**Табл. 1.** Кинетические параметры расщепления 20-звенных оц- или дц-ОДН, содержащих одно поврежденное звено, использованных для конструирования субстратов

| Фермент               | Повреждение                            | ОДН | $K_M$ , нМ  | $k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup> |
|-----------------------|----------------------------------------|-----|-------------|-------------------------------|
| UNG человека          | Ura                                    | S1  | 4200 ± 600  | 2400 ± 100                    |
|                       |                                        | S2  | 2800 ± 500  | 2100 ± 200                    |
| Ung из <i>E. coli</i> |                                        | S1  | 1400 ± 300  | 6200 ± 400                    |
|                       |                                        | S2  | 2600 ± 1000 | 6900 ± 1100                   |
| APEX1 человека        | тетрагидрофурановый<br>аналог АП-сайта | S1  | 18 ± 3      | 500 ± 30                      |
|                       |                                        | S2  | 24 ± 6      | 460 ± 50                      |
| Nfo из <i>E. coli</i> |                                        | S1  | 37 ± 10     | 29 ± 3                        |
|                       |                                        | S2  | 35 ± 8      | 20 ± 2                        |

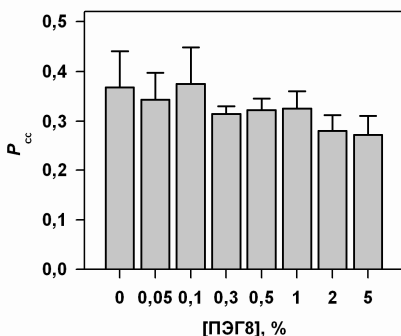


**Рис. 3.** График зависимости соотношения концентраций продуктов расщепления по одному из сайтов (P1/P2, см. рис. 2) в полноразмерном ДНК-субстрате для Ung (●) и Nfo (○) из *E. coli* от времени. В случае Ung субстрат содержал два остатка урацила, в случае Nfo — два тетрагидрофурановых аналога АП-сайта. Стандартное отклонение приведено для трех независимых экспериментов.

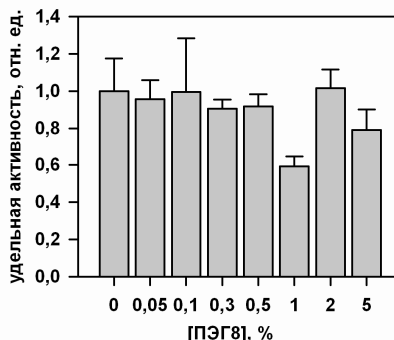
## Влияние условий реакции на механизм поиска поврежденных оснований ферментом Ung из *E. coli*

Внутри клетки существует ряд факторов, которые в принципе могут тем или иным способом влиять на эффективность коррелированного поиска. К таким факторам относятся эффект вытесненного объема, присутствие ионов  $K^+$  и  $Mg^{2+}$  и наличие внутри клетки ДНК-связывающих белков, которые могут мешать транслокации других ДНК-зависимых белковых факторов. В качестве высокомолекулярного агента для изучения влияния эффекта вытесненного объема использовали полиэтиленгликоль (ПЭГ) со средней молекулярной массой 8 кДа в интервале концентраций 0–5%. Однако влияния эффекта вытесненного объема ни на величину  $P_{cc}$ , ни на каталитическую активность Ung выявлено не было (рис. 4).

А



Б

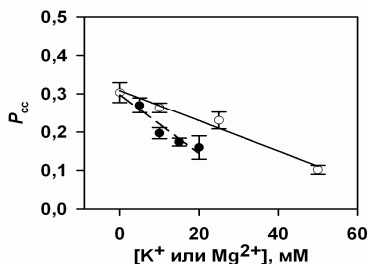


**Рис. 4.** График зависимости  $P_{cc}$  (А) и удельной активности расщепления (Б) субстрата, содержащего урацил, ферментом Ung из *E. coli* от концентрации ПЭГ. Стандартное отклонение приведено для трех независимых экспериментов. Удельная активность определялась как отношение суммы скоростей накопления продуктов расщепления по одному из остатков урацила при разных концентрациях ПЭГ к этой сумме при отсутствии ПЭГ.

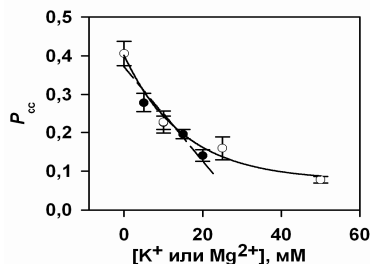
Как можно видеть из рис. 5, в присутствии ионов  $Mg^{2+}$   $P_{cc}$  для дц-ДНК снижалась примерно в 2,5 раза быстрее, чем в присутствии ионов  $K^+$ , при этом влияние этих ионов на  $P_{cc}$  для оц-ДНК было одинаковым. Так как сольватированные ионы  $Mg^{2+}$ , помимо чисто электростатического взаимодействия с сахарофосфатным остовом, способны также образовывать координационные связи с разными

позициями дц-ДНК, логично предположить, что большее влияние ионов  $Mg^{2+}$  на  $P_{cc}$  для дц-ДНК обусловлено именно этой их способностью, а влияние ионов  $K^+$ , по-видимому, обусловлено чисто электростатическими взаимодействиями с ДНК.

**А**



**Б**



**Рис. 5.** График зависимости  $P_{cc}$  дц- (А) и оц-ДНК (Б) от концентрации ионов  $Mg^{2+}$  (●) и  $K^+$  (○). Стандартное отклонение приведено по результатам трех независимых экспериментов.

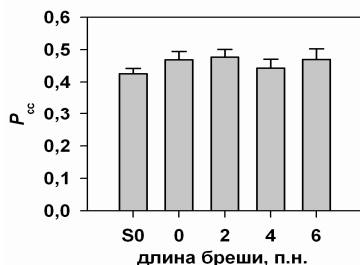
Как можно видеть из табл. 2, значения  $P_{cc}$  для урацил-ДНК-гликозилазной активности в экстрактах клеток *E. coli* были примерно в 3 раза ниже, чем активность очищенного препарата Ung. Данный эффект может быть объяснен прочным связыванием с ДНК молекул белков, конкурирующих с процессом транслокации фермента Ung по ДНК, а также связыванием с ДНК внутриклеточных полиаминов, экранирующих ее отрицательный заряд.

**Табл. 2.** Сравнение величин вероятности коррелированного расщепления для урацил-ДНК-гликозилазных активностей в экстрактах клеток *E. coli* и человека с очищенными препаратами урацил-ДНК-гликозилаз

| фермент или клеточный экстракт, субстрат | $P_{cc}$ |
|------------------------------------------|----------|
| <i>E. coli</i> , дц-ДНК                  | 0,12     |
| <i>E. coli</i> , оц-ДНК                  | 0,11     |
| Ung, дц-ДНК                              | 0,31     |
| Ung, оц-ДНК                              | 0,41     |

Для анализа влияния различных препятствий на процесс поиска была также определена способность белка Ung преодолевать оц-бреши длиной в 2–6 нуклеотидов между сайтами расщепления. Наличие бреши не влияло на вероятность коррелированного

расщепления (рис. 6), что, по-видимому, связано либо со сходной эффективностью транслокации белка Ung вдоль оц- и дц-ДНК, либо со значительным вкладом хоппинга, позволяющим белку преодолевать небольшие по размеру препятствия без полной потери взаимодействия с ДНК.



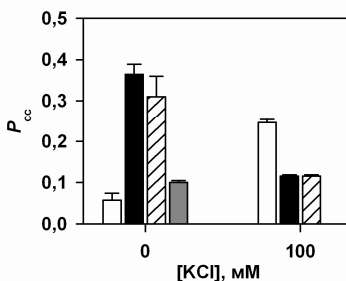
**Рис. 6.** График зависимости  $P_{cc}$  субстрата с урацилом ферментом Ung из *E. coli* от длины брешы. S0 — дц-субстрат без разрыва цепи, нулевая точка — субстрат с разрывом цепи. Стандартное отклонение приведено по результатам трех независимых экспериментов.

### **Коррелированный поиск повреждений ДНК полноразмерной урацил-ДНК-гликозилазой человека и ее каталитическим доменом**

Многие ферменты эукариот отличаются от прокариотических гомологов наличием дополнительных последовательностей, не играющих роли в катализе, но выполняющих дополнительные функции. В то же время практически ничего не известно о влиянии таких дополнительных последовательностей на коррелированный поиск мишеней эукариотическими ДНК-зависимыми белками.

Ядерная изоформа белка hUNG человека и других эукариот отличается от белка Ung бактерий наличием дополнительного N-концевого участка, который не важен для активности и, по всей вероятности, выполняет регуляторные функции. Широко используемый в биохимических исследованиях рекомбинантный вариант урацил-ДНК-гликозилазы человека hUNGΔN93 лишен 93 аминокислот с N-конца, представляя из себя высококонсервативный каталитический домен фермента, который отличается по длине от Ung всего на 7 аминокислотных остатков.

Как можно видеть из рис. 7, при концентрации KCl 100 мМ значение  $P_{cc}$  для полноразмерной формы hUNG превышало значение  $P_{cc}$  hUNGΔN93 в два раза, что, по-видимому, связано с более высоким положительным зарядом полноразмерной формы фермента.

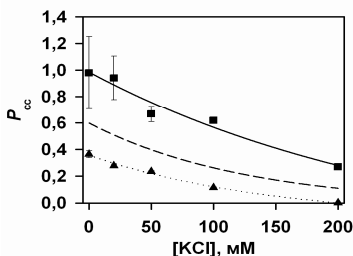


**Рис. 7.**  $P_{cc}$  дц-субстрата при разных концентрациях KCl для ферментов hUNG (белые столбцы), hUNGΔN93 (черные столбцы), Ung из *E. coli* (штрихованные столбцы) и урацил-ДНК-гликозилазной активности экстракта клеток миеломы человека линии RPMI-8226 (серые столбцы). Стандартное отклонение приведено для трех независимых экспериментов.

При низкой концентрации KCl наблюдалась обратная картина: значение  $P_{cc}$  для hUNGΔN93 превышало  $P_{cc}$  для полноразмерного фермента hUNG в 6,3 раза. Возможно, в условиях низкой ионной силы наличие положительно заряженного N-концевого фрагмента белка hUNG ведет к более тесному связыванию фермента с продуктом реакции по первому из двух поврежденных звеньев, что замедляет накопление продукта двойного расщепления. Значение  $P_{cc}$  для урацил-ДНК-*N*-гликозилазной активности при использовании экстракта миеломной клеточной линии человека RPMI-8226 было заметно ниже, чем для очищенного каталитического домена фермента, но сопоставимо со значением для полноразмерного фермента (рис. 7), что указывает на возможность хотя бы частичной реализации коррелированного поиска в условиях конкуренции за субстрат между урацил-ДНК-гликозилазой и другими ДНК-связывающими белками в клетке.

### **Коррелированный поиск повреждений ДНК АП-эндонуклеазами АРЕХ1 человека и Nfo из *E. coli***

При изучении зависимости значения  $P_{cc}$  АП-эндонуклеаз от концентрации KCl наблюдалось снижение  $P_{cc}$  при увеличении ионной силы среды, что типично для белков, осуществляющих коррелированный поиск (рис. 8). Для фермента Nfo обнаруживалось наибольшее значение  $P_{cc}$  из всех исследованных ДНК-гликозилаз и АП-эндонуклеаз, достигающее ~1 при нулевой концентрации KCl (рис. 8). При концентрации KCl 200 мМ, близкой к физиологической, значения  $P_{cc}$  для АП-эндонуклеаз лежали в диапазоне 0,1–0,3, что указывает на возможность реализации коррелированного поиска АП-эндонуклеазами внутри клетки.

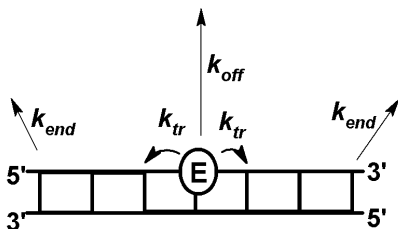


**Рис. 8.** График зависимости  $P_{cc}$  дц-субстратов, содержащих два остатка тетрагидрофуранового аналога АП-сайта (для АП-эндонуклеаз) или урацила (для Ung) от концентрации KCl в реакционной смеси ферментами Nfo из *E. coli* (■), APEX1 человека (●) и Ung из *E. coli* (▲). Стандартное отклонение построено по результатам трех независимых экспериментов.

Преимущественно электростатический характер взаимодействий ферментов репарации с ДНК дает основания предположить, что  $P_{cc}$  может зависеть от распределения положительного заряда в ДНК-связывающей области белка, так как больший положительный заряд снижает константу диссоциации комплекса ДНК–белок и, соответственно, должен увеличивать  $P_{cc}$ . Однако анализ величины и распределения заряда в ДНК-связывающих областях исследуемых ферментов, а также еще двух гликозилаз, для которых был изучен коррелированный поиск (OGG1 человека и Fpg из *E. coli*), не выявил значительной корреляции между значениями суммарного заряда и  $P_{cc}$  для одних и тех же концентраций KCl.

### Влияние расстояния между поврежденными основаниями на вероятность коррелированного расщепления субстрата ферментом Ung

Коррелированный поиск может быть описан в терминах кинетических констант транслокации фермента между соседними позициями в ДНК ( $k_{tr}$ ), диссоциации с занимаемой позиции ( $k_{off}$ ), а также диссоциации с концов ДНК ( $k_{end}$ ) (рис. 9).



**Рис. 9.** Кинетическая схема, описывающая коррелированный поиск белками специфических мишеней в ДНК.

Теоретическое описание Белоцерковского–Зарлинга (B.P. Belotserkovskii, D.A. Zarling, J. Theor. Biol., V. 226, № 2, p. 195–

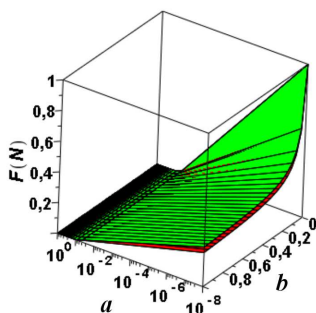
203; 2004) позволяет найти данные кинетические константы, исходя из зависимости вероятности транслокации фермента между первым и вторым сайтами расщепления (позициями  $x_0$  и  $x$ ) без диссоциации  $W(x_0, x)$  от расстояния между сайтами расщепления:

$$W(x_0, x) = \frac{\operatorname{ch}(x_0 \cdot \sqrt{a}) + \frac{b}{\sqrt{a}} \cdot \operatorname{sh}(x_0 \cdot \sqrt{a})}{\operatorname{ch}(x \cdot \sqrt{a}) + \frac{b}{\sqrt{a}} \cdot \operatorname{sh}(x \cdot \sqrt{a})}$$

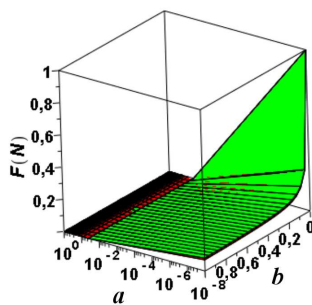
При этом параметр  $a = k_{\text{off}}/k_{\text{tr}}$  соответствует характерной дистанции коррелированного поиска, а параметр  $b = k_{\text{end}}/k_{\text{tr}}$  характеризует вероятность отражения фермента от концов ДНК-субстрата.

Следует отметить, что данное описание рассматривает фермент после связывания с первым сайтом ( $x_0$ ), в то время как в реальности фермент связывается с произвольной позицией в ДНК. Кроме того, уравнение Белоцерковского–Зарлингa описывает функцию непрерывного аргумента  $x$ , в то время как в действительности процесс блуждания белка по ДНК состоит из переходов между дискретными состояниями. Для проверки применимости теории Белоцерковского–Зарлингa была составлена кинетическая схема, описывающая процесс каталитического превращения  $N + 12$  звеного ДНК-субстрата с фермент-специфическими сайтами в позициях 5 и  $N + 6$ , включающая стадию связывания фермента с произвольной позицией ДНК с возможностью диссоциации из этой позиции, одномерную диффузию фермента по ДНК до достижения первого фермент-специфического сайта, а также одномерную диффузию фермента по ДНК после расщепления обоих сайтов с возможной диссоциацией фермент-субстратного комплекса на каждом шаге. Система уравнений для двух частных случаев с расстоянием между сайтами расщепления в 20 и 80 нуклеотидов была решена в квазистационарном приближении, а решение системы было использовано для нахождения величины вероятности расщепления обоих сайтов без диссоциации с ДНК,  $P_T(N)$ . Значения  $P_T(N)$  были сопоставлены с соответствующими им значениями  $W(x_0, x)$ . Как можно видеть из рис. 10, величины  $P_T(N)$  и  $W(x_0, x)$  совпадают в широком диапазоне значений параметров  $a$  и  $b$ .

А

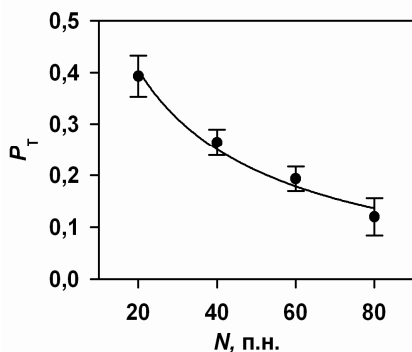


Б



**Рис. 10.** Сравнение графиков зависимости величин  $P_T(N)$  (■) и  $W(5, N + 6)$  (■) от параметров  $a$  и  $b$  для  $N = 20$  нт. (А) и  $N = 80$  нт. (Б). Обозначение  $F(N)$  на оси относится к функциям  $P_T(N)$  или  $W(5, N + 6)$ .

Описание Белоцерковского–Зарлинг было использовано для нахождения кинетических параметров коррелированного поиска остатков урацила в ДНК ферментом Ung. Для определения  $P_T(N) = P_{cc}/P_E$  было использовано значение  $P_E$ , установленное в работе (R.H. Porecha, J.T. Stivers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 105, № 31, p. 10791–10796; 2008). Теория Белоцерковского-Зарлинг хорошо описывала экспериментальные значения  $P_T(N)$  (рис. 11).



**Рис. 11.** Аппроксимация экспериментальной зависимости транслокационной компоненты  $P_T = P_{cc}/P_E$  от расстояния между основаниями урацила для реакции коррелированного расщепления ДНК-субстрата ферментом Ung из *E. coli* функцией  $0,5 \times [W(7, N + 8) + W(12, N + 13)]$ . Стандартное отклонение соответствует трем независимым экспериментам.

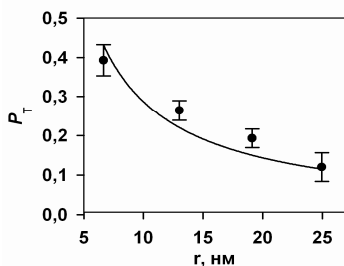
В результате были получены параметры  $a = 10^{-4}$ ,  $b = 0,2$ , что соответствует характерной дистанции коррелированного поиска ~100 п.н. и вероятности отражения от концов линейного субстрата

0,83. Значения констант скорости  $k_{tr}$  и  $k_{end}$  были получены, исходя из опубликованного значения  $k_{off} = 200 \text{ с}^{-1}$  (R.H. Porecha, J.T. Stivers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 105, № 31, p. 10791–10796; 2008), и составили  $2 \times 10^6 \text{ с}^{-1}$  и  $4 \times 10^5 \text{ с}^{-1}$  соответственно.

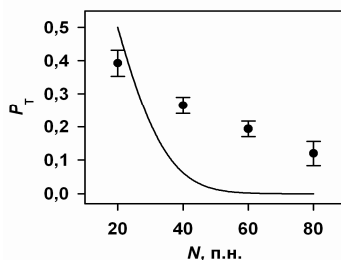
В рамках другого теоретического описания (N.P. Stanford *et al.*, EMBO J., V. 19, № 23, p. 6546–6557; 2000) при использовании ферментом преимущественно слайдинга величина  $P_T$  зависит от

расстояния между сайтами расщепления как  $P_T(N) = P N^2$ , в то время как при преимущественном вкладе хоппинга  $P_T(N) = A/r$ , где  $A$  — характерная дистанция слайдинга, а  $r$  — среднее расстояние между сайтами расщепления в пространстве. Экспериментальные данные достаточно хорошо описывались функцией  $A/r$  с характерной длиной слайдинга  $\sim 9$  пар нуклеотидов и не аппроксимировалась функцией  $P N^2$  (рис. 12), из чего можно сделать вывод о значительном вкладе хоппинга в коррелированный поиск.

А



Б



**Рис. 12.** Аппроксимация экспериментальной зависимости транслокационной компоненты  $P_T = P_{cc}/P_E$  от расстояния между основаниями урацила для реакции коррелированного расщепления ДНК-субстрата ферментом Ung из

*E. coli* функциями (А)  $A/r$  (хоппинг) и (Б)  $P N^2$  (слайдинг).

### Выводы

1. Развита новый метод, позволяющий изучать параметры коррелированного поиска мишеней в ДНК ферментами репарации с использованием величины вероятности коррелированного расщепления ( $P_{cc}$ ) субстратов, содержащих два фермент-специфических сайта. Показано,

что метод применим для исследования коррелированного поиска мишеней как в одноцепочечной, так и в двуцепочечной ДНК.

2. Показано различное влияние ионов  $Mg^{2+}$  и  $K^+$  на эффективность коррелированного поиска мишеней в двуцепочечной ДНК урацил-ДНК-гликозилазой Ung из *E. coli*, объясняемое разной способностью этих ионов образовывать с ДНК координационные связи и экранировать отрицательный заряд ДНК. Установлено отсутствие значительного влияния эффекта вытесненного объема, одноцепочечных разрывов и брешей различной длины на величину  $P_{cc}$ . Показано значительное влияние ДНК-связывающих белков в клеточных экстрактах на величину  $P_{cc}$  урацил-ДНК-гликозилазы.
3. Исследовано влияние N-концевого фрагмента ядерной изоформы урацил-ДНК-гликозилазы человека (UNG) на эффективность коррелированного поиска мишеней этим ферментом. При низкой ионной силе N-концевой фрагмент уменьшает значения  $P_{cc}$ , а при оптимальной концентрации соли — увеличивает их, что может быть связано с увеличением сродства полноразмерной формы UNG к ДНК за счёт положительного заряда N-концевого фрагмента.
4. Показано, что АП-эндонуклеазы человека (APEX1) и *E. coli* (Nfo) способны к коррелированному расщеплению ДНК-субстратов, причем значения  $P_{cc}$  при концентрациях KCl, близких к физиологическим (100–200 мМ), достигают 0,2–0,5, что указывает на возможность реализации АП-эндонуклеазами коррелированного поиска *in vivo*.
5. При помощи теории Белоцерковского–Зарлинга, описывающей процесс одномерной диффузии белков по ДНК, оценены параметры поиска мишеней ферментом Ung: характерная дистанция коррелированного поиска (100 пар нуклеотидов), вероятность отражения от концов линейного субстрата (0,83), константа скорости транслокации ( $2 \times 10^6 \text{ с}^{-1}$ ) и константа скорости диссоциации комплекса белок–ДНК при расположении фермента на конце линейной ДНК ( $4 \times 10^5 \text{ с}^{-1}$ ). Установлено, что хоппинг вносит значительный вклад в

коррелированный поиск мишеней ферментом Ung, при этом характерная дистанция слайдинга составляет 8–9 пар нуклеотидов.

**Основные результаты диссертации опубликованы в  
следующих работах:**

1. Sidorenko V.S., Mechetin G.V., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Correlated cleavage of single- and double-stranded substrates by uracil-DNA glycosylase // FEBS Lett. – 2008. – V. 582 – № 3. – P. 410–414.
2. Zharkov D.O., Mechetin G.V., Nevinsky G.A. Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition // Mutat. Res. – 2010. – V. 685. № 1–2. – P. 11–20.
3. Мечетин Г.В., Жарков Д.О. Механизм поиска субстратов ферментами эксцизионной репарации оснований // Доклады АН. – 2011. – Т. 437. – № 5. – С. 695–698.
4. Mechetin G.V., Zharkov D.O. Mechanism of translocation of uracil-DNA glycosylase from *Escherichia coli* between distributed lesions // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – V. 414. – № 2. P. 425–430.