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

На правах рукописи

Лукьянчикова Наталья Вильевна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД об основных результатах выполненной научно-квалификационной работы

Репарация объемных повреждений в клетках млекопитающих. Анализ репаративного синтеза *in vitro* с применением модельных ДНК

Направление подготовки

Направленность

06.06.01 Биологические науки

03.01.04 Биохимия

Новосибирск – 2019

Общая характеристика работы

Актуальность исследования. Эксцизионная репарация нуклеотидов, NER (nucleotide excision repair), является основным механизмом удаления объемных повреждений, искажающих структуру ДНК спирали. Повреждения, процессируемые NER, возникают в результате широкого набора воздействий: ультрафиолетового излучения, химиотерапевтических агентов, а также канцерогенов окружающей среды.

Эффективность удаления повреждений системой NER может существенно различаться в зависимости от особенностей их структуры, а также от локальной структуры и последовательности ДНК вокруг повреждения. Например, помещение одних поврежденных азотистых оснований в «мистматч», может стимулировать процесс NER, а других повреждений – ингибировать. Появление делеции напротив повреждения во многих случаях приводит к полному или значительному ингибированию NER.

Представляет особенный интерес, как происходит процесс удаления объемной модификации ДНК при появлении вблизи нее другого повреждения. Два или более повреждений, расположенные в пределах 1–2 витков спирали ДНК, называют кластерными. Такие структуры могут возникать в ДНК при интенсивном комбинированном воздействии повреждающих факторов: например, ионизирующего излучения и химиопрепаратов, а также при нарушении процессов репарации ДНК. Кластерные повреждения часто устойчивы к действию репаративных машин и могут вызывать биологически опасные последствия для клетки, особенно если расположены в обеих цепях ДНК.

Эффективная работа систем репарации ДНК, удаляющих повреждения ДНК, вносит существенный вклад в поддержание стабильности генома. У человека дефекты в работе систем репарации ассоциированы с рядом генетически обусловленных заболеваний [Schärer O., 2003; Friedberg E. et al., 2006; Hoeijmakers J., 2009]. Кроме того, накопление повреждений ДНК и, как следствие, появление мутаций, увеличивает риск развития рака и связано со старением [Hoeijmakers J., 2009; Friedberg E. et al., 2006].

Система NER в клетках высших эукариот играет важную роль в поддержании стабильности генома и обеспечении низких темпов канцерогенеза. Для создания новых методов профилактики и лечения онкологических заболеваний важно понимание молекулярных механизмов, определяющих эффективность удаления повреждения системой NER.

Целью данной работы являлось исследование свойств ДНК, содержащих повреждения в составе кластеров, как субстратов для системы NER и выявление закономерностей между типом и расположением повреждений в кластере и эффективностью их распознавания и удаления.

В ходе работы планировалось решить следующие задачи:

- 1. Проанализировать свойства нового нуклеотидного аналога повреждения, dC^{FAB*}
- Сконструировать аналоги субстратов, имитирующие ДНК с кластерными повреждениями различных типов;
- Проанализировать влияние присутствия повреждений на геометрию и термостабильность полученных ДНК-дуплексов;
- 4. Определить сродство комплекса XPC-HR23B к модельным ДНК;
- 5. Сравнить эффективности удаления объемных повреждений из полученных ДНК белками системы NER, присутствующими в клеточных экстрактах;

*структуры и названия всех использованных в работе повреждений приведены на рис.1.

Научная новизна и практическая значимость работы. Сегодня репарация ДНК – одна из актуальнейших тем фундаментальных исследований, в том числе, ввиду взаимосвязи с эффективностью противоопухолевой терапии. При интенсивном воздействии различных повреждающих агентов в процессе проведения комплексной терапии онкозаболеваний вероятность появления в ДНК повреждений различного типа, в том числе и кластерных, повышается. Для разработки новых методов профилактики и лечения онкологических заболеваний необходимо глубокое понимание механизмов репарации ДНК в клетках, а также взаимосвязи между структурой повреждения и скоростью его удаления из ДНК.

Пониманию этой взаимосвязи способствует исследование репарации ряда модельных ДНК с различной архитектурой, в том числе, и ДНК, содержащих объемные повреждения в кластерах с различным составом и с взаимным расположением повреждений.

В ходе данной работы проведено сравнительное изучение свойств модельных ДНК, содержащих нуклеотидные аналоги повреждений dC^{FAB} , dU^{FAP} и dC^{FABG} и ДНК, содержащих ненуклеозидные синтетические объемные повреждения nAnt и nFlu, которые обладают выраженными субстратными свойствами в реакции специфической эксцизии, катализируемой системой NER. С учетом полученных данных сконструирован набор модельных ДНК, содержащих кластеры, состоящие из двух объемных повреждений либо включающие объемное повреждение и DEG, аналог AP-сайта (апурин-апиримидинового), субстрата системы BER (base excision repair).

Показано, что ДНК, содержащие близко расположенные объемные повреждения в обеих комплементарных цепях, представляют собой трудно репарируемые или нерепарируемые структуры. При увеличении расстояния между объемными повреждениями ДНК в

составе кластера эффективность процесса NER варьирует в зависимости от их структуры и взаимного расположения. При этом для ряда проанализированных модельных ДНК, содержащих кластерные повреждения, уровень сродства фактора ХРС к ДНК обратно коррелировал с их субстратными свойствами в реакции NER-катализируемой эксцизии.

Выявлены характерные для разных типов повреждений интервалы позиций противоположной цепи, расположение в которых дополнительных повреждений подавляет NER-катализируемую эксцизию объемного повреждения, эффективно удаляемого в качестве одиночного.

Полученные экспериментальные данные хорошо соотносятся с результатами моделирования структур поврежденных ДНК с использованием метода молекулярной динамики и вносят вклад в понимание механизмов репарации кластерных повреждений разной топологии в клетках млекопитающих.

Методология и методы исследования. В качестве модельных систем, содержащих белки NER и способных к проведению специфической эксцизии, были использованы препараты экстрактов приготовленные из клеток яичника китайского хомячка *Cricetulus griseus* CHO (Chinese Hamster Ovary) и из печени домашнего кролика *Oryctolagus cuniculus* (ядерные, цитоплазматические и цельноклеточные экстракты, а также лизаты).

При синтезе цепи с высокой удельной радиоактивностью [γ-³²P]-метку (3000 Ки/ммоль) вводили в ОДН (олигодезоксинуклеотид), являющийся 5'-компонентой лигазной реакции, с помощью Т4 ПНК (полинуклеотид киназы). [Petruseva I. et al., 2009]. Протяженные модифицированные цепи ДНК получали путем ферментативного лигирования соответствующих ОДН. Модифицированные звенья включали в ОДН при помощи ДНК-полимеразы β [Evdokimov A. et al., 2011, 2013].

Угол изгиба ДНК, индуцированный объемным повреждением, определяли, сравнивая подвижности модифицированного и немодифицированного дуплексов при разделении электрофорезом в неденатурирующих условиях. Температуры плавления модифицированных ДНК-дуплексов были определены методом дифференциального плавления. Эффективность связывания XPC-HR34B с модельными ДНК была оценена методами задержки в геле и флуоресцентного титрования. Для оценки субстратных свойств модельных ДНК был использован метод постэксцизионного мечения специфических продуктов реакции. Компьютерное моделирование молекулярной динамики структур ДНК было проведено с использованием программного комплекса Amber.

Количественные данные, приведенные в работе, получены по результатам не менее трех экспериментов. Для полученных значений было определено стандартное отклонение.

Личное участие автора. Эксперименты по определению угла изгиба дуплекса, индуцированного повреждением, по определению констант диссоциации комплексов ХРС-HR23B с ДНК и оценке субстратных свойств протяженных ДНК были выполнены автором работы самостоятельно. Также автором были получены NER-компетентные экстракты из клеток и синтезированы ДНК-субстраты, использованные в экспериментах.

Публикации и апробация работы. Полученные данные вошли в материалы 4 научных статей, рецензируемых в изданиях рекомендованного перечня ВАК.

По результатам работы было опубликовано две научных статьи. Кроме того, ряд полученных результатов опубликован в еще двух научных статьях, одна из них зарубежная. Результаты работы были представлены на Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2015, 2016), VIII Всероссийском с международным участием молодых ученых биологов «Симбиоз – Россия» конгрессе (Новосибирск, Россия, 2015), Международной конференции, посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре (Новосибирск, Россия, 2016), V съезде биохимиков России (Сочи–Дагомыс, Россия, 2016), Международной конференции 41nd FEBS Congress (онлайн форма проведения, 2016), Международной конференции 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017), Международной конференции 42nd FEBS Congress (Иерусалим, Израиль, 2017), Конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio (Кольцово, Россия, 2017), Международной Конференции ЕЕMGS Annual Meeting (Потсдам, Германия, 2018), Всероссийская Конференция с Международным участием «Биотехнология-медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2019).

Благодарности. Автор благодарит И.О. Петрусеву за помощь в планировании и организации работы и анализе результатов исследований, В.Н. Сильникова за дизайн нового фотоактивного аналога объемных повреждений, А.А. Ломзова за выполнение экспериментов по дифференциальному плавлению и компьютерному моделированию структур ДНК.

Содержание работы

В настоящей работе был проведен систематический анализ свойств ряда ДНК, содержащих в составе кластеров звенья с объемными модификациями и аналог АРсайта с различным взаимным расположением повреждений. Оценено влияние присутствия повреждений на геометрию и термостабильность ДНК-дуплексов, субстратные свойства модифицированных ДНК в процессе NER и сродство к ним комплекса ХРС-HR23B.

Раздел 1. Получение модельных ДНК.

1.1. Использованные модельные повреждения ДНК.

В рамках данной работы мы использовали в качестве модельных объемных повреждений ненуклеозидные вставки с объемным флуоресцеиновым или антраценовым заместителем nAnt и nFlu и звенья с модифицированными нуклеозидами dC^{FAB} , dC^{FAP} , dU^{FAP} и dC^{FABG} . Ранее было показано, что nAnt и nFlu в составе ДНК-дуплекса обладают ярко выраженными субстратными свойствами [Evdokimov. A, et al., 2013].



Рис. 1. Структуры модельных повреждений, использованных в работе.

dC^{FAB} – 5-[3-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензамидо)пропоксипроп-1-инил]-2'-дезоксицитидин, nAnt – (N-[6-(9-антраценкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол);

dC^{FABG} – экзо-N-[(4-азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонил)-бутилкарбамоил]-2'-дезоксицитидин;

nFlu – (N-[6-(дипивалоил-5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-О1-(4,4'-диметокситритил)-О2-[(диизопропиламино)(2-цианоэтокси)фосфино]-3-амино-1,2-пропандиол);

dU^{FAP} – 5-{N-[N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиридин-6-ил)-3-аминопропионил]-транс-3-аминопропенил-1}-2'-дезоксиуридин;

DEG – диэтиленгликоль.

Вставка на основе DEG (диэтиленгликоль) была использована как аналог AP-сайта, более устойчивый к специфической деградации APE1 [Kutuzov M. Et al., 2011], чтобы снизить уровень деградации ДНК эндогенным ферментом экстрактов, расщепляющим AP-сайты. Структуры и названия модельных повреждений приведены на рис. 1.

1.2. Получение модельных субстратов.

Модельные ДНК, использованные в работе, создавались с использованием набора модифицированных цепей длиной 16, 54 и 137 нт, содержащих повреждения в заданных позициях. В качестве базовой последовательности ДНК был использован 137-звенный фрагмент плазмиды pBR322 (позиции 56–193 верхней цепи) [Evdokimov A. et al., 2013].

Обозначение цепи ДНК	цепи ДНК Последовательность цепи (54 нт)		
Цепь 1			
dC, нм (немодифицированная) цепь	5'-aagcctatgcctacagcatccagggcgacggtgccgaggatgacgatgagcgca		
dC ^{FAB}	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg_dC ^{FAB} _gacggtgccgaggatgacgatgagcgca		
nFlu	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg_F_gacggtgccgaggatgacgatgagcgca		
nAnt	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg_A_gacggtgccgaggatgacgatgagcgca		
dU ^{FAP}	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg_dU ^{FAP} _gacggtgccgaggatgacgatgagcgca		
dC ^{FABG}	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg_dC ^{FABG} _gacggtgccgaggatgacgatgagcgca		
DEG	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg_D_gacggtgccgaggatgacgatgagcgca		
DEG(5)nFlu	5'-aagcctatgcctacagcat_D_caggg_F_gacggtgccgaggatgacgatgagcgca		
nFlu(5)DEG	5'-aagcctatgcctacagcatccaggg_F_gacgg_D_gccgaggatgacgatgagcgca		
Цепь 2			
dG, нм (немодифицированная) цепь	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgccctggatgctgtaggcataggctt		
nFlu ₋₂₀	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgccctggatgctgtaggcat_F_ggctt		
nFlu ₋₁₀	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgccctggatg_F_tgtaggcataggctt		
nFlu_3	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcc_F_tggatgctgtaggcataggctt		
nFlu ₀	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtc_F_ccctggatgctgtaggcataggctt		
nFlu ₊₄	5'- tgcgctcatcgtcatcctcggcac_F_gtcgccctggatgctgtaggcataggctt		
nFlu ₊₈	5'-tgcgctcatcgtcatcctcg_F_caccgtcgccctggatgctgtaggcataggctt		
DEG ₋₂₀	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgccctggatgctgtaggcat_D_ggctt		
DEG ₋₁₀	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgccctggatg_D_tgtaggcataggctt		
DEG ₋₆	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgccctg_D_atgctgtaggcataggctt		
DEG ₋₃	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtcgcc_D_tggatgctgtaggcataggctt		
DEG ₀	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggcaccgtc_D_ccctggatgctgtaggcataggctt		
DEG ₊₄	5'- tgcgctcatcgtcatcctcggcac_D_gtcgccctggatgctgtaggcataggctt		
DEG ₊₆	5'-tgcgctcatcgtcatcctcggc_D_ccgtcgccctggatgctgtaggcataggctt		
DEG ₊₈	5'-tgcgctcatcgtcatcctcg_D_caccgtcgccctggatgctgtaggcataggctt		

Таблица 1. 54-звенные цепи ДНК, из которых были сконструированы модельные дуплексы, и из обозначения.

Обозначения в таблице: D – вставка на основе DEG, F – вставка nFlu, A – вставка nAnt.

Модификации, которые вводились в цепь (цепь 1) модельной ДНК, располагались в 68-ой от 5'-конца позиции 137-звенной цепи. В случае, когда цепь 1 содержала тандемные

повреждения (DEG(5)Flu и Flu(5)DEG), позиция Flu была постоянна (68-ое звено от 5'конца), а вставка DEG располагалась в позиции 62 либо 69 от 5'-конца соответственно.

В цепь 2 вводились модификации в пределах участка от 73 до 66-ой позиции от ее 5'-конца. Расположение модифицированного звена в цепи 2 было обозначено следующим образом: положение «0», 73-е звено от 5' конца цепи 2, располагалось напротив повреждения цепи 1, позиции, обозначенные знаком плюс (+4, +6, +8) и знаком минус (-3, -6, -10, -20), были смещены в направлении 5' или 3'-конца этой цепи соответственно. Эти обозначения были одинаковыми для всех использованных молекул ДНК. Схема, описывающая расположение кластерных повреждений в модельных ДНК, приведена на рис. 2.



Рис. 2. Схема, описывающая расположение кластерных повреждений в модельных ДНК, использованных в работе.

Раздел 2. Угол изгиба и изменение термостабильности, индуцированные повреждениями

Появление в ДНК объемных ковалентных аддуктов часто вызывает искажения регулярной двуцепочечной структуры, такие как перегибы оси спирали и локальные



Рис. 3. Радиоавтограф геля после разделения дуплексов (16 п.н.): dC^{FAB}/dG (1), nFlu/dG (2) и дуплекса без модификаций (3) в 10%ном ПААГ в неденатурирующих условиях

участки дестабилизации ДНК вблизи повреждения. Локальные искажения в структуре ДНК приводят к общему изменению термостабильности дуплекса.

Для дуплекса dC^{FAB}/dG (16 п.н.) значение угла изгиба, оцененное с помощью измерения подвижностей дуплексов при электрофорезе в неденатурирующем геле (рис. 3), составило 168 ± 0,8°, величина изгиба дуплекса nFlu/dG (16 п.н.) была оценена равной 165 ± 1,8°.

С использованием метода дифференциального плавления было показано, что введение повреждения dC^{FAB} в ДНК (16 п.н.)

приводит к снижению температуры плавления дуплекса на 2,5°С.

Также было оценено влияние повреждений dC^{FAB} и nFlu в составе кластера на стабильность дуплексов (16 п.н.) (таблица 2). Введение вставки nFlu в dC^{FAB}- содержащий дуплекс дополнительно снижало его температуру плавления на 10,2-13,3°C в зависимости от взаимного расположения повреждений.

Название дуплекса (16 п.н.)	Температура плавления дуплекса, °C (- Δ Tm)
dC/dG	68,2 ± 0
dC^{FAB}/dG	65,7 ± 0,2 (2,5)
dC ^{FAB} /nFlu ₋₃	55,6 ± 0,2 (12,6)
$dC^{FAB}/nFlu_0$	$54,9 \pm 0,1 \ (13,3)$
$dC^{FAB}/nFlu_{+4}$	58,0 ± 0,3 (10,2)

Таблица 2. Температуры плавления дуплексов.

При совпадении всех остальных характеристик ДНК, содержащих повреждение, температура плавления может рассматриваться как показатель стабильности ДНКдуплекса и устойчивости поврежденной ДНК к репарации. Полученные значения находятся в пределах интервала значений, характерных для субстратов NER. Пониженная термостабильность, характерная для дуплексов $dC^{FAB}/nFlu_{3(0)(+4)}$, в целом соответствовала повышенному сродству белка ХРС к данным структурам (раздел 3). Следует, однако, отметить, что фактор ХРС обладал наиболее высоким сродством к более стабильному $dC^{FAB}/nFlu_{+4}$ дуплексу $dC^{FAB}/nFlu_{-3(0)}$. Кроме того, несмотря на пониженную термостабильность и повышенное сродство к фактора ХРС к данным ДНК, все три структуры были устойчивы к репарации (раздел 4).

Раздел 3. Сродство комплекса XPC-HR23B к ДНК с кластерными повреждениями.

Основная функция ХРС как фактора NER заключается в выявлении нарушений в регулярной структуре двуцепочечной спирали ДНК. Этот белок предпочтительно взаимодействует с областями ДНК, содержащими ослабленные или разрушенные водородные связи. Определение сродства ХРС к ДНК дает представление об эффективности первичного распознавания места расположения повреждения на ДНК, первой стадии многостадийного процесса NER.

Сродство XPC-HR23В к ДНК, содержащим объемные повреждения

С использованием метода задержки в геле были проанализированы эффективность образования комплексов рекомбинантного ХРС и ряда 54-звенных ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях дуплекса. При создании дуплексов использовались цепи (54 нт), содержащие объемные повреждения dC^{FAB}, nAnt и nFlu.

Таблица 3. Константы диссоциации комплексов ХРС-ДНК, полученные методом задержки в геле.

Обозначение дуп-К_D [ХРС-ДНК], нМ лекса (54 п.н.) (метод задержки в геле) dC^{FAB}/dG $30,1 \pm 1,6$ dC^{FAB}/nFlu₋₂₀ 32,7±3,4 dC^{FAB}/nFlu-10 34,6±6,2 dCFAB/nFlu_3 $26,6 \pm 0,4$ dC^{FAB}/nFlu₀ 25.0 ± 0.8 dCFAB/nFlu+4 $25,6 \pm 2,1$ dCFAB/nFlu+8 21,3±2,7 nAnt/dG 24.3±2.5 14,4±3,7 nAnt/nFlu-20 nAnt/nFlu-10 $14,0\pm 2,1$ nAnt/nFlu₀ $13,3\pm 2,0$ nAnt/nFlu+8 19,8±2,3 нмДНК 44,7±1,9

ния ХРС с ДНК приведен на рис. 4.



комплекс ДНК-ХРС (1:2) комплекс ДНК-ХРС (1:1)

При одиночном расположении эти повреждения удаляются системой NER с

близкой эффективностью (раздел 4). Повреждения dC^{FAB} или nAnt располагались в цепи 1, цепь 2 содержала вставку nFlu в положениях -20, -10, -3, 0, +4 или +8 относительно повреждения в цепи 1. Также было определено сродство ХРС к ДНК, содержащим одиночные повреждения dC^{FAB}. nAnt или nFlu, и к ДНК без модификаций. Уровни сродства XPC-HR32В к ряду модельных ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях дуплекса, приведены в таблице 3. Пример радиоавтографа геля после разделения продуктов связыва-

Рис. 4 Анализ эффективности связывания ХРС с dC^{FAB}/nFlu₊₈ (54 п. н., пар нуклеотидов). Радиоавтограф геля после разделения продуктов связывания ХРС-HR23B с dC^{FAB}/nFlu₊₈ в 5% ПААГ в неденатурирующих условиях. В качестве контроля была использована ДНК, инкубированная в отсутствие белка. В экспериментах использовали 10 нМ dC^{FAB}/nFlu₊₈, концентрацию XPC-HR23В варьировали в пределах 1-50 нМ.

Сродство ХРС ко всем ДНК, содержащим повреждения, было выше, чем к немодифицированной ДНК. Во всех проанализированных случаях появление второго объемного повреждения ДНК (вставки nFlu) в противоположной цепи приводило к увеличению сродства ХРС к данной структуре.

Взаимодействие XPC–HR23B с рядом nAnt-содержащих ДНК с кластерными повреждениями (nAnt/nFlu₂₀, nAnt/nFlu₁₀, nAnt/nFlu₀ и nAnt/nFlu₊₈) также характеризовалось более высоким сродством, чем взаимодействие с dC^{FAB} -содержащими ДНК. Степень изменения сродства при появлении в ДНК второго повреждения (nFlu) зависела от типа повреждений и их взаимного расположения. В ряду dC^{FAB} -содержащих ДНК наблюдалось повышение сродства при смещении nFlu в сторону 5'-конца цепи 2 (dC^{FAB} /nFlu₀, /nFlu₊₄, /nFlu₊₈). Сродство XPC–HR23B к модельным ДНК, содержащим dC^{FAB} , а также вставку nFlu в позициях 0 и +8 противоположной цепи, было примерно в 1,5 раза выше, чем к остальным ДНК из этой серии. При этом в ряду nAnt-ДНК сродство XPC к дуплексу, в котором вставка nFlu находилась в позиции +8 (nAnt/nFlu₊₈) примерно в 1,5 раза ниже по сравнению с остальным nAnt-ДНК.

Умеренное повышение сродства к ХРС–НR23В характерно для большинства субстратов NER, что соответствует выполняемой этим фактором функции.

Сродство ХРС к ДНК, содержащей пАпt как одиночное повреждение (пАnt/dG-ДHK), оцененное нами методом задержки в геле, было на 25% выше, чем сродство к dC^{FAB}/dG ДНК (таблица 3). При этом уровень NER-катализируемой эксцизии из 137-звенной nAnt/dG-ДНК также оказался примерно на 20% выше, чем из dC^{FAB}-ДНК (раздел 4). Корреляция между сродством ХРС к ДНК, содержащей объемное повреждение, и эф-фективностью NER-катализируемой эксцизии была показана для ряда субстратов NER [Yeo, 2012]. Однако во многих случаях корреляция между уровнем сродства ХРС и эф-фективностью удаления повреждения системой NER отсутствует [Liu Z. et al., 2015; Hilton B. et al., 2016; Evdokimov A. et al., 2018]. Для исследованных нами ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях ДНК, чаще наблюдалась обратная зависимость между сродством и субстратными свойствами (dC^{FAB}/nFlu₊₄₍₀₎₍₋₃₎, ряд ДНК, содержащих nAnt и nFlu) (раздел 4).

Константы диссоциации комплексов ХРС и ДНК, содержащих объемное повреждение и аналог АР-сайта в составе двуцепочечного или тандемного кластера

С использованием метода флуоресцентного титрования мы оценили константы диссоциации комплексов ХРС с ДНК-дуплексами длиной 54 п.н., содержащими nFlu и вставку на основе DEG. ДНК, используемые для этих экспериментов, содержали флуоресцентную репортерную группировку (FAM), находящуюся на 5'-конце одной из цепей ДНК-дуплекса. Полученные значения K_D представлены в таблице 4.

Таблица 4. Константы диссоциации комплексов ХРС-ДНК, полученные методом флуоресцентного титрования.

Обозначение дуп-	К _D [ХРС-ДНК], нМ		
лекса (54 п.н., 5'-	(метод флуоресцентно-		
FAM меченый)	го титрования)		
nFlu/dG	3,4±0,3		
nFlu/DEG-20	3,1±0,3		
nFlu/DEG-8	3,2±0,4		
nFlu/DEG-6	2,7±0,4		
nFlu/DEG-3	2,7±0,3		
nFlu/DEG0	2,3±0,3		
nFlu/DEG+4	2,1±0,2		
nFlu/DEG+6	2,3±0,2		
nFlu/DEG+8	3,0±0,3		
DEG(5)nFlu	2,8±0,3		
nFlu(5)DEG	2,7±0,2		
dC/dG	7,9±1,2		
DEG/dG	4,9±0,7		

Сродство ХРС-НR23В к ДНК, содержащей единичное повреждение nFlu или DEG, оказалось выше, чем сродство к немодифицированной ДНК. ХРС во всех проанализированных случаях формировал более стабильные комплексы с ДНК, содержащими кластерные повреждения, чем с ДНК с одиночной вставкой nFlu или DEG. Изменение сродства в присутствии второго повреждения (DEG) в ДНК зависело от взаимного расположения повреждений. При появлении в nFlu-содержащем дуплексе вставки DEG в той же или противоположной цепи ДНК, сродство ХРС к таким структурам повышалось на 5-60% в зависимости от расположения поврежде-

ний. Увеличение сродства было характерно для серии ДНК с повреждениями в обеих цепях, где вставка DEG смещалась к 5'-концу цепи 2. Максимальное сродство XPC-HR23B проявлял к nFlu/DEG₊₄ ДНК. Пример графика зависимости процента ДНК, включившейся в состав комплекса с XPC, от концентрации белка приведен на рис. 5.

Пример графика зависимости процента ДНК, связанной в комплекс с ХРС, от концентрации белка приведен на рис. 5.



Рис.5. График зависимости процента nFlu/dG ДНК в составе комплекса от концентрации XPC. Сродство XPC к ДНК, содержащим nFlu и DEG в составе тандемного повреждения, было повышено на 20-25% по сравнению с его сродством к nFlu/dG ДНК. Эксцизия из протяженных модельных ДНК соответствующей структуры не была затруднена (раздел 4).

Раздел 4. Влияние структуры ДНК-субстрата на эффективность удаления объемного повреждения белками NER-компетентного экстракта

Специфическая эксцизия фрагментов ДНК, содержащих повреждение, является ключевым этапом NER.

Для проведения экспериментов по анализу влияния структуры ДНК на эффективность специфической эксцизии была создана серия двуцепочечных ДНК (137 п.н.), содержащих объемную модификацию (dC^{FAB}/dG, nFlu/dG, nAnt/dG, dU^{FAP}/dG, dC^{FABG}/dG), а также набор ДНК, содержащих повреждения в обеих цепях дуплекса. Схемы, описывающие расположение аналогов повреждений в модельных ДНК, представлены на рис. 2. В качестве субстрата системой NER высших эукариот может использоваться дуплекс ДНК длиной более 120 п.н., содержащий повреждение посередине, т.е. для определения субстратных свойств в процессе NER необходимо использовать цепи с фланкирующими поврежденное звено областями не менее 60–70 нт (нуклеотидов) длиной.

При характеризации субстратных свойств модельных ДНК-дуплексы длиной 137 п.н. инкубировали с белками NER-компетентного клеточного экстракта из клеток СНО. Для оценки субстратных свойств модельных ДНК был использован метод постэксцизионного мечения [Evdokimov A. et al, 2013]. Эффективность NER-катализируемой эксцизии оценивали по уровню сигнала радиоактивной метки, которую вводили в продукты эксцизии с использованием ДНК-полимеразы, $[\alpha^{-32}P]$ dCTP и специфической матрицы, комплементарной участку вблизи повреждения. В качестве дополнительного контроля в образцах заменяли специфическую матрицу, комплементарную участку, содержащему повреждение, на «неспецифическую», последовательность которой соответствует участку цепи 2 в области 5'-конца, комплементарному участку цепи 1, не содержащему повреждения. После соответствующей подготовки образцов продукты реакции разделяли методом гельэлектрофореза в денатурирующих условиях.

Субстратные свойства ДНК, содержащих одиночные повреждения

Были созданы протяженные дуплексы (137 п.н.), содержащие одиночные объемные повреждения различной структуры. Модельные ДНК со вставками nFlu и nAnt, обладающие выраженными субстратными свойствами [Evdokimov A. et al., 2013], были использованы для сравнительной оценки уровня эксцизии из dC^{FAB}/dG -ДНК, а также из dU^{FAP} - и dC^{FABG} -ДНК, ранее применявшиеся для создания фотоактивных зондов и аналогов субстратов NER [Evdokimov A. et al., 2013; Petruseva I. et al, 2009]. При инкубации dC^{FAB}/dG -, nFlu/dG-, dU^{FAP}/dG - и dC^{FABG}/dG -ДНК с белками экстракта СНО в реакционной смеси появлялись продукты специфической эксцизии (рис. 6, а). Выдерживание неповре-

жденной ДНК с белками экстракта не приводило к появлению специфических продуктов (рис. 6, *a*, *б*). Количественная оценка уровней формирования продуктов специфической эксцизии (рис. 6, *б*) позволила расположить модельные ДНК по их субстратным свойствам в следующий ряд: nAnt/dG > nFlu/dG \approx dC^{FAB}/dG > dC^{FABG}/dG > dU^{FAP}/dG.



Рис. 6. а. Анализ субстратных свойств модифицированных ДНК (137 п.н.): dC^{FAB}/dG (1), nFlu/dG (2), nAnt/dG (3), dU^{FAP}/dG (4), dC^{FABG}/dG (5) и нмDNA (6). Реакционные смеси, содержавшие 2,3 мг/мл белков экстракта СНО и 20 нМ ДНК в 1×NER-буфере (25 мМ Tris-HCl (рН 7,8), 45 мМ NaCl, 4,4 мМ MgCl₂, 0,02 мМ ЭДТА, 0,8 мМ АТР), инкубировали 45 мин при 30°. Радиоактивную метку в продукты эксцизии вводили с использованием Таqполимеразы и [α -³²P]dCTP. Для разделения продуктов был использован

электрофорез в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях; б – график зависимости эффективности специфической эксцизии от типа ДНК-субстрата: dC^{FAB}/dG (1), nAnt/dG (2), nFlu/dG (3), dU^{FAP}/dG (4), dC^{FABG}/dG (5), эффективность эксцизии из dC^{FAB}/dG -ДНК была принята за 1; в – радиоавтограф геля после разделения продуктов эксцизии из модельных ДНК (137 п.н.): dC^{FAB}/dG (1), nFlu/nFlu₊₄ (2), nFlu/nFlu₋₃ (3), nAnt/nFlu₊₄ (4), nAnt/nFlu₋₃ (5), dC^{FAB}/Flu_{+4} (6), $dC^{FAB}/nFlu_{-3}$ (7), немодифицированная ДНК (8).

Таким образом, модельное повреждение dC^{FAB} распознавалось и удалялось из ДНК с высокой эффективностью, близкой к эффективности nAnt/dG- и nFlu/dG ДНК. При этом эффективность специфической эксцизии из dC^{FABG} - и dU^{FAP}/dG ДНК была заметно ниже.

Фотоактивируемое производное dC^{FAB} было использовано для создания ДНКзондов различной структуры. Проведена серия экспериментов по фотопришивке белка XPC и белков различных экстрактов к полученным зондам [Lukianchikova N., 2016] (результаты не приводятся в данной работе).

Мы предполагаем, что выраженные субстратные свойства модельного повреждения dC^{FAB} по сравнению с другими объемными повреждениями, dC^{FABG} и dU^{FAP} , обусловлены эффективным взаимодействием поврежденного звена на стадии верификации с одной из субъединиц фактора TFIIH, ATP-зависимой 5' \rightarrow 3' хеликазой XPD. Анализ кристаллических структур архейных аналогов XPD, а также изучение взаимодействия мутантных белков XPD человека с поврежденной ДНК показали, что окончательная верификация субстрата происходит при контакте звеньев поврежденной цепи с особой структурой («карманом»). Эта структура находится на поверхности XPD вблизи выхода из «туннеля» (поры) в глобуле белка, через который в процессе верификации проходит модицированная цепь ДНК. Полученные к настоящему с использованием рекомбинантного белка XPD *Caetomium termophilum* (Ct) и набора частичных дуплексов с выступающим 5'-концом результаты свидетельствуют о том, что XPD Ct, как и XPD человека, останавливается (ее ATP-зависимая активность падает) при взаимодействии с ДНК, содержащими объемные повреждения (Mathieu A., et al., 2010).

Линкерный фрагмент повреждения dC^{FAB} , связывающий C5 азотистого основания с плоским фторазидобензоильным кольцом, содержит жесткий элемент (тройная связь) (рис. 1). Возможно, такая химическая структура повреждения обеспечивает более эффективные контакты dC^{FAB} с сенсорным карманом XPD, чем, например, структура dU^{FAP} , включающая гибкий протяженный линкерный фрагмент.

В дальнейшем мы планируем провести ряд экспериментов фотопришивке белков NER к радиоактивным зондам, содержащим dC^{FAB} , dU^{FAP} , dC^{FABG} и другие аналоги повреждений, для оценки вклада разных стадий процесса NER (инициации, верификации повреждения) в наблюдаемую экспериментально разницу в эффективности эксцизии.

Субстратные свойства ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях дуплекса

Были проанализированы субстратные свойства ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях дуплекса, расположенных на разном расстоянии друг от друга. В данной серии экспериментов было использовано три модельных объемных повреждения: nAnt, dC^{FAB} и nFlu. Были созданы ДНК, содержащие nAnt или dC^{FAB} в цепи 1, и второе объемное повреждение, вставку nFlu, в цепи 2, расположенную на расстоянии до 20 нт относительно повреждения верхней цепи в направлении 5'- или 3'-конца. Схемы, описывающие расположение кластерных повреждений в модельных ДНК, приведены на рис. 2.

Эффективность эксцизии dC^{FAB} -содержащих фрагментов из 137-звенных ДНК с двумя повреждениями, расположенными на расстоянии до 4 нт в обеих цепях ($dC^{FAB}/nFlu_3, dC^{FAB}/nFlu_0, dC^{FAB}/nFlu_{+4}$), была низкой (менее 10% от уровня эксцизии из dC^{FAB}/dG ДНК) (рис. 6в, 7). При увеличении расстояния между объемными повреждениями эффективность эксцизии dC^{FAB} -содержащего фрагмента из цепи 1 значительно повышалась: dC^{FAB}/dG ДНК и ДНК, содержащие nFlu в позициях -20, -10 и +8, оказались одинаково эффективными субстратами (рис. 7).



Рис. 7. Относительные эффективности удаления nAnt- и dC^{FAB}-содержащих фрагментов из состава ДНК-дуплексов. При расчетах эффективность эксцизии dC^{FAB}-содержащего фрагмента из dC^{FAB}/dG ДНК принята за 1.

Аналогичным образом были оценены субстратные свойства ДНК, содержащих повреждение nAnt в цепи 1 и вставку nFlu в положениях -20, -10, -3, 0, +4 и +8 комплементарной цепи. Инкубация с белками экстракта ДНК nAnt/nFlu₋₃₍₊₄₎ не приводила к появлению детектируемого количества продуктов специфической эксцизии (рис. 6в, 7). Эффективность удаления nAnt-содержащих фрагментов из ДНК с двумя повреждениями nAnt/nFlu₋₂₀, nAnt/nFlu₋₁₀ и nAnt/nFlu₊₈ не превышала 20% от эффективности эксцизии из содержащей nAnt в качестве одиночного повреждения, nAnt/dG-ДНК (рис. 7).

Таким образом, второе объемное повреждение nFlu в позициях комплементарной цепи, находящихся напротив позиций -20, -10, 0 или +8, по-разному влияет на способность к удалению из ДНК фрагментов, содержащих dC^{FAB} или nAnt. Появление nFlu в позициях второй цепи ДНК, отстоящих от dC^{FAB} более чем на 9 звеньев с 5'-стороны и на 7 звеньев с 3'-стороны, не приводит к снижению эффективности удаления dC^{FAB} . Только в случае dC^{FAB} /nFlu₋₃₍₀₎₍₊₄₎-ДНК происходит 90%-ное подавление удаления dC^{FAB} (рис. 7). При этом введение nFlu в позиции -3 и +4 модельных nAnt/nFlu-₃₍₊₄₎/dG ДНК полностью подавляло удаление nAnt из верхней цепи. Представляется маловероятным, что различия во влиянии nFlu на удаление повреждений из dC^{FAB} - или nAnt-содержащих цепей вызваны различиями в субстратных свойствах каждого отдельного повреждения. Известно, что на эффективность удаления объемных повреждений системой NER влияет присутствие и расположение в поврежденной ДНК участков с нарушенными или ослабленными водородными связями [Sugasawa K. et al., 2001; Sugasawa K. et al., 2009; Camenisch U., et al., 2009; Petruseva I. et al., 2014;].

Пониженная термостабильность дуплексов с двумя модификациями (таблица 4), а также повышенное сродство XPC–HR23B (таблица 2), свидетельствуют о наличии в dC^{FAB}/nFlu и nAnt/nFlu ДНК таких дестабилизированных участков. Наши эксперименты не выявили, однако, прямой корреляции между термостабильностью дуплексов, их способ-

ностью к связыванию XPC и уровнем субстратных свойств ДНК. Это указывает на существенный вклад деталей структурной организации ДНК-субстратов. А именно, эффективность удаления повреждения системой NER в значительной степени зависит от расположения участков дестабилизации относительно повреждения, а также от структуры самих повреждений.

Субстратные свойства ДНК, содержащих объемное повреждение и аналог APсайта в составе кластера

Были созданы модельные ДНК с объемным повреждением nFlu в составе двуцечочечного или тандемного кластерного повреждения со вставкой на основе DEG. Структуры повреждений и их расположение в молекулах ДНК представлены на рис. 1 и 2.

Было показано, что в присутствии DEG в позициях -3. 0, +4 комплементарной цепи NER-катализируемая эксцизия nFlu полностью подавлена, а в позициях +6 и -6 – снижена на 50-60% (рис. 8 а, б, рис. 9а). Расположение DEG в более дальних позициях (-20, -10, +8 комплементарной цепи) не оказывало значительного влияния на эффективность эксцизии. При этом сродство XPC к ДНК, содержащим кластерные повреждения, во всех проанализированных случаях было слегка повышено по сравнению с nFlu/dG ДНК (раздел 3). Таким образом, сродство XPC к некоторым ДНК, содержащим двуцепочечные кластерные повреждения (позиции DEG -6... + 6 в цепи 2) находится в обратной зависимости с эффективностью процесса NER. В то же время эксцизия из ДНК, содержащих два повреждения (nFlu и DEG), разделенные 5 нт звеньями, в одной цепи, не была затруднена (рис. 8 в, рис.9 б).



Рис. 8. Радиоавтографы гелей после разделения радиоактивно меченых продуктов реакции специфической эксцизии методом электрофореза в денатурирующих условиях (10% ПААГ, 7 М мочевина). Реакционные смеси, содержащие 20 нМ ДНК (137 п.н.), 500 нМ специфическую или неспецифическую матрицу, 1,2 мг/мл белков экстракта клеток СНО в буфере для NER, инкубировали 6 или 12 мин при 30° С. Продукты специфической эксцизии были радиоактивно помечены с помощью α -[³²P]-dCTP и Taq ДНК полимеразы. Меченые по 5'-концу олигонуклеотиды были использованы как маркеры длины (34 и 30 нт).

- a). Сравнение субстратных свойств nFlu/dG, nFlu/DEG.3, nFlu/DEG.6 и nFlu/DEG+6 ДНК.
- б). Сравнение субстратных свойств nFlu/dG, nFlu/DEG.3, nFlu/DEG+4 и nFlu/DEG0 ДНК.

в). Сравнение субстратных свойств nFlu/dG, nFlu(5)DEG и DEG(5)nFlu ДНК.



Рис. 9 а, б. Зависимость накопления продуктов специфической эксцизии от времени инкубации. Эффективность эксцизии из nFlu/dG ДНК при инкубации в течение 12 мин была взята за 1.

Для ряда дуплексов $dC^{FAB}/nFlu_{3(0)(+4)}$ не было выявлено прямой корреляции между термостабильностью ДНК, способностью к связыванию ХРС и уровнем их субстратных свойств. Детали структурной организации ДНК-субстратов, в частности, то, как участки дестабилизации расположены относительно повреждения, а также структуры самих повреждений оказывают существенное влияние на эффективность удаления повреждений системой NER [Liu Z. et al., 2015; Hilton B. et al., 2016]. Пониженная термостабильность дуплексов с двумя модификациями (таблица 2), а также повышенное сродство XPC–HR23B (таблица 3), указывают на наличие в $dC^{FAB}/nFlu nAnt/nFlu ДHK$ участков дестабилизации. Данные экспериментов с использованием модельных ДHK, содержащих dC^{FAB} , согласуются с представлением о том, что система NER высших млекопитающих различает повреждения на основе многих критериев, что определяется механизмами последовательно происходящих процессов узнавания поврежденного участка и верификации поврежденного звена.

Наблюдаемое предпочтение ХРС в связывании ДНК, содержащих вставку nFlu в составе кластерного повреждения, может обеспечиваться наличием в ДНК участков со сниженной термостабильностью, возникающих в результате взаимодействия объемной флуоресценильной группы nFlu с окружающей ДНК [Evdokimov A. et al., 2018].

Для ряда ДНК, содержащих кластеры, выявлена обратная корреляция между сродством ХРС к данным структурам и их сниженными субстратными свойствами. Это может указывать на то, что из-за структурных особенностей участка ДНК вблизи объемного повреждения ХРС не удается сформировать продуктивные комплексы, что приводит к последующему подавлению эксцизии. Низкая эффективность NER, наблюдающаяся при расположении повреждения в определенном ДНК-контексте может быть связана с увеличением локальной стабилизации структуры ДНК за счет стэкинг-взаимодействий между повреждением и окружающими основаниями ДНК. Сильные стэкинг-взаимодействия ароматических колец объемного повреждения с окружающими азотистыми основаниями ДНК (при отсутствии комплементарной пары) или с повреждением противоположной цепи могут мешать ХРС осуществить корректное распознавание повреждения, препятствуя инсерции β-шпильки и выворачиванию повреждения из спирали, таким образом, ингибируя процесс NER.

На основании полученных экспериментальных данных были выбраны ДНК длиной 54 п. н. (nFlu/dG, nFlu/DEG₀, nFlu/DEG₋₆ и немодифицированная ДНК) для проведения компьютерного моделирования их структуры методом молекулярной динамики. Для одной из них, nFlu/DEG₀, был характерен крайне низкий уровень NER-катализируемой эксцизии (рис. 8 б). Уровень сродства ХРС к nFlu/DEG₀ ДНК был сравнительно высок (таб-

лица 4). Как показало моделирование молекулярной динамики, между nFlu и DEG в составе этой ДНК существуют сильные стэкинг-взаимодействия, что, как уже отмечено, затрудняет корректное связывание ХРС.

Повреждения, для которых характерна устойчивость к NER-катализируемой эксцизии в сочетании повышенным сродством ХРС к таким структурам, будут накапливаться в клетке, вовлекая все большее число молекул ХРС и других белков NER в процесс формирования непродуктивных комплексов. При этом эффективность работы данной системы репарации и других путей метаболизма ДНК будет снижаться [Le May N. et al., 2010].

Полученные экспериментальные данные вместе с результатами моделирования молекулярной динамики вносят вклад в понимание механизмов репарации содержащих объемные аддукты кластерных повреждений разной топологии в клетках млекопитающих.

Заключение.

Система репарации NER играет важнейшую роль в поддержании стабильности генома и обеспечении низких темпов канцерогенеза в клетках высших эукариот. Для этой системы характерна широчайшая субстратная специфичность – NER удаляет повреждения, возникающие в результате воздействия ультрафиолетового излучения, химиотерапевтических агентов, а также канцерогенов окружающей среды. При этом скорости, с которыми система NER удаляет повреждения, могут различаться на порядки.

Основная научная задача данного исследования заключалась в изучении свойств ДНК, содержащих объемные повреждения в составе кластеров (множественных повреждений ДНК) как субстратов для системы NER. Кластерные повреждения ДНК могут возникать при интенсивном комбинированном воздействии повреждающих факторов: например, ионизирующего излучения и химиопрепаратов, а также при нарушении процессов репарации ДНК. Для разработки новых методов профилактики и лечения онкологических заболеваний необходимо глубокое понимание механизмов удаления повреждений, в том числе кластерных, системой NER в клетках млекопитающих.

В данной работе был создан ряд модельных ДНК с различной архитектурой, в том числе, ДНК, содержащие объемные повреждения в кластерах с различным составом и с взаимным расположением повреждений. Проведено систематическое экспериментальное исследование свойств модельных ДНК, в результате которого обнаружены закономерности, определяющие эффективность элиминации объемных повреждений из состава кластеров. Выявлены характерные для разных типов повреждений интервалы позиций противоположной цепи ДНК, расположение в пределах которых дополнительных повреждений подавляет NER-катализируемую эксцизию.

Результаты выполненного компьютерного моделирования ДНК указывают на структурные причины, связанные с наблюдаемым подавлением эксцизии. А именно, значительное подавление NER-катализируемой эксцизии характерно для дуплекса, повреждения в составе которого вступают между собой в стэкинг-взаимодействия.

Экспериментальные данные в совокупности с результатами компьютерного моделирования ДНК позволяют проанализировать процесс репарации кластерных повреждений ДНК в клетках млекопитающих и оценить зависимость скорости удаления объемного повреждения в составе кластера от структуры и взаимного расположения повреждений.

Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов репарации кластерных повреждений разной топологии в клетках млекопитающих и дополняют литературные данные по этой проблематике.

выводы.

- Новое объемное модельное повреждение, dC^{FAB}, эффективно распознается и удаляется белками NER из ДНК. Эффективность эксцизии других проанализированных фотоактивируемых аналогов повреждений, dC^{FABG} и dU^{FAP}, значительно ниже.
- 2. Сродство ХРС ко всем проанализированным в данной работе ДНК, содержащим повреждения, выше, чем к немодифицированной ДНК. Для всех проанализированных структур появление второго повреждения (вставки nFlu) в противоположной цепи дуплекса приводило к увеличению сродства ХРС к данной структуре.
- ДНК, содержащие близко расположенные объемные повреждения в обеих комплементарных цепях представляют собой трудно репарируемые или нерепарируемые структуры. При увеличении расстояния между объемными повреждениями ДНК в составе кластера эффективность процесса NER варьирует в зависимости от их структуры и взаимного расположения.

NER-катализируемая эксцизия объемного повреждения снижается в присутствии в комплементарной цепи ДНК аналога AP-сайта (вставки на основе DEG), если расстояние между повреждениями меньше 6 п.н. Расположение аналога AP-сайта в более дальних позициях комплементарной цепи не оказывает значительного влияния на эффективность эксцизии фрагмента, содержащего объемное повреждение. Сродство XPC к ряду ДНК, содержащих объемное повреждение и аналог AP-сайта в составе двуцепочечного кластера, обратно коррелирует с эффективностью процесса NER.

- Для ряда ДНК, содержащих объемные повреждения в обеих цепях дуплекса, выявлено отсутствие прямой корреляции между термостабильностью дуплексов, их способностью к связыванию ХРС, а также уровнем субстратных свойств ДНК.
- 5. Результаты выполненного компьютерного моделирования ДНК, содержащих объемное повреждение и аналог АР-сайта в составе двуцепочечного кластера, указывают на структурные причины, связанные с наблюдаемым подавлением эксцизии. А именно, значительное подавление NER-катализируемой эксцизии характерно для дуплекса, повреждения в составе которого вступают между собой в стэкингвзаимодействия. Полученные данные позволяют проанализировать процесс репарации кластерных повреждений ДНК в клетках млекопитающих и оценить зависимость скорости удаления объемного повреждения в составе кластера от структуры и взаимного расположения повреждений.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

из перечня ВАК:

- 1. ДНК с повреждениями в обеих цепях как аффинные зонды и субстраты системы ЭРН (статья). Лукьянчикова Н. В., Петрусева И. О., Евдокимов А. Н., Сильников В. Н., Лаврик О. И. 2016. *«Наука», г. Москва; Биохимия.* 81 (3), 386-400.
- 2. Repair of bulky lesions in DNA of mammalian cells: a properties analysis of model substrates, simulating various types of damaged DNA (poster). Lukianchikova N., Petruseva I., Lavrik O. 2016. *The FEBS Journal 283 (Suppl. 1)*, 155-156.
- ДНК, содержащие объемные флуоресцентные и фотоактивные повреждения как субстраты ЭРН и аффинные зонды (статья). Лукьянчикова Н. В., И. О. Петрусева, А. Н. Евдокимов, И. В. Сафронов, Л. С. Королева, О. И. Лаврик. 2017. «Наука», г. Москва; Молекулярная биология. 52(2), 277-288.
- 4. Clustered DNA lesions repair by NER system (poster). Lukianchikova N., Petruseva I., Lavrik O. 2017. *The FEBS Journal 284 (Suppl. 1)*, 109.
- Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells (статья). Evdokimov A., Kutuzov M., Petruseva I., Lukjanchikova N., Kashina E., Kolova E., Zemerova T., et al. 2018. Aging (Albany NY). 10(6), 1454-1473.
- Unrepairable substrates of nucleotide excision repair and their application to suppress the activity of this repair system (статья). Popov A. A., Evdokimov A. N., Lukyanchikova N. V., Petruseva I. O., Lavrik O. I. 2019. *Biopolymers and Cell.* 35(2): 107–117.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Camenisch U., Träutlein D., Clement F., Fei J., Leitenstorfer A., Ferrando-May E., Naegeli H. Two-stage dynamic DNA quality check by xeroderma pigmentosum group C protein. *EMBO J.* 2009. **28**(16): 2387–2399.

Evdokimov A.N., Tsidulko A.Y., Popov A. V., Vorobiev Y.N., Lomzov A.A., Koroleva L.S., Silnikov V.N., Petruseva I.O., Lavrik O.I. Structural basis for the recognition and processing of DNA containing bulky lesions by the mammalian nucleotide excision repair system. *DNA Repair (Amst).* 2018. **61**, 86-98.

Evdokimov, A., Petruseva, I., Tsidulko, A., Koroleva, L., Serpokrylova, I., Silnikov, V., and Lavrik, O. New synthetic substrates of mammalian nucleotide excision repair system. *Nucleic Acids Res.* 2013. **41**(12), e123.

Friedberg E., Aguilera A., Gellert M., Hanawalt P., Hays J., Lehmann A., et al. DNA repair: From molecular mechanism to human disease article. *DNA Repair (Amst)*. 2006. **5**, 986-996.

Hilton B., Gopal S., Xu L., Mazumder S., Musich P.R., Cho B.P., Zou Y.Z. Dissociation dynamics of XPC-RAD23B from damaged DNA Is a determining factor of NER efficiency. *PLoS One*. 2016. **11** (6), e0157784.

Hoeijmakers J. DNA Damage, Aging, and Cancer. N. Engl. J. Med. 2009. 361, 1475-85.

Kutuzov M.M., Ilina E.S., Sukhanova M. V., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D. V., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. Interaction of poly(ADP-ribose) polymerase 1 with apurinic/apyrimidinic sites within clustered DNA damage. *Biochem.* 2011. **76**, 176-187.

Le May N., Egly J.-M., Coin F. True Lies: The Double Life of the Nucleotide Excision Repair Factors in Transcription and DNA Repair. *J. Nucleic Acids*. 2010. pii: 616342.

Liu Z., Ding S., Kropachev K., Lei J., Amin S., Broyde S. 2015. Resistance to Nucleotide Excision Repair of Bulky Guanine Adducts Opposite Abasic Sites in DNA Duplexes and Relationships between Structure and Function. *PLoS One*. 2015. **10** (9), e0137124.

Mathieu N., Kaczmarek N., Naegeli H. Strand- and site-specific DNA lesion demarcation by the xeroderma pigmentosum group D helicase. PNAS. 2010. 107 (41), 17545-17550.

Petruseva I., Evdokimov A., Lavrik O. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae*. 2014. **6**, 24–36.

Petruseva I.O., Tikhanovich I.S., Maltseva E. a, Safronov I. V, Lavrik O.I. Photoactivated DNA analogs of substrates of the nucleotide excision repair system and their interaction with proteins of NER-competent HeLa cell extract. *Biochemistry*. 2009. 74, 1608-3040.

Rechkunova N., Lavrik O. 2010. Nucleotide Excision Repair in Higher Eukaryotes: Mechanism of Primary Damage Recognition in Global Genome Repair. *Subcell Biochem*. 2010. **50**, 251-77.

Schärer O.D. Chemistry and Biology of DNA Repair. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003. **42**(26), 2946-74.

Sugasawa K., Akagi J., Nishi R., Iwai S., Hanaoka F. Two-Step Recognition of DNA Damage for Mammalian Nucleotide Excision Repair: Directional Binding of the XPC Complex and DNA Strand Scanning. *Mol. Cell.* 2009. **36**, 642-653.

Sugasawa K., Okamoto T., Shimizu Y., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F. A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 2001. **15**(5), 507–521.

Yeo J., Khoo A., Fagbemi A.F., Schärer O. The efficiencies of damage recognition and excision correlate with duplex destabilization induced by acetylaminofluorene adducts in human nucleotide excision repair. *Chem. Res. Toxicol.* 2012. **25** (11), 2462-2468.

Евдокимов А.Н., Петрусева И.О., Пестряков П.Е., Лаврик О.И. Фотоактивируемые ДНК-аналоги субстратов системы эксцизионной репарации нуклеотидов и их взаимодействие с белками NER-компентентного экстракта клеток HeLa. *Биохимия*. 2011. **76**, 188–200.



Отчет о проверке на заимствования №1



№ документа: 2

Лукьянчикова2

Размер текста: 941 кБ

Символов в тексте: 49268 Слов в тексте: 6332

Число предложений: 523

Автор: Новопашина Дарья Сергеевна <u>danov@niboch.nsc.ru</u> / ID: 7007712 Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <u>https://users.antiplagiat.ru</u>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Начало загрузки: 06.09.2019 05:44:19

Длительность загрузки: 00:00:04

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ



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.

N₂	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	1,58%	Диссертация (5/5)	http://niboch.nsc.ru	25 Дек 2014	Модуль поиска Интернет
[02]	0,67%	Nucleotide Excision Repair [Elektronische Ressource] : From Recognition to Incision of d	https://d-nb.info	15 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[03]	0,23%	Автореферат	http://niboch.nsc.ru	25 Дек 2014	Модуль поиска Интернет
[04]	0%	Role of XPC in the human cutaneous cancer cells invasion;Le rôle de XPC dans l'invasion	https://tel.archives-ouvertes.fr	09 Июл 2019	Модуль поиска Интернет
[05]	0,12%	Study of DNA repair factor Xeroderma pigmentosum group C (XPC) in hematopoietic ste	https://tel.archives-ouvertes.fr	16 Июл 2019	Модуль поиска Интернет
[06]	0,3%	Base Sequence Context Effects on Nucleotide Excision Repair	https://hindawi.com	02 Сен 2017	Модуль поиска Интернет
[07]	0,4%	Лаборатория биоорганической химии ферментов [Институт химической биологии.	http://niboch.nsc.ru	03 Июн 2019	Модуль поиска Интернет
[08]	0,44%	Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA	https://doi.org	23 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[09]	0,36%	Взаимодействие многофункциональных белков человека – Ки-антигена и глицера	http://niboch.nsc.ru	02 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[10]	0,2%	Автореферат	http://vector.nsc.ru	17 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[11]	0,2%	Фотореакционноспособные производные ДНК как инструмент для исследования э	http://earthpapers.net	23 Окт 2017	Модуль поиска Интернет
[12]	0%	Сборник материалов	https://mcb.nsc.ru	30 Окт 2018	Модуль поиска Интернет
[13]	0,36%	Диссертация на тему «Модифицированные производные нуклеиновых кислот, сод	https://dissercat.com	18 Июл 2019	Модуль поиска Интернет
[14]	0,36%	Highly specific and sensitive method for measuring nucleotide excision repair kinetics of	https://doi.org	24 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[15]	0,28%	Characterization of Three XPG-Defective Patients Identifies Three Missense Mutations th	https://doi.org	23 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[16]	0%	Posters (1/5)	https://doi.org	12 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[17]	0,12%	Молекулярно-генетические маркеры предрасположенности к развитию злокачест	http://earthpapers.net	16 Фев 2019	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

Лукьянчикова Наталья Вильевна

«Репарация объемных повреждений в клетках млекопитающих. Анализ репаративного синтеза *in vitro* с применением модельных ДНК»

Оригинальность работы составляет ___94.39___%, 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