

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Дятлова Евгения Алексеевна

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД об основных результатах выполненной научно-
квалификационной работы**

Поиск мишеней в канонических и неканонических структурах
ДНК ферментами, модифицирующими ДНК

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.04 Биохимия

Новосибирск - 2019

1. Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Многие ферменты, имеющие специфические сайты связывания в ДНК, сталкиваются с проблемой их быстрого и эффективного поиска среди огромного количества неспецифичной ДНК. Такая проблема актуальна, в частности, для ферментов репарации, транскрипционных факторов и эндонуклеаз рестрикции. Для объяснения механизмов, позволяющих быстро и без затрат энергии сканировать ДНК, в 1981 г. Бергом и Фон Хиппелем было предложено 4 модели такого поиска (рис.1): «скольжение» (англ. sliding) — когда процесс поиска осуществляется посредством диффузии белка вдоль цепи ДНК в случайном направлении, при этом не происходит распада ДНК-белкового комплекса; «перепрыгивание» (англ. hopping) — когда белок перемещается между близко расположенными областями цепи ДНК, находясь в непосредственной близости от нее, при этом электростатическое взаимодействие между белком и ДНК не теряется полностью; дистрибутивный механизм — процесс ассоциации–диссоциации ДНК-белкового комплекса, когда белок связывается с ДНК в произвольной области; если она не оказалась специфичной мишенью, ДНК-белковый комплекс диссоциирует и белок вновь связывается с ДНК в другом месте; интерсегментный перенос — перенос молекулы белка между удаленными участками ДНК при их сближении в пространстве (*Berg O.G. et al., 1981, Biochemistry*). Слайдинг и хоппинг относят к процессивным (или коррелированным) механизмам, так как положение белка на ДНК в любой момент времени коррелирует с его положением в предыдущий момент. Фактически белок движется по контуру ДНК путем одномерной диффузии. Два других способа перемещения представляют собой дистрибутивный поиск с диффузией в трехмерном пространстве. Наибольшая скорость поиска достигается при сочетании ферментами процессивного и дистрибутивного механизмов, при этом преобладание одного или другого зависит от факторов, влияющих на ДНК-белковые взаимодействия. К ним относятся присутствие в клеточной среде моно- и дивалентных ионов металлов, наличие других белков, конкурирующих за связывание с ДНК, эффект вытесненного объема и т. п. В настоящее время показано, что даже несмотря на присутствие в клетках молекул, конкурирующих за связывание с ДНК, ферменты могут осуществлять процессивный поиск, однако этот процесс остается слабо изученным.

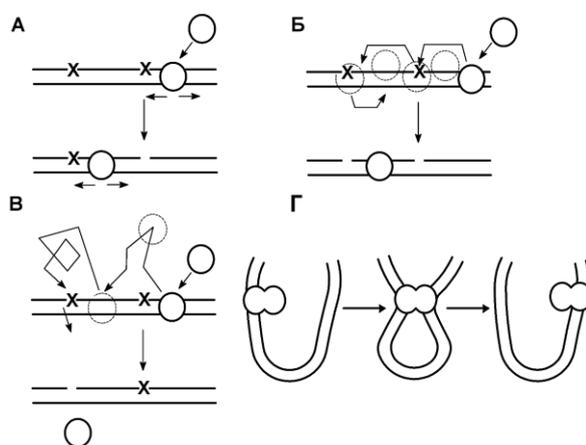


Рис. 1. Механизмы поиска специфических мишеней (X) ДНК-зависимыми ферментами. Слайдинг (А), хоппинг (Б), дистрибутивный механизм (В) и интерсегментный перенос (Г).

Повреждения ДНК — мишени для ферментов репарации — появляются в ДНК постоянно в силу действия экзогенных и внутриклеточных повреждающих факторов. Это приводит, в частности, к модификациям азотистых оснований, образованию апурин-апиримидиновых (АП)-сайтов и разрывов в ДНК. Такие повреждения репарируются системой эксцизионной репарации оснований. Ферменты ДНК-гликозилазы инициируют процесс, узнавая поврежденное звено и удаляя его посредством гидролиза *N*-гликозидной связи между основанием и остатком дезоксирибозы. Механизмы поиска поврежденных оснований ДНК-гликозилазами слабо исследованы из-за сложностей в изучении комплексов ферментов с прочно связанной неспецифичной ДНК. Из всех ДНК-гликозилаз такие комплексы структурно охарактеризованы только для урацил-ДНК-гликозилазы Ung и формамидопиримидин-ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli* и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1 человека. Все три фермента связываются с ДНК в малой бороздке и сканируют ее в поисках повреждения по механизму одномерной диффузии.

В начале 2000-х гг. были открыты три эукариотических фермента репарации, гомологичных белку Nei *E. coli* из структурного суперсемейства ДНК-гликозилаз H2TH (helix-2 turn-helix — «спираль-два поворота-спираль») — NEIL1, NEIL2 и NEIL3 (Bandaru V. et al., 2002, *DNA Repair*; Rosenquist T.A. et al., 2003, *DNA Repair*; Hazra T.K. et al., 2002, *J. Biol. Chem.*). Эти ферменты репарируют окисленные основания, однако имеют перекрывающуюся субстратную специфичность с некоторыми другими гликозилазами и не являются необходимыми для выживания организма. NEIL1 репарирует основания в двуцепочечной ДНК, в то время как предпочтительный субстрат для NEIL2 – одноцепочечная ДНК и структуры т.н. «глазка» - интермедиата транскрипции, что указывает на важную роль NEIL2 в этом процессе. Механизмы поиска мишеней этих ферментов ранее не изучались.

Урацил-ДНК-гликозилаза (UNG) узнает и удаляет основания урацила из ДНК в любом контексте как в двуцепочечной, так и в одноцепочечной ДНК. Белки этого семейства встречаются в геномах всех изученных клеточных организмов, а также в геномах некоторых вирусов, таких как герпесвирусы и поксвирусы. Известно, что для выживания поксвирусов необходима именно вирусная форма урацил-ДНК-гликозилазы, а не клеточная, так как главная функция этого белка заключается не в репарации, а в участии в вирусной репликации (Stanitsa E.S et al., 2006, *J. Biol. Chem.*). В 2013 г. получена структурная модель репликативной вилки вируса осповакцины, где вирусная UNG (белок D4) в комплексе с белком A20 образует гетеродимер, формируя фактор процессивности вирусной ДНК-полимеразы (рис.2) (Sèle C. et al., 2013, *J. Virol.*).

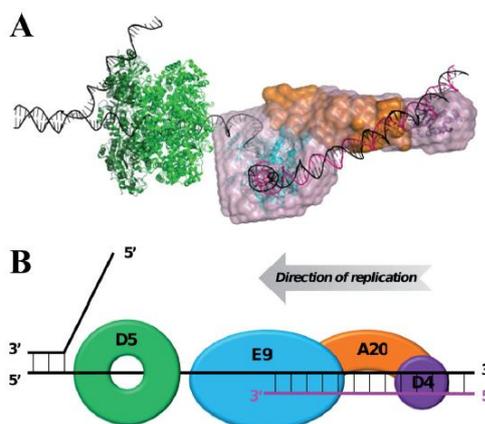


Рис. 2. Структурная модель (А) репликативной вилки вируса осповакцины; схематическое изображение (В) комплекса белков А20, Е9 и D4 (Sèle et al., 2013, J. Virol.).

Однако неизвестно, насколько высока процессивность самого фермента UNG вируса и какой вклад она вносит в процессивность полимеразы. Так как урацил-ДНК-гликозилазы поксвирусов необходимы для процесса репликации, они могут стать перспективной мишенью для противовирусной терапии.

Метод исследования процессивности: Для изучения процессивного (коррелированного) поиска мишеней ферментами репарации в работе был использован метод, разработанный в лаборатории, где выполнялось исследование. Метод основан на измерении вероятности коррелированного расщепления олигонуклеотидных субстратов, содержащих два повреждения и радиоактивную метку между ними (рис. 3А). В условиях большого избытка субстрата над ферментом, когда на одну молекулу субстрата приходится не более одной молекулы фермента, образуется два продукта расщепления по одному из сайтов (Р1 и Р2), и продукт расщепления по обоим сайтам (Р3) (рис. 3Б). В таких условиях связывание одной молекулы фермента с той же молекулой субстрата дважды очень маловероятно, поэтому образования Р3 возможно только в случае, если эта молекула фермента, совершив акт катализа одного из повреждений, переместится вдоль ДНК ко второму без диссоциации. Таким образом, накопление Р3 отражает механизм коррелированного поиска. Из отношения начальной скорости накопления $v(P3)$ к суммарной скорости накопления всех продуктов $v(P1)+v(P2)+v(P3)$ можно рассчитать вероятность коррелированного расщепления ДНК (probability of correlated cleavage, P_{cc}), которая зависит только от природы исследуемого фермента, условий среды и расстояния между повреждениями.

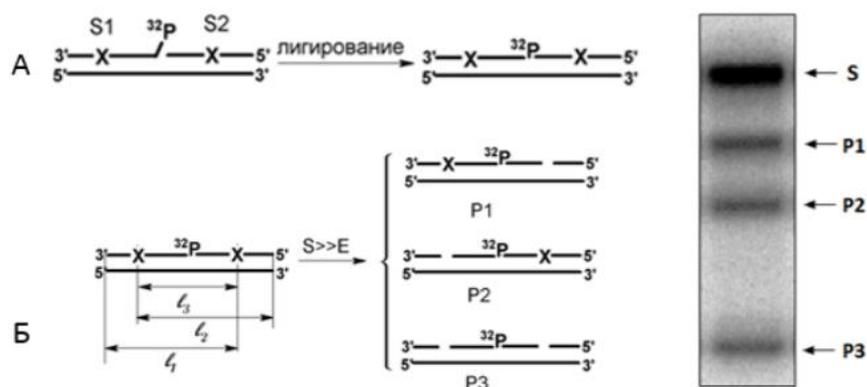


Рис. 3. Конструирование (А) и расщепление (Б) субстрата для изучения коррелированного расщепления. S1, S2 — одноцепочечный олигонуклеотид (ОДН), содержащие фермент-специфический сайт расщепления (X).

Цель настоящей работы состояла в изучении механизмов поиска мишеней некоторыми ферментами эксцизионной репарации оснований: Nei *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши, UNG вируса осповакцины, Ung *E. coli*.

В ходе работы решались следующие задачи:

1. Изучить процессивность ферментов суперсемейства H2TH: Nei *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши, а также влияние на значение коррелированного расщепления P_{cc} моно- и дивалентных ионов металлов.

2. Изучить процессивность фермента UNG вируса осповакцины, влияние на нее катионов металлов, одноцепочечных разрывов и брешей в ДНК, а также расстояния между повреждениями.

3. Определить влияние потенциальных ингибиторов UNG вируса осповакцины на каталитическую активность и процессивность этого фермента.

4. Изучить влияние на механизм процессивности Ung *E. coli* ковалентных аддуктов ДНК, а также нековалентных лигандов малой и большой бороздки.

Научная новизна и практическая значимость работы: Автором впервые изучен механизм поиска мишеней в ДНК ферментами эксцизионной репарации оснований Nei *E. coli* и NEIL1 и NEIL2 мыши. Полученные результаты также проясняют некоторые особенности взаимодействия этих ферментов с неспецифичной ДНК.

Впервые охарактеризована собственная процессивность фермента UNG вируса осповакцины. Найдены ингибиторы вирусной гликозилазы, которые потенциально могут стать терапевтическими молекулами, подавляющими репликацию вирусов семейства *Poxviridae*, в частности таких опасных для человека ортопоксвирусов как вирус натуральной оспы, вирус вакцины, вирус оспы обезьян и др.

Также впервые изучено влияние связанных с ДНК ковалентных аддуктов и нековалентных лигандов на механизм поиска мишеней ферментом Ung *E. coli*, что позволяет лучше понять поведение фермента в многокомпонентных клеточных системах.

Личное участие автора: Все работы по клонированию и выделению вирусной UNG, приготовлению субстратов и проведению кинетических реакций всех описанных экспериментов сделаны автором лично, за исключением экспериментов по определению процессивности Ung *E. coli* на радиоактивно меченных субстратах, а также по изучению процессивности этого фермента в присутствии нековалентных лигандов, выполненных к.х.н. Мечетиным Г.В.

2. Содержание работы

1. Процессивность ферментов суперсемейства H2TH – Nei *E. coli* и его эукариотических гомологов NEIL1 и NEIL2 мыши.

Белки NEIL1 и NEIL2, эукариотические гомологи ДНК-гликозилазы Nei *E. coli*, имеют субстратную специфичность, сильно перекрывающуюся с некоторыми другими гликозилазами (NTHL1, OGG1), в связи с чем остается открытым вопрос об их основной роли в клетке. Механизмы поиска мишеней в ДНК ранее не изучались ни для них, ни для бактериального фермента Nei. Был исследован вклад механизма процессивного поиска повреждений этими ферментами, и его зависимость от концентрации в среде ионов KCl и MgCl₂.

В качестве субстрата, общего для всех исследованных ферментов, был использован 5-гидроксиурацил (HOU), напротив которого располагалось основание гуанина (G). Субстраты с G напротив повреждения используются ферментами Nei и NEIL наиболее эффективно (*Morland I., et al., 2002, Nucleic Acids Res.*).

Реакционная смесь содержала 50 нМ субстрат, реакционный буфер (25 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол), моно- или дивалентные ионы металлов (0–200 мМ KCl или 0–25 мМ MgCl₂) и фермент (конечная молярная концентрация общего белка в реакционной смеси: 20 нМ для Nei, 18 нМ для NEIL1 и 156 нМ для NEIL2, доля активной формы не определялась). Концентрации ферментов подбирались так, чтобы за 10 мин реакции суммарное расщепление субстрата составляло не более 30% (что соответствует линейному накоплению продуктов). Ферменты были предоставлены руководителем работы. Реакцию вели при температуре 37°C, отбирали точки 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 и 10 мин и останавливали добавлением равного количества раствора, содержащего 80 %-ный формамид, 20 мМ ЭДТА, 0,1 %-ный ксиленцианол и 0,1 %-ный бромфеноловый синий, и прогреванием в течение 5 мин при температуре 95°C. Представленные данные начальных скоростей рассчитаны как средние значения со стандартным отклонением по 3–4 независимым повторам. На рис. 4 представлен типичный радиоавтограф геля.

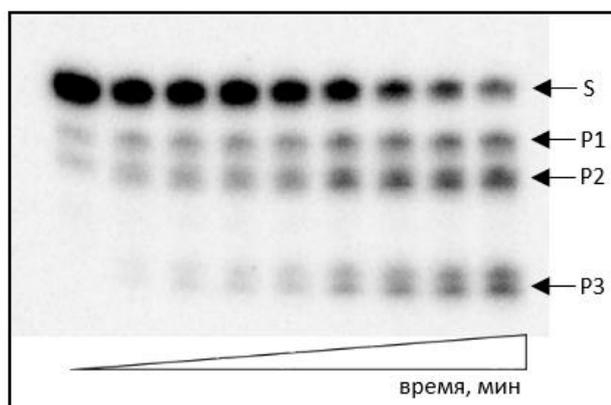


Рис. 4. Расщепление субстрата с гидроксиурацилом ферментом mNEIL1 (50 нМ субстрат, 18 нМ фермент, 25 мМ KCl). Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения продуктов расщепления субстрата при разном времени реакции. S – нерасщепленный субстрат, P1, P2 — продукты расщепления по одному из сайтов, P3 — продукт расщепления по обоим сайтам.

Так как ДНК в клетке заряжена отрицательно, она всегда окружена оболочкой из противоионов. Моновалентные катионы обычно заполняют малую и большую бороздки, более объемные дивалентные катионы Mg^{2+} образуют координационные связи с фосфатами сахарофосфатного остова ДНК (рис.5). При движении молекулы белка вдоль ДНК должно происходить вытеснение ионов белком, что приводит к снижению эффективности одномерной диффузии при увеличении ионной силы раствора. Зависимость транслокации белка от концентрации ионов обычно используют для доказательства осуществления белком одномерного поиска, а не диффузии в трех измерениях (Berg O.G. et al., 1981, Biochemistry).

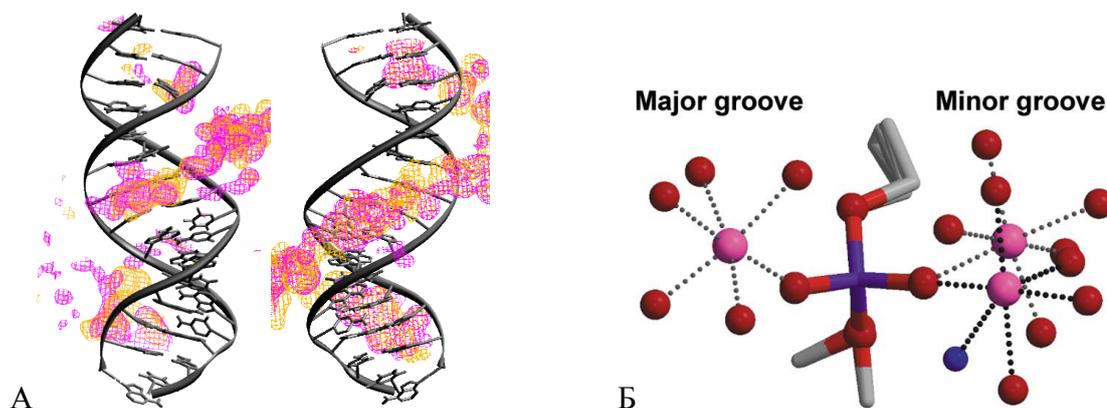


Рис. 5. Расположение моновалентных (А) и дивалентных (Б) катионов в большой (слева) и малой (справа) бороздках ДНК (А - Bonvin, 2000, Eur. Biophys. J.; Б – Subirana et. al., 2003, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.)

Для всех трех ферментов мы изучили влияние ионов на P_{cc} , варьируя концентрации KCl от 0 до 200 мМ (рис.6А) и $MgCl_2$ – от 0 до 25 мМ (рис. 6Б).

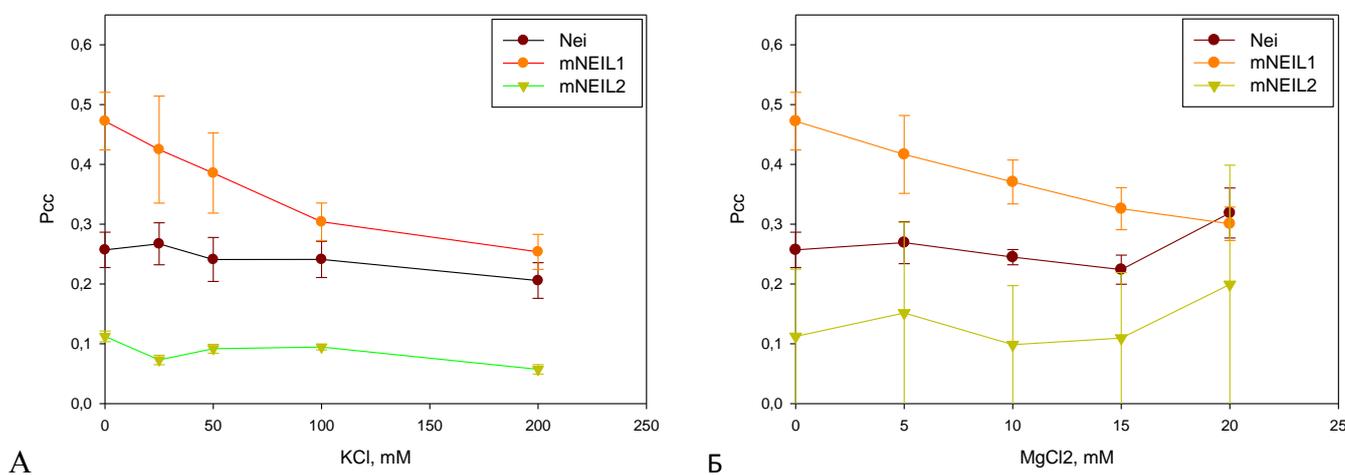


Рис. 6. Влияние ионов K^+ (А) и Mg^{2+} (Б) на вероятность коррелированного расщепления дц-субстрата с двумя НОУ сайтами ферментами Nei *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши. Зависимость P_{cc} от концентрации KCl и $MgCl_2$.

Из рис. 6 видно, что NEIL1 использует процессивный поиск – значение P_{cc} достигает 0,48 в отсутствии ионов, и понижается с увеличением ионной силы. NEIL2 практически не использует при поиске мишеней процессивные механизмы, его значения P_{cc} были низкими на всем диапазоне концентраций ионов. Процессивность Nei была не очень высокой, величина P_{cc} при оптимальных условиях составляла около 0,28 и незначительно снижалась при увеличении ионной силы, а при концентрации $MgCl_2$ 20 мМ заметно повышалась, что может

свидетельствовать о вкладе неэлектростатических взаимодействий между ДНК и белком в связывание Nei. В целом процессивность Nei, NEIL1 и NEIL2 заметно ниже, чем процессивность ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli*, относящейся к тому же структурному суперсемейству, для которой значения P_{cc} в оптимальных условиях достигают 0,9 (Sidorenko et al., 2008, *Biochemistry*).

Ранее нами была проведена аналогичная серия экспериментов с АП-сайтом в качестве повреждения. Из-за нестабильности АП-сайта ошибка определения расщепления ДНК была достаточно высокой, однако на рис. 7 можно заметить, что зависимость P_{cc} от ионной силы в целом снижается, однако есть некоторый оптимум при низких концентрациях ионов (25–50 мМ KCl и 5 мМ MgCl₂).

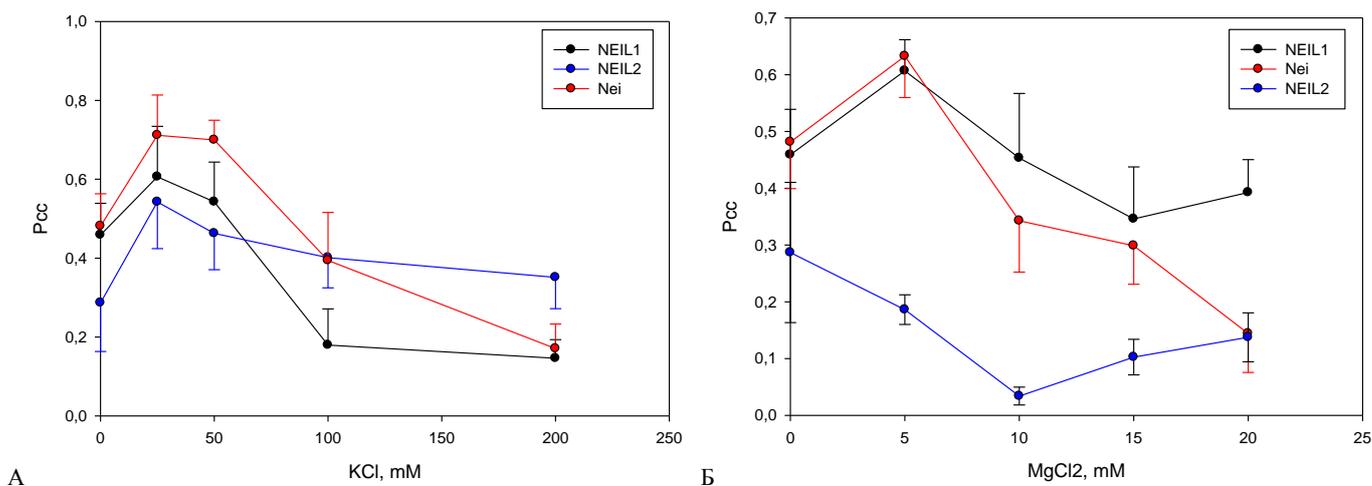


Рис. 7. Влияние ионов K⁺ (А) и Mg²⁺ (Б) на вероятность коррелированного расщепления двуцепочечного субстрата с двумя АП-сайтами ферментами Nei *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши. Зависимость P_{cc} от концентрации KCl и MgCl₂.

Вполне вероятно, что такой профиль указывает на некоторые особенности взаимодействия фермента с ДНК, в частности, что связывание происходит не только за счет электростатических взаимодействий, но также за счет гидрофобных или ван-дер-ваальсовых. В качестве таких взаимодействий может выступать интеркаляция гидрофобных остатков белка в спираль ДНК, которая наблюдается в комплексах Nei и NEIL1 с поврежденной ДНК (рис. 8). Хотя структуры Nei и NEIL1 в комплексе с неповрежденной ДНК не охарактеризованы, известно, что для ДНК-гликозилазы Fpg из того же суперсемейства часть гидрофобных остатков интеркалирует и в неповрежденную ДНК.

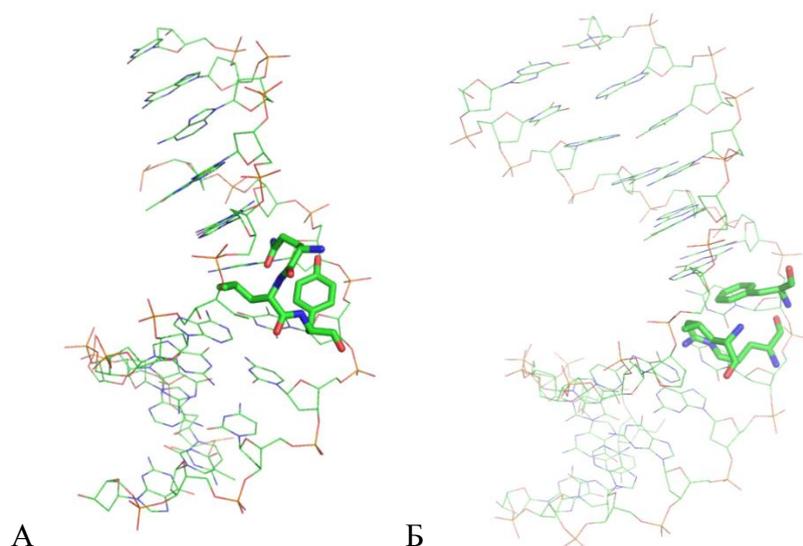


Рис. 8 А — интеркаляция остатков Gln69, Leu70 и Tyr71 фермента Nei *E. coli* в полость, образуемую при выворачивании поврежденного нуклеотида в активный центр фермента (номер структуры в базе данных Protein Data Bank 1K3W). Б — интеркаляция остатков Leu84, Arg114 и Phe116 фермента NEIL1 мимивируса в полость, образуемую при выворачивании поврежденного нуклеотида в активный центр фермента (номер структуры в базе данных Protein Data Bank 3A46).

Чтобы прояснить относительный вклад электростатических взаимодействий фермента с неповрежденными участками ДНК был проведен анализ консервативности остатков в ДНК-связывающей бороздке белков Nei из всех прокариотических организмов, у которых присутствует этот белок.

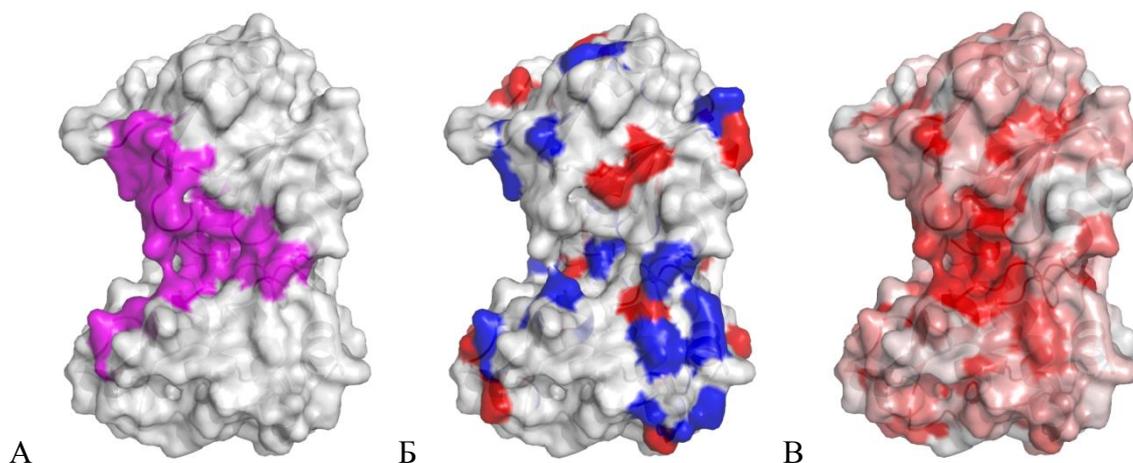


Рис. 9 А — ДНК-связывающая бороздка фермента Nei (выделена малиновым цветом). Б — распределение положительно заряженных (синий цвет) и отрицательно заряженных (красный цвет) остатков в молекуле Nei. В — консервативность аминокислотных остатков в белке Nei (более яркий цвет обозначает более консервативные позиции).

Из рис. 9 видно, что ДНК-связывающая бороздка белка высококонсервативна, однако в целом содержит небольшое количество заряженных аминокислот. Среди них можно выделить абсолютно консервативные положительно заряженные остатки Lys52 и Arg252, образующие непосредственно контакты с ДНК. В основном положительно заряженные остатки сосредоточены в активном центре фермента и принимают участие в катализе. Таким образом, предположение о дополнительном вкладе неэлектростатических взаимодействий в движение Nei по ДНК подтверждается и строением его ДНК-связывающей бороздки.

Следовательно, хотя все три фермента гомологичны и имеют большую схожесть в доменной организации и похожую субстратную специфичность, они показывают различия в механизмах поиска своих мишеней в ДНК. NEIL1 активно использует при поиске мишеней процессивный механизм, тогда как NEIL2 практически не осуществляет коррелированный поиск, что свидетельствует о различии в их функциях в клетке.

2. Процессивность UNG вируса осповакцины как мишень для противовирусной терапии

Плазмида pBSKM со вставкой гена *D4R* (ген белка UNG вируса осповакцины) была предоставлена д.б.н. Щелкуновым С. Н. (ГНЦ ВБ «Вектор»). Ген был клонирован в плазмиду для экспрессии pET15b, плазмиду индуцировали в клетках *E. coli* штамма BL21DE3 добавлением 1 мМ IPTG и инкубировали при 37°C в течение 5 ч. Белок, несущий гексагистидиновый пептид, очищали афинной хроматографией на сорбенте Ni-NTA с последующей доочисткой на гепарин-сефарозе. Электрофоретически гомогенные фракции использовали для изучения процессивности фермента.

Для изучения коррелированного расщепления UNG вируса осповакцины был приготовлен двуцепочечный ОДН-субстрат с двумя основаниями урацила и радиоактивной меткой между ними и основанием G напротив повреждений. Реакционные смеси содержали 50 нМ субстрат, реакционный буфер (25 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол), КСl или MgCl₂ в диапазоне 0–200 мМ и 0–25 мМ соответственно, фермент UNG в итоговой концентрации 0,12 нМ.

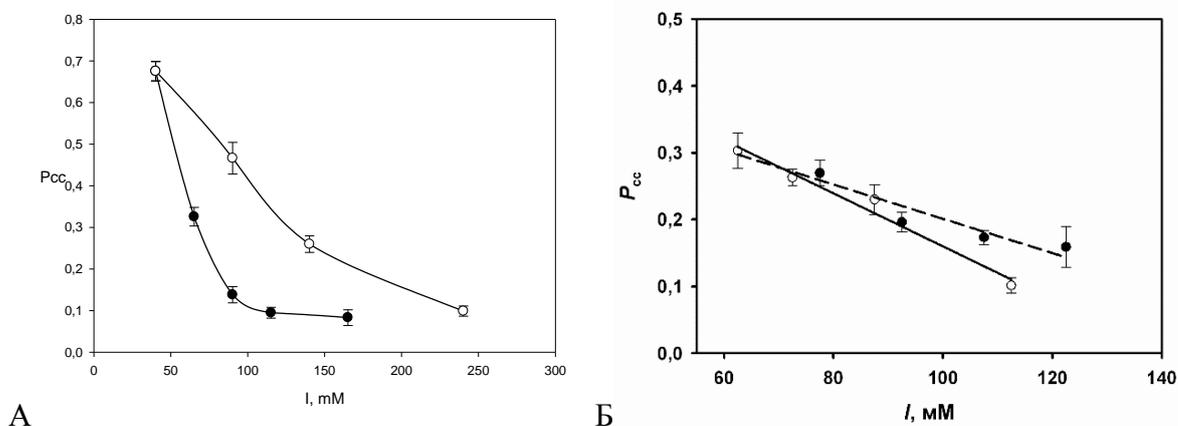


Рис. 10. Влияние ионов Mg²⁺ (●) и K⁺ (○) на вероятность коррелированного расщепления двуцепочечного субстрата с двумя сайтами урацила фермента UNG вируса осповакцины (А) и Ung *E. coli* (Б, (Mechetin G. et al., 2011, *Biochem Biophys Res Commun.*)). Приведена зависимость P_{cc} от ионной силы раствора.

Значения P_{cc} вирусной UNG более чем в два раза превышали P_{cc} для Ung *E. coli* и достигали значений 0,68 при оптимальной ионной силе, тогда как значения для бактериального фермента не превышали 0,31. Из рис. 10 также видно, что ионы Mg²⁺ влияли на процессивность заметно сильнее, что не так очевидно в случае бактериального фермента.

Наличие между повреждениями одноцепочечного разрыва и брешей длиной до 6 нуклеотидов не оказывало заметного влияния на эффективность коррелированного поиска (рис. 11)

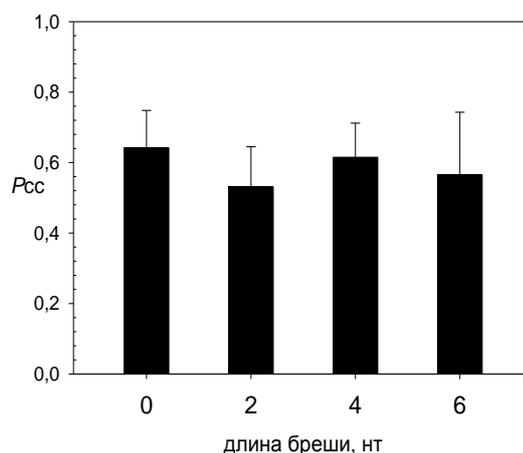


Рис. 11. Влияние одноцепочечного разрыва и брешы различной длины на коррелированное расщепление UNG вируса осповакцины.

Была изучена зависимость коррелированного поиска от расстояния между повреждениями. Так как между процессами диффузии вдоль ДНК и узнавания повреждения происходит конкуренция, в некоторых случаях фермент может не успеть распознать повреждение за время его нахождения в активном центре, и тогда удаления повреждения не произойдет. Поэтому величину P_{cc} можно представить как произведение вероятности достижения второго сайта посредством коррелированного механизма после первого каталитического акта (транслокационная компонента, P_T) и вероятности расщепления второго сайта (кинетическая компонента, P_E). На рис. 12 представлен график зависимости значений транслокационной компоненты P_T от расстояния. В работе (Porecha R.H. et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci.) была определена величина P_E для Ung *E. coli* методом остановленной струи с использованием двуцепочечного ОДН субстрата, содержащего урацил. Это значение кинетической компоненты использовалось нами для грубой оценки параметров одномерной диффузии вирусного фермента и сравнения их с параметрами, уже известными для бактериального гомолога.

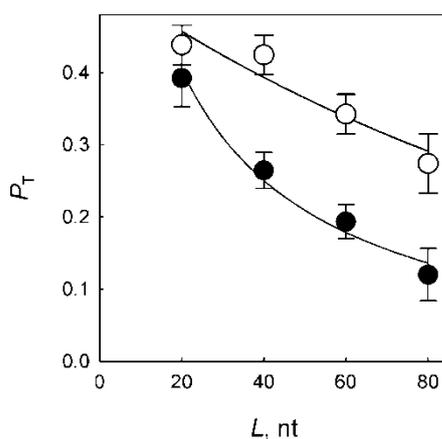


Рис. 12. График зависимости значений транслокационной компоненты $P_T = P_{cc}/P_E$ для реакции коррелированного расщепления ДНК-субстрата ферментом *Eco-Ung* (●) и UNG вируса осповакцины (○) от расстояния между основаниями урацила.

Из рис. 12 видно, что расстояние, на которое UNG вируса осповакцины способен вести процессивный поиск, заметно больше, чем *Eco-Ung*, что подтверждает его вклад в работу

фактора процессивности вирусной полимеразы за счет собственной способности к эффективной одномерной диффузии вдоль ДНК.

Несмотря на успешную борьбу с распространением вируса натуральной оспы в 1980-х годах посредством вакцинирования, эффективных терапевтических агентов против ортопоксвирусов до сих пор не разработано. Белки репликации традиционно являются эффективными мишенями для противовирусной и антибактериальной терапии. Таким образом, фермент UNG поксвирусов представляется перспективной мишенью подавления вирусной репликации.

В распоряжении лаборатории имеется библиотека из 23 соединений, которые потенциально способны ингибировать ферменты семейства урацил-ДНК-гликозилаз по данным молекулярного докинга. Было изучено влияние этих веществ на активность UNG вируса осповакцины на одноцепочечном ОДН длиной 20, содержащем урацил. Реакционные смеси содержали 50 нМ радиоактивно меченный субстрат, буфер (25 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол), фермент UNG в конечной концентрации 0,012 нМ и ингибитор в концентрации 10 мкМ, 100 мкМ или 1 мМ. Реакцию вели в течение 10 мин при температуре 37°C и останавливали добавлением 1мкл 1М NaOH, прогреванием 2 мин при 95°C, затем добавляли эквимольное количество HCl и 5 мкл буфера для нанесения FDLB и прогревали 5 мин 95°C.

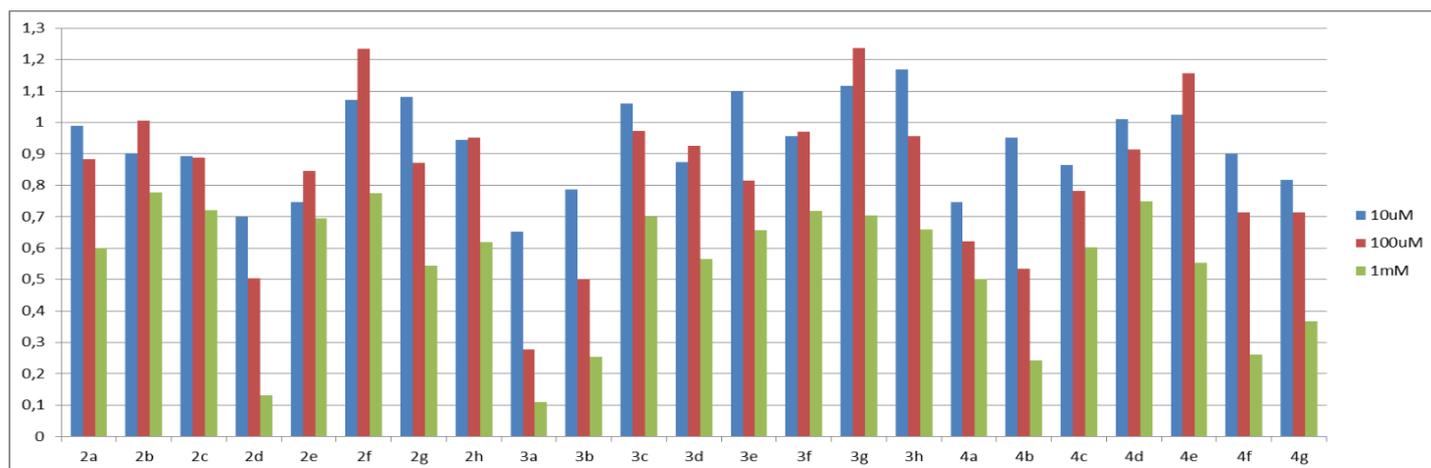


Рис. 13. Ингибирование каталитической активности фермента UNG вируса осповакцины различными соединениями из библиотеки потенциальных ингибиторов урацил-ДНК-гликозилаз, нормированное на активность фермента без ингибиторов. Концентрация ингибиторов – 10, 100 мкМ и 1 мМ.

Среди потенциальных ингибиторов нашлось несколько соединений, которые заметно снижали активность вирусной UNG (рис. 13). Были выбраны наиболее эффективные из них – 2D и 3A, содержащие барбитуратную группу, а также 2F в качестве отрицательного контроля, и исследована их способность ингибировать процессивность фермента. На рис. 14Б представлены значения P_{cc} , рассчитанные по трем независимым экспериментам.

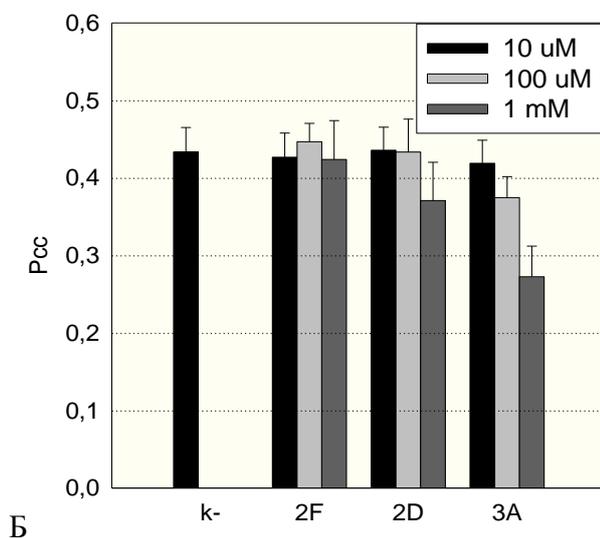
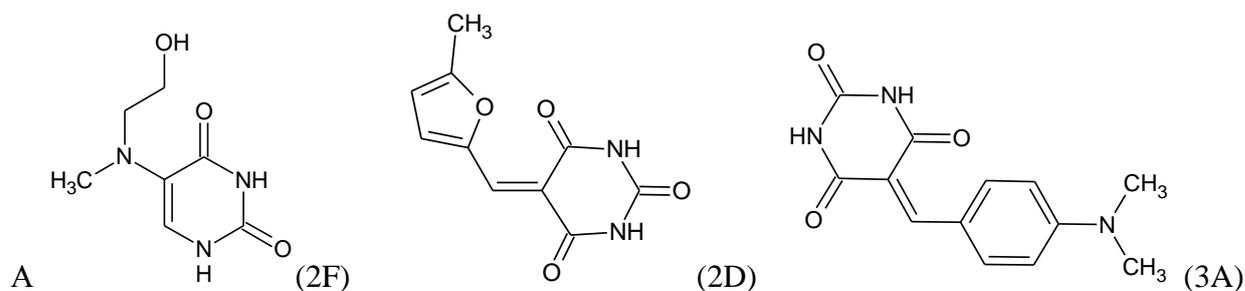


Рис. 14. Химическая структура ингибиторов (А), влияние ингибиторов на P_{cc} UNG вируса осповакцины в концентрациях 10, 100 мкМ и 1 мМ (Б).

Как видно на рис. 14Б, ингибитор 3А снижает процессивность вирусной UNG, однако механизм взаимодействия с этим соединением неизвестен. В рамках стажировки в Еврейском университете (г. Иерусалим, Израиль) были предприняты попытки получения кристаллических структур комплексов вирусной UNG с ингибиторами 3А и 3В (который также снижал активность фермента), синтезированными в ИГУ (к.х.н. Мостович Е.А.). Указанные соединения не растворяются ни в воде, ни в буферных растворах различных рН, ни в 100 %-ном DMSO до концентраций, требуемых обычно для сокристаллизации с белком. Тем не менее, мы попытались подобрать условия кристаллизации исходя из опубликованных данных успешно закристаллизованных структур D4 без лигандов (*Schormann et al., 2007, BMC Structural Biology*) и UNG человека с уридином (*Mol et al., 2000, Nature*). На момент окончания стажировки удалось получить только недифрагирующие кристаллы (т.н. «метлы») без лигандов (рис. 15).



Рис. 15. Фотография в световой микроскоп капли, содержащей кристаллы белка UNG вируса осповакцины в форме «метел».

Также коллегами из сектора ортопоксвирусов ГНЦ ВБ «Вектор» были проведены пилотные эксперименты по изучению подавления репликации вируса осповакцины *in vivo* соединений 2В, 3А и 3В. Все три соединения показали противовирусную активность, однако для оценки перспективности этих соединений в качестве потенциальных противовирусных агентов еще предстоит их дальнейшее изучение.

3. Процессивность Ung *E. coli* в присутствии объемных ковалентных аддуктов и нековалентных лигандов малой и большой бороздки

Ранее было показано, что Ung *E. coli* для поиска редких звеньев урацила в ДНК, которые образуются при дезаменировании цитозина, в значительной мере использует процессивные механизмы. Однако присутствие в клетке молекул, конкурирующих за связывание с ДНК может существенно влиять на осуществление коррелированного поиска. При узнавании урацила фермент связывается с неспецифичным участком ДНК в малой бороздке и изгибает ее под углом в 45°. В таком положении происходит выворачивание пиримидинового основания из гетеродуплекса в активный центр Ung, где урацил узнается и затем подвергается гидролизу по N-гликозидной связи. Ung также с высокой эффективностью вырезает урацил из одноцепочечной ДНК, однако структуры такого комплекса нет и механизм узнавания неизвестен. Представляет интерес вопрос, как блокировка большой и малой бороздки ковалентным аддуктом или нековалентным лигандом влияет на процессивность Ung.

В качестве ковалентного аддукта использовался аналог тимина, к которому через аминоксильный линкер присоединена молекула флюоресцеина (далее – Т-FAM) (рис. 16Б(Г)). Аддукт располагается в большой бороздке ДНК и имеет достаточно крупный размер, что может помешать изгибанию ДНК.

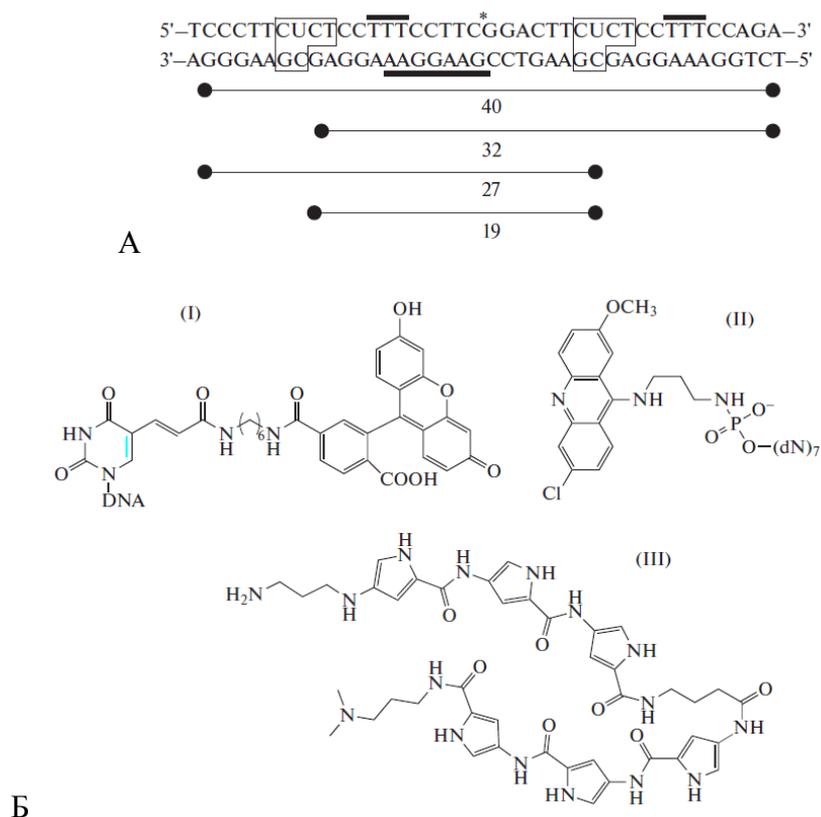


Рис. 16. Структуры субстратов, заместителей и лигандов, использованных в работе. (А) – общая структура ДНК-субстрата для изучения процессивности Ung. Рамкой обведены звенья ДНК, образующие связи с молекулой фермента по данным рентгеноструктурного анализа. Предполагаемые места связывания малобороздочного лиганда и триплексобразующего олигодезоксинуклеотида указаны линиями сверху и снизу от последовательности соответственно. Звездочкой отмечено положение межнуклеозидного ³²Р-фосфата. Показаны длины радиоактивно меченных продуктов, образующихся при одиночном и двойном расщеплении молекулы субстрата. (Б) – структура Т-ФАМ (I), триплексобразующего ОДН (II) и малобороздочного лиганда (III).

Для изучения P_{cc} использовали одноцепочечный или двуцепочечный ОДН субстраты длиной 40 нт с Т-ФАМ между повреждениями, и, для сравнения, субстрат с аналогичной последовательностью, содержащий в середине ³²Р. В случае одноцепочечного субстрата существенной разницы на кривой зависимости P_{cc} от ионной силы не наблюдалось, в то время как для двуцепочечного субстрата наличие объемного ковалентного аддукта значительно снижало способность Ung к коррелированному поиску (рис. 17).

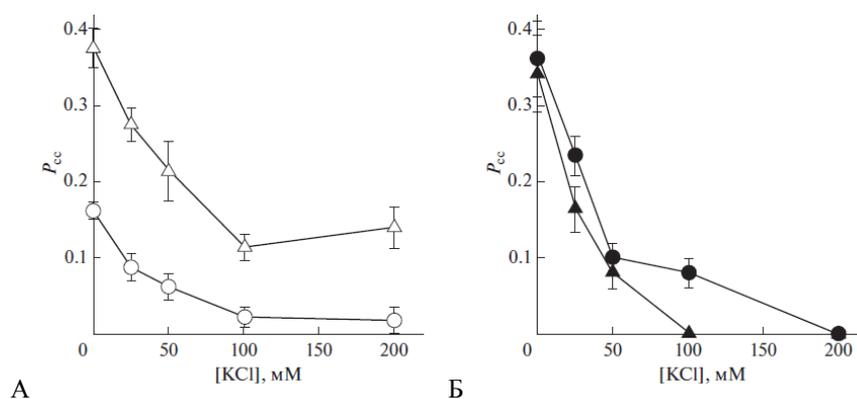


Рис. 17. Расщепление одноцепочечного и двуцепочечного ОДН-субстратов, содержащих два основания урацила и остаток Т-ФАМ между ними. Зависимость P_{cc} от концентрации KCl в среде для одноцепочечных (треугольные символы) и двуцепочечных (круглые символы) субстратов, содержащих Т-ФАМ (А) и не содержащих Т-ФАМ (Б).

Таким образом, вполне вероятно, что Т-ФАМ изменяет структуру двуцепочечной ДНК или увеличивает ее жесткость, что показано и для других аддуктов, расположенных в большой бороздке. Из приведенных данных можно также заключить, что Ung использует разные механизмы сканирования и узнавания мишени для одноцепочечной и двуцепочечной ДНК, так как Т-ФАМ никак не снижал P_{cc} на одноцепочечном субстрате, и даже напротив — при высокой ионной силе слегка повышал ее, что, возможно, свидетельствует о возникновении гидрофобных взаимодействий между ферментом и субстратом.

Для изучения влияния нековалентных лигандов в качестве лиганда большой бороздки использовался триплексообразующий олигонуклеотид, содержащий интеркалирующий остаток (6-хлор-2-метоксиакридин-9-ил)пропан-1,3-диамина (рис. 16Б(II)), в качестве лиганда малой бороздки — соединение имидазольного ряда (рис. 16Б(III)). На рис. 16А указаны места связывания лигандов с ОДН субстратом.

Так как точность связывания лигандов со специфичной последовательностью в субстрате редко достигает 100%, параллельно с определением P_{cc} определяли также подавление ими расщепления субстратов с одним повреждением. Снижение P_{cc} может быть обусловлено как стерическим затруднением при транслокации ко второму сайту, так и снижением эффективности каталитической реакции.

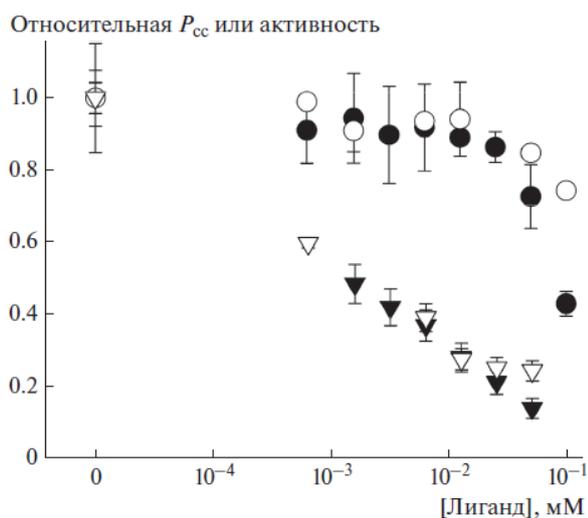


Рис. 18. Сравнительное влияние малобороздочного (треугольные символы) и триплексобразующего (круглые символы) лигандов на активность (черные символы) и вероятность коррелированного расщепления (белые символы) субстрата ферментом Ung. По оси ординат отложены значения P_{cc} и скорости накопления продукта расщепления субстрата, содержащего одно повреждение, нормированные на максимум соответствующей величины при отсутствии лиганда.

На рис. 18 можно наблюдать отсутствие снижения как коррелированного поиска, так и активности Ung в присутствии триплексобразующего лиганда большой бороздки при низких концентрациях, однако при концентрации, приближающейся к 100 мкМ, активность фермента подавляется сильнее, чем P_{cc} , что может быть связано с конкурентным ингибированием Ung триплексобразующим одноцепочечным ОДН. Малобороздочный лиганд вносит значительный вклад в снижение и активности, и P_{cc} уже при 1 мкМ концентрации, что согласуется со значением средства имидазольных лигандов к ДНК в литературе. Похожий профиль снижения обоих значений свидетельствует о том, что транслокация через малобороздочный лиганд не затруднена, однако близость места связывания лиганда к мишени, возможно, мешает связыванию фермента с ДНК или вызывает ее конформационные изменения, приводящие к снижению скорости реакции.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что Ung при сканировании ДНК в значительной степени использует механизм хоппинга, который позволяет преодолевать препятствия в виде различных ДНК-связывающих молекул в клетке. Однако, ковалентно связанные объемные аддукты сильно снижают эффективность транслокации по двуцепочечной ДНК, что говорит о важности конформационных искажений, которые претерпевает ДНК в процессе поиска мишеней эти ферментом.

4. Выводы

1. Ферменты *Nei E. coli* и NEIL1 и NEIL2 мыши показывают значительные различия в механизмах поиска своих мишеней в ДНК. NEIL1 активно использует при поиске мишеней процессивный механизм, тогда как NEIL2 практически не осуществляет коррелированный поиск. Процессивность фермента *Nei* также невысока.

2. Фермент UNG вируса осповакцины эффективно осуществляет процессивный поиск мишеней в ДНК, значительно превышающий по своим значениям P_{cc} поиск ферментом *Ung E. coli*.

3. Найдены соединения, обладающие потенциалом использования для противовирусной терапии за счет ингибирования фактора процессивности репликативного комплекса вируса осповакцины.

4. Эффективность транслокации *Ung E. coli* вдоль двуцепочечной ДНК значительно снижает наличие ковалентного аддукта, который увеличивает жесткость ДНК и препятствует ее изгибанию. Однако фермент способен преодолевать нековалентно связанные лиганды как в малой, так и в большой бороздке ДНК, используя механизм хоппинга.

5. Публикации по теме диссертации

1. Мечетин Г. В., Дятлова Е. А., Синяков А. Н., Рябинин В. А., Воробьев П. Е., Жарков Д. О. Коррелированный поиск мишеней урацил-ДНК-гликозилазой в присутствии объемных аддуктов и ДНК-связывающих лигандов// Биоорганическая химия, 2017, Т.43 №1, с. 29-34

Из списка ВАК:

2. Мечетин Г.В., Лаптева Е.А., Торгашева Н.А., Жарков Д.О. Ферменты репарации как фармакологические мишени// Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2015. Т.13, вып. 1, с. 86-98.

Тезисы:

1. Дятлова Е.А., "Механизм поиска субстратных оснований ДНК-гликозилазами семейства Fpg/Nei", стр.122, Биология, Материалы 54-й международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс" (МНСК 2016), Новосибирск, Россия. 16-20.04.2016

2. Дятлова Е.А., Мечетин Г.В., Жарков Д.О., "Процессивность ферментов эксцизионной репарации оснований", международная конференция «Химическая биология» посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнорре (24-28.08.2016), Новосибирск, Россия. (стендовый), стр. 201.

3. E. Dyatlova, G. Mechetin, D. Zharkov «Target search by base excision repair DNA glycosylases» The FEBS Journal 283(Suppl. 1) (2016) P. 156

4. E. Diatlova, D. Zharkov «Target search processivity of uracil-DNA glycosylase from vaccinia virus» The 6th US-EU Conference on Repair of Endogenous DNA Damage, Udine, Italy (poster) 2017

5. E. Diatlova, S. Schelkunov, D. Zharkov "Ability of uracil–DNA glycosylase to move along DNA as a target therapy against poxviruses" FEBS, Prague, Czech Republic (poster) 2018

6. E. Dyatlova, D. Zharkov "Processivity of DNA repair enzymes" BGRS, Novosibirsk, Russia (oral presentation) 2018 SbPCD p.15

7. E. Diatlova, D. Zharkov "Translocation of DNA repair proteins along DNA and its application in antiviral therapy", 47th Meeting of the EEMGS, 2019, p.65-66

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Новопашина Дарья Сергеевна danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712
Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)
 Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

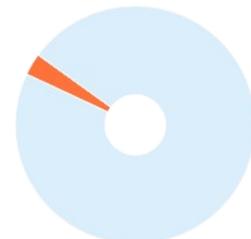
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 6
 Начало загрузки: 06.09.2019 05:48:09
 Длительность загрузки: 00:00:04
 Имя исходного файла:
 Научный доклад Дятлова
 Размер текста: 1012 кБ
 Символов в тексте: 33607
 Слов в тексте: 4336
 Число предложений: 334

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 06.09.2019 05:48:14
 Длительность проверки: 00:00:01
 Комментарии: не указано
 Модули поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
2,91%	0%	97,09%



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	1,18%	4 МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ ПОСВЯЩЕННАЯ 90-...	http://lib.knigi-x.ru	07 Ноя 2017	Модуль поиска Интернет
[02]	0,58%	Лаборатория биомедицинской химии [Институт химической биологии и фундамен.	http://niboch.nsc.ru	20 Июн 2019	Модуль поиска Интернет
[03]	0,77%	Взаимодействие многофункциональных белков человека – Ки-антигена и глицера...	http://niboch.nsc.ru	02 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[04]	0,2%	Особенности взаимодействия гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем..	http://earthpapers.net	24 Апр 2016	Модуль поиска Интернет
[05]	0%	https://esu.citis.ru/dissertation/TB8VRV2LMKSMM3NXFDB0EJP4	https://esu.citis.ru	10 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[06]	0,18%	Description – UNM Comprehensive Cancer Center	http://cancer.unm.edu	24 Фев 2018	Модуль поиска Интернет

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Дятлова Евгения Алексеевна

«Поиск мишеней в канонических и неканонических структурах ДНК
ферментами, модифицирующими ДНК»

Оригинальность работы составляет ___97.09___ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина