

на правах рукописи



Науменко Наталья Вильевна

**Закономерности процесса удаления объемных аддуктов из
кластерных повреждений ДНК системой NER млекопитающих**

1.5.4 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научные руководители:

Лаврик Ольга Ивановна, д.х.н., профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, зав. лабораторией биоорганической химии ферментов

Петрусева Ирина Олеговна, к.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, с.н.с.

Официальные оппоненты:

Савинкова Людмила Кузьминична, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», в.н.с., зав. сектором молекулярно-генетических механизмов белок-нуклеиновых взаимодействий

Малыгин Алексей Аркадьевич, д.х.н., доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в.н.с.

Трифонов Владимир Александрович, д.б.н. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, зав. лабораторией сравнительной геномики

Защита состоится 17 декабря 2021 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» ноября 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



В. В. Коваль

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Эксцизионная репарация нуклеотидов (англ. “nucleotide excision repair”, NER) является основным механизмом удаления объемных повреждений, существенно искажающих структуру ДНК-спирали. Повреждения, процессируемые NER, возникают в результате воздействия на ДНК живой клетки ультрафиолетового (УФ) и ионизирующего излучения, химиотерапевтических агентов, а также различных канцерогенов окружающей среды. Система NER в клетках эукариот играет важную роль в поддержании стабильности генома (Marteijn J. A., et al., 2014; Edifizi D., Schumacher B., 2015). Накопление повреждений ДНК является одной из причин развития онкологических заболеваний и связано с преждевременным старением (Marteijn J. A., et al., 2014). С другой стороны, высокая эффективность репарации аддуктов некоторых химиотерапевтических препаратов с ДНК в процессе NER может приводить к резистентности к ним раковых клеток (Torgovnick A., Schumacher B., 2015; Duan M., et al., 2020).

Два или более повреждений, расположенных в пределах одного-двух витков спирали ДНК, называют кластерными. Кластеры, состоящие из повреждений различной структуры, могут возникать в ДНК при интенсивном комбинированном воздействии повреждающих факторов: например, ионизирующего излучения и химиопрепаратов, а также при нарушении репарации ДНК в клетке (Kidane D., et al., 2014; Zheng Y., Sanche, L., 2019). Особая токсичность кластерных повреждений для клетки связана, с одной стороны, с повышенной вероятностью возникновения в процессе их репарации двухцепочечных разрывов ДНК и, с другой стороны, со сложностью механизма репарации таких повреждений, что часто проявляется в их устойчивости к действию репаративных машин (Sage E., Harrison L., 2011; Georgakilas A. G., et al., 2013).

Основой для необычайно широкой субстратной специфичности NER является способность этой системы репарации к узнаванию участков ДНК с искажениями регулярной структуры двойной спирали, вызванными присутствием объемных аддуктов нуклеотидных звеньев. Это обстоятельство позволяет использовать различные синтетические аналоги объемных повреждений (модельные повреждения) для изучения процесса NER.

В данной работе исследован процесс распознавания и удаления из ДНК объемных аддуктов, входящих в состав кластеров повреждений, белками системы NER. Проведен систематический анализ свойств модельных ДНК, содержащих кластерные повреждения, в том числе оценена эффективность протекания ключевых этапов NER – первичного узнавания поврежденного участка ДНК комплексом белков ХРС (англ.

“xeroderma pigmentosum type C”) и RAD23B, и эксцизии объемного повреждения ДНК белками системы NER *in vitro*. Благодаря данным компьютерного моделирования выявлены структурные особенности, характерные для устойчивых к репарации ДНК, содержащих кластерные повреждения.

Следующая после первичного узнавания повреждения ДНК стадия процесса NER – его верификация – осуществляется мультисубъединичным фактором TFIIH. В данной работе исследовано взаимодействие комплекса субъединиц XPD (англ. “xeroderma pigmentosum type D”) и p44 фактора TFIIH, играющего ключевую роль в верификации повреждения, с серией ДНК, содержащих модифицированные пиримидиновые нуклеотиды, несущие объемные фторазидобензоильные или фторхлоразидопиридилные группировки. Выявлена корреляция между эффективностью эксцизии проанализированных модельных повреждений из ДНК системой NER и эффективностью взаимодействия комплекса субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH с этими ДНК.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование свойств ДНК, содержащих кластерные повреждения, как субстратов для системы NER, определение зависимости между типом и расположением повреждений ДНК в кластере и эффективностью их распознавания и последующей эксцизии в процессе NER, а также выявление структурных свойств, которые лежат в основе устойчивости повреждений ДНК к эксцизии, катализируемой системой NER.

В ходе работы планировалось решить следующие задачи:

1. Сравнить эффективность эксцизии модельных объемных повреждений ДНК в случае их расположения в составе группы повреждений, находящихся в противоположных цепях ДНК в пределах одного-двух витков спирали (двухцепочечного кластера), комплексом белков системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), содержащимся в клеточных экстрактах.
2. Выявить особенности протекания этапа первичного узнавания объемных повреждений ДНК, расположенных в составе двухцепочечных кластеров: оценить сродство белкового комплекса XPC-RAD23B к модельным ДНК. Проанализировать структурные особенности модельных ДНК, содержащих объемное нуклеотидное повреждение с флуоресцентильным остатком (nFlu) и вставку на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (аналог апуринового/апиримидинового (AP)-сайта) в составе двухцепочечного кластера, для которых характерна сниженная эффективность эксцизии nFlu системой NER.
3. Исследовать взаимодействие серии модельных ДНК, содержащих модифицированные пиримидиновые звенья, несущие объемные фотоактивируемые заместители, с рекомбинантными белками гриба

Chaetomium thermophilum (Ct) – субъединицами XPD и p44 фактора TFIIH, осуществляющего верификацию повреждений ДНК, методами флуоресцентного титрования, торможения в геле и фотоаффинной модификации. Проанализировать влияние структуры объемных повреждений ДНК на эффективность протекания этапов их верификации и эксцизии, катализируемой NER.

Научная новизна работы.

В работе впервые проведено систематическое исследование того, как на эффективность первичного узнавания и эксцизии объемных повреждений ДНК системой общегеномной NER высших эукариот влияет присутствие в комплементарной цепи ДНК-дуплекса дополнительного повреждения в пределах участка двухцепочечной (дц) ДНК, с которым взаимодействует белковый комплекс NER. Результаты, полученные в ходе исследования, позволяют выделить этап первичного узнавания поврежденной ДНК сенсорным комплексом XPC-RAD23B как определяющий резко сниженную эффективность эксцизии объемного повреждения ДНК из состава кластерного повреждения в процессе NER. При изучении взаимодействия субъединиц XPD и p44 фактора TFIIH на этапе верификации повреждения с ДНК впервые выявлена взаимосвязь между сродством комплекса XPD-p44 к поврежденной ДНК и эффективностью эксцизии повреждения. В сочетании с данными, полученными с применением метода фотоаффинной модификации, результаты экспериментов демонстрируют способность белкового комплекса XPD-p44 гриба *Chaetomium thermophilum* различать объемные повреждения ДНК.

Практическая значимость работы. Репарация ДНК является одной из актуальнейших тем исследований. Активность систем репарации ДНК в клетке значительно влияет на эффективность действия противоопухолевых препаратов. Понимание взаимосвязи между структурой повреждения ДНК и эффективностью его эксцизии системой NER необходимо для разработки новых терапевтических подходов к лечению онкологических заболеваний.

На основании полученных в настоящей работе данных предложена модель, объясняющая устойчивость объемного повреждения, расположенного напротив AP-сайта в ДНК-дуплексе, к репарации по механизму NER. Показано, что эффективность эксцизии повреждения ДНК может зависеть от эффективности прохождения стадии его верификации в процессе NER. Результаты систематического анализа свойств ДНК, содержащих кластерные повреждения, дополняют представления о механизме их репарации, их потенциальной биологической значимости и судьбе в клеточной ДНК.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. При расположении модельного объемного повреждения ДНК в составе двухцепочечного кластера эффективность его эксцизии системой NER оказывается резко сниженной. Расстояние между повреждениями в молекуле ДНК, в пределах которого наблюдается подавление эксцизии, зависит от химической структуры повреждений, образующих двухцепочечный кластер.
2. Сенсорный фактор XPC-RAD23B проявляет повышенное сродство к ДНК, содержащим объемные повреждения в составе двухцепочечных кластеров.
3. Полное или частичное подавление эксцизии объемного нунуклеотидного повреждения nFlu, расположенного в составе двухцепочечного кластера с аналогом AP-сайта, может быть обусловлено повышением стабильности примыкающих к месту введения nFlu участков ДНК, а также наличием участков с высокой подвижностью цепей ДНК в удаленных от nFlu участках молекулы. Эти структурные особенности препятствуют формированию продуктивных комплексов белка XPC с ДНК и, в итоге, протеканию процесса NER.
4. Выявлены различия в эффективности взаимодействия рекомбинантных белков термофильного гриба *Chaetomium thermophilum* – XPD и p44, субъединиц фактора TFIIH, с ДНК, содержащими репарируемые и нерепарируемые системой NER модельные повреждения. Продемонстрировано, что в случае модельных ДНК, содержащих звенья цитидина с введенными в качестве заместителей объемными фотоактивируемыми группировками, эффективность взаимодействия комплекса XPD-p44 с повреждениями ДНК коррелирует с эффективностью их эксцизии системой NER.

Апробация и публикация результатов. По материалам диссертации опубликовано 4 научные статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты работы были представлены на VIII Всероссийском с международным участием молодых ученых биологов «Симбиоз – Россия» конгрессе (Новосибирск, Россия, 2015), Международной научной студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2016), 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), Международном форуме 17th FEBS Young Scientist's Forum (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 EEMGS Annual Meeting (Потсдам, Германия, 2018),

Всероссийская Конференция с Международным участием «Биотехнология-медицине будущего» (Новосибирск, Россия, 2019), VI съезде биохимиков России (Сочи–Дагомыс, Россия, 2019), BGRS/SB-2020 (Новосибирск, Россия, 2020), Международная конференция 45nd FEBS Virtual Congress (онлайн форма проведения, 2021).

Личный вклад автора.

Основные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии, за исключением моделирования молекулярной динамики ДНК-дуплексов, проведенного к.ф.-м.н. Ломзовым А. А (ИХБФМ СО РАН).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах, содержит 29 рисунков, 13 таблиц и одно приложение. Библиография включает 297 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Дизайн структур модельных ДНК-субстратов. Выбор модельных повреждений ДНК.

Первой задачей был выбор структуры модельных ДНК-дуплексов, имитирующих различные типы ДНК, содержащей кластерные повреждения. Модельные повреждения вводились как в «верхнюю» цепь (1) модельной ДНК, так и в «нижнюю» – цепь 2. Расположение повреждения в цепи 1 ДНК-дуплекса было постоянным, позиция звена в цепи 2 обозначалась индексом от «-20» до «+8» (рис. 1).

Цепь 1

5' - AAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGG**CG**ACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCA

|||||

3' - TTCGGG**A**TACGGATGTCGTAGGT**CCC**GTG**CC**AGGCTCCTACTGCTACTCGCGT

Цепь 2

-20 -10 -6 -3 0 +4+6+8

Рис. 1. Схема, описывающая расположение повреждений в модельных ДНК, содержащих кластерные повреждения. Жирным шрифтом обозначены позиции, по которым в ДНК вводились повреждения: в цепь 1 – повреждения Fab(5)-dC, nAnt или nFlu, в цепь 2 – nFlu или DEG.

В качестве модельных повреждений использовали модифицированные нуклеотиды, несущие фотоактивируемые остатки – Fab(5)-dCMP, Fab(g)-dCMP и Fap-dCMP, и ненуклеотидные вставки nAnt и nFlu,. Вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (DEG) была выбрана для замены AP-сайта в модельных ДНК, чтобы снизить уровень деградации ДНК ферментом APE1, содержащимся в клеточных экстрактах. Структуры модифицированных звеньев и их названия приведены на рис. 2.

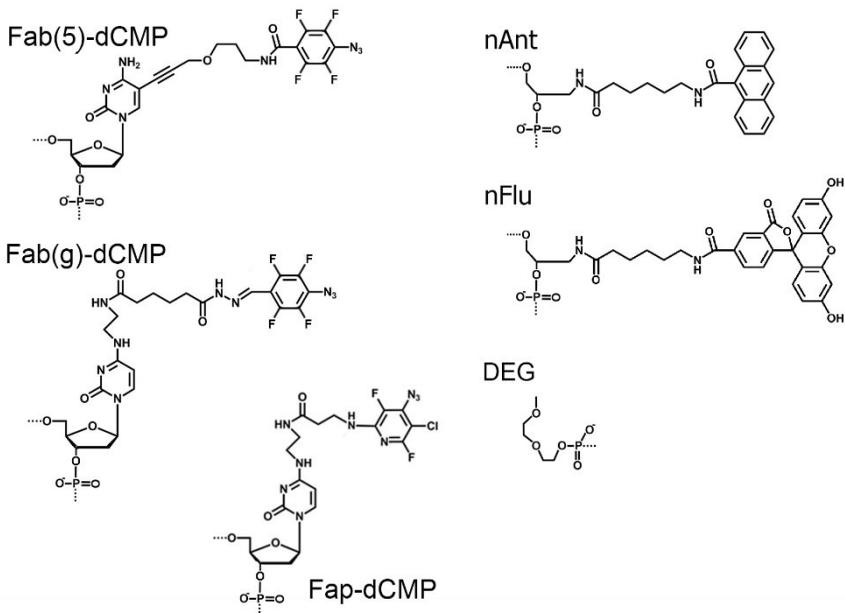


Рис. 2. Структуры модельных повреждений ДНК, использованных в работе. Fab(5)-dCMP – 5-[3-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензамидо)пропоксипроп-1-инил]-2'-дезоксцитидин 3' фосфат; Fab(g)-dCMP – экзо-N-[(4-азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонил)-бутилкарбамоил]-2'-дезоксцитидин 3' фосфат; Fap-dCMP – экзо-N-[2-[N-(4-азидо-2,5-дифторо-3-хлорпиридин-6-ил)-3-амино-пропионил]амино-этил]-2'-дезоксцитидин 3' фосфат; nAnt – ненуклеотидный фрагмент модифицированной цепи ДНК, содержащий N-[6-(9-антраценкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nFlu – ненуклеотидный фрагмент модифицированной цепи ДНК, содержащий (N-[6-(дипivaloил-5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-O1-(4,4'-диметокситритил)-O2-[(диизо-пропил-амино)(2-цианоэтоксифосфино)]-3-амино-1,2-пропандиол); DEG – вставка на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля.

2. ДНК, содержащие объемные повреждения в обоих цепях, как субстраты системы NER.

2.1. Оценка сродства комплекса белков XPC (англ. “xeroderma pigmentosum type C”) и RAD23B к ДНК-дуплексам, содержащим объемные повреждения в обоих цепях.

Сродство сенсорного комплекса XPC-RAD23B к 54-звенным ДНК-дуплексам, содержащим модельные повреждения Fab(5)-dC и nFlu или nAnt и nFlu (рис. 1), определено методом торможения ДНК в геле. Полученные

значения полумаксимальных эффективных концентраций (EC50) – концентраций фактора XPC-RAD23B, при которых достигается половина от максимального насыщения его комплексов с модельными ДНК, содержащими объемные повреждения в обеих цепях, приведены в таблице 1. Эти величины определяют сродство фактора XPC-RAD23B к ДНК.

Таблица 1. Значения EC50 для связывания фактора XPC-RAD23B с ДНК-дуплексами, содержащими объемные повреждениями в обеих цепях.

Обозначение ДНК-дуплекса	Значения EC50 для комплексов белка XPC с ДНК, нМ (метод торможения ДНК в геле)
Fab(5)-dC/um	30.1 ± 1.6
Fab(5)-dC/nFlu-20	32.7 ± 3.4
Fab(5)-dC/nFlu-10	34.6 ± 6.2
Fab(5)-dC/nFlu-3	26.6 ± 0.4
Fab(5)-dC/nFlu ₀	25.0 ± 0.8
Fab(5)-dC/nFlu+4	25.6 ± 2.1
Fab(5)-dC/nFlu+8	21.3 ± 2.7
nAnt/um	24.3 ± 2.5
nAnt/nFlu-20	14.4 ± 3.7
nAnt/nFlu-10	14.0 ± 2.1
nAnt/nFlu ₀	13.3 ± 2.0
nAnt/nFlu+8	19.8 ± 2.3
ДНК um	44.7 ± 1.9

Мы показали, что фактор XPC-RAD23B проявляет более высокое сродство к ДНК, содержащим кластерное повреждение, по сравнению с ДНК, несущими одиночное объемное повреждение (в 1.1-1.4 раза для ряда Fab(5)-dC-содержащих ДНК, повреждения в которых располагались в пределах 4 п.о., и в 1.2-1.8 раз для ряда nAnt-содержащих ДНК). Наблюдаемое предпочтение фактора XPC-RAD23B в связывании ДНК-дуплексов, содержащих вставку nFlu в составе кластерного повреждения, может обеспечиваться наличием в их структуре участков с повышенной дестабилизацией двухцепочечной структуры, возникающих в результате взаимодействия флуоресцентильной группы nFlu с окружающими участками ДНК.

2.2. Фотоаффинная модификация гетеродимера XPC-RAD23B с использованием ДНК-зондов, содержащих кластерное повреждение.

Для выявления структурных особенностей взаимодействия фактора XPC-RAD23B с ДНК, содержащими кластерные повреждения, были проведены эксперименты по аффинной модификации этого белкового комплекса с использованием фотоактивируемых ДНК-зондов (54 п.о.), различающиеся расположением повреждений: ДНК Fab(5)-dC/um, Fab(5)-dC/nFlu₃ и Fab(5)-dC/nFlu₄. ДНК-зонды образовывали аддукты с 125-кДа субъединицей гетеродимера – XPC, но не с 58-кДа белком RAD23B (рис. 3А). Это подтверждает то, что субъединица RAD23B сенсорного комплекса NER не взаимодействует напрямую с поврежденным участком ДНК.

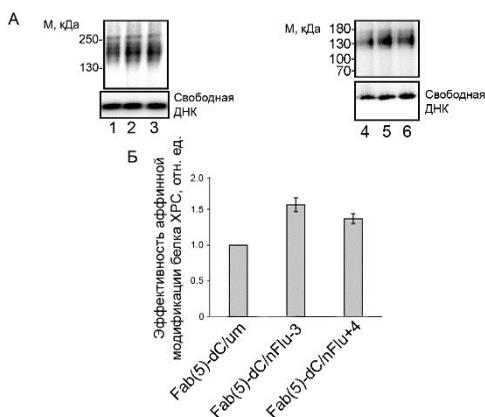


Рис. 3. (А). Радиоавтографы ПААГ после разделения продуктов фотоаффинной модификации белкового комплекса XPC-RAD23B ДНК-зондами. Реакционные смеси, содержащие 80 нМ фактор XPC-RAD23B и 15 нМ ДНК в буфере для фотоаффинной модификации (25 мМ Трис-НСl рН 7.8, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ NaCl, 0.127 мМ β-меркаптоэтанол), инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и затем облучали УФ-светом с длиной волны 312 нм в течение 10 мин при интенсивности 1.5 Дж/(см²*мин). Часть образцов (А, правая панель), обрабатывали бензоназой (30 мин, 37°C). (Б). Зависимость относительной эффективности аффинной модификации белка XPC от типа используемого ДНК-зонда (при отсутствии бензоназной обработки). За единицу принята эффективность модификации белка XPC с использованием ДНК Fab(5)-dC/um.

Эффективность модификации субъединицы XPC была примерно в 1.5 раза выше при использовании ДНК-зондов, содержащих в комплементарной цепи ДНК-дуплекса вставку nFlu, сдвинутую как в направлении 5'-, так и 3'-конца относительно Fab(5)-dC (рис. 3Б). Изменения структуры ДНК-дуплекса, вызванные появлением в комплементарной цепи вставки nFlu, могут приводить к возникновению флукуирующих участков

дестабилизации ДНК вблизи модифицированного нуклеотида, содержащего фотоактивируемую группу. Результаты фотоаффинной модификации фактора XPC-RAD23B ДНК-зондами, содержащими объемные повреждения в обеих цепях, согласуются с результатами экспериментов по определению сродства этого белка к ДНК, несущим кластерные повреждения (раздел 2.1, таблица 1).

2.3. Оценка эффективности эксцизии повреждения из ДНК системой NER в присутствии в комплементарной цепи второго объемного повреждения.

Следующей задачей была оценка эффективности эксцизии повреждений из цепи 1 137-звенных ДНК-дуплексов, содержащих объемные аддукты Fab(5)-dC и nFlu или nAnt и nFlu в обеих цепях, белками системы NER (рис. 1). Для определения эффективности эксцизии поврежденных фрагментов ДНК системой NER использовали метод постэксцизионного мечения, описанный в работе (Evdokimov A. N., et al., 2013). Эффективность эксцизии Fab(5)-dC или nAnt из ДНК, содержащих два повреждения, расположенных на расстоянии до 4 нт (ДНК Fab(5)-dC/nFlu_{3,0,+4} и nAnt/nFlu_{3,0,+4}) составляла менее 5-10% от эффективности эксцизии из ДНК Fab(5)-dC/um и ДНК nAnt/um соответственно (рис. 4). При расположении в более удаленных позициях цепи 2 (-20, -10 или +8) повреждение nFlu по-разному влияло на эффективность эксцизии Fab(5)-dC и nAnt системой NER. Эффективность эксцизии nAnt-содержащих фрагментов из ДНК, несущих два повреждения, разделенных 8-20 п.о., не превышала 20% от эффективности их эксцизии из ДНК nAnt/um системой NER (рис. 4).

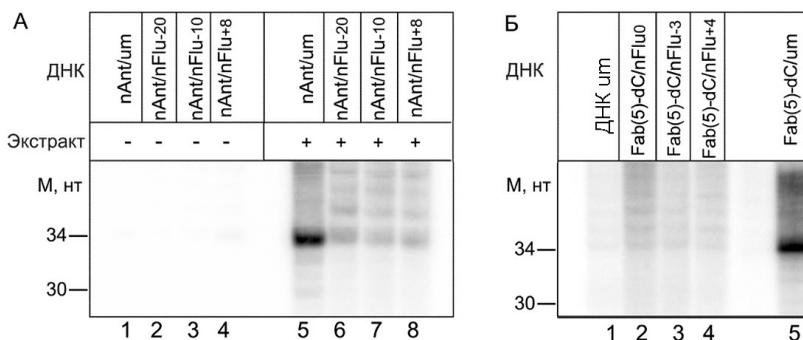


Рис. 4. Радиоавтографы ПААГ (10%) после разделения продуктов реакции NER. 20 нМ nAnt- (А) или Fab(5)-dC-содержащая (Б) ДНК (137 п.о.), 3.5 мг/мл белков экстракта печени кролика, 500 нМ специфическая матрица в 1×NER-буфере (45 мин при 30°C). Длины ОДН, использованных в качестве маркеров, указаны слева.

Эффективность эксцизии Fab(5)-dC значительно повышалась при увеличении расстояния между объемными повреждениями ДНК. Для ДНК-дуплексов, содержащих Fab(5)-dC в составе кластеров, наблюдалась обратная корреляция между эффективностью эксцизии этого повреждения системой NER и сродством фактора XPC к соответствующим 54-звенным ДНК (рис. 5).

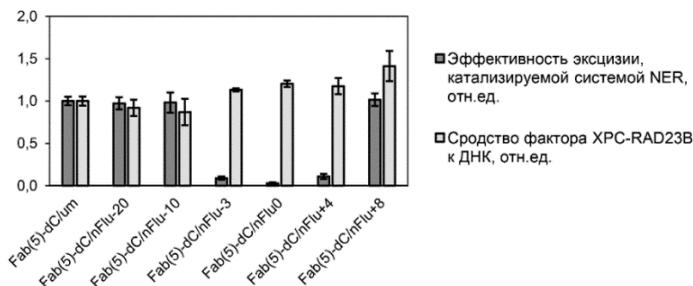


Рис. 5. Сравнение эффективности эксцизии повреждения, катализируемой системой NER, и сродства фактора XPC-RAD23B к ДНК-дуплексам, содержащим кластеры повреждений. За единицу принят уровень эксцизии Fab(5)-dC из 137-звенной ДНК Fab(5)-dC/um после ее инкубации с белками экстракта печени кролика, а также уровень сродства (значение, обратно пропорциональное величине EC50) фактора XPC-RAD23B к соответствующей 54-звенной ДНК.

Влияние объемных повреждений ДНК, расположенных в составе кластера, на термостабильность 16-звенных ДНК Fab(5)-dC/nFlu_{-3,0,+4} и nAnt/nFlu_{-3,0,+4} было оценено методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Введение вставки nFlu в комплементарную цепь Fab(5)-dC-содержащего ДНК-дуплекса снижало его температуру плавления на 10.2-13.3°C. Два ненуклеотидных модельных повреждения ДНК – nAnt и nFlu, образующие кластерное повреждение, индуцировали более значительную дестабилизацию структуры ДНК-дуплекса по сравнению с Fab(5)-dC и nFlu: стабильные 16-звенные ДНК-дуплексы nAnt/nFlu_{-3,0,+4} в условиях эксперимента не формировались (Lukuanchikova N. V., et al., 2018). Таким образом, объемные повреждения, присутствующие в обеих цепях ДНК и расположенные в пределах одного витка спирали ДНК, создают препятствия для работы системы NER, причем величина интервала, в пределах которого наблюдается подавление эксцизии, зависит от структуры удаляемого объемного повреждения ДНК (рис. 4, 5). Повышенное сродство фактора XPC к ДНК-дуплексам, содержащим два объемных повреждения (таблица 1), и свойственная им пониженная термостабильность указывают на наличие в ДНК Fab(5)-dC/nFlu и nAnt/nFlu дестабилизированных участков, присутствие которых может приводить к неправильной ориентации фактора XPC на ДНК-

субстрате. В результате комплексы белка ХРС с ДНК, содержащими кластерные повреждения, оказываются непродуктивными и не приводят к эксцизии объемного повреждения ДНК системой NER.

3. ДНК, содержащие объемную вставку и аналог AP-сайта, как субстраты системы NER.

3.1. Оценка сродства фактора ХРС-RAD23В к ДНК, содержащим объемную вставку и аналог AP-сайта.

Величины сродства фактора ХРС-RAD23В к модельным ДНК, содержащим кластерное повреждение, состоящее из объемной нунуклеотидной вставки nFlu и аналога AP-сайта – DEG, определили методом измерения анизотропии флуоресценции. Появление в немодифицированном ДНК-дуплексе одиночного повреждения повышало сродство к нему фактора ХРС-RAD23В: примерно в 2.3 раза для ДНК nFlu/um и в 1.4 раза – для ДНК DEG/um (таблица 2).

Таблица 2. Значения EC50 для комплексов фактора ХРС-RAD23В с ДНК, содержащими объемное нунуклеотидное повреждение и аналог AP-сайта.

Обозначение ДНК-дуплекса (5'-FAM меченый)	Значения EC50 для комплексов белка ХРС с ДНК, нМ (по измерению анизотропии флуоресценции)
nFlu/um	3.2±0.3
nFlu/DEG-20	3.1±0.3
nFlu/DEG-10	3.0±0.4
nFlu/DEG-6	2.7±0.4
nFlu/DEG-3	2.2±0.3
nFlu/DEG ₀	1.7±0.2
nFlu/DEG+4	2.0±0.2
nFlu/DEG+6	2.1±0.2
nFlu/DEG+8	3.0±0.3
ДНК um	7.4±0.8
DEG/um	4.6±0.4

Сродство фактора ХРС-RAD23В к модельным ДНК, содержащим повреждения в составе кластера, варьировало в зависимости от их взаимного расположения: увеличение сродства фактора ХРС-RAD23В было более значительным при расположении вставки DEG напротив nFlu (в 1.9 раз выше, чем к ДНК nFlu/um), или при смещении DEG на 4-6 нт в направлении 5'-конца цепи 2 ДНК-дуплекса. По мере отдаления позиции

DEG от позиции nFlu средство фактора XPC к ДНК nFlu/DEG приближалось к значению для ДНК nFlu/um.

3.2. Оценка эффективности гидролиза AP-сайта, образующего кластерное повреждение ДНК с объемной вставкой nFlu, ферментом APE1.

Остаток фосфодиэфира диэтиленгликоля, DEG, является аналогом AP-сайта – повреждения ДНК, удаляемого системой BER. В контексте данной работы представляла интерес сравнительная оценка эффективности гидролиза AP-сайта ферментом APE1 при наличии в положениях -3, 0 или +4 комплементарной цепи ДНК-дуплекса объемного повреждения nFlu. Значительных различий в эффективности расщепления цепей ДНК, содержащих AP-сайт, ферментом APE1 между модельными ДНК не наблюдалось (рис. 6): при 5 минутах инкубации с ферментом APE1 расщепленным оказывалось от 41% (ДНК AP/nFlu₊₄) до 70% (ДНК AP/nFlu₀) цепей ДНК, содержащих AP-сайт. Таким образом, в изучаемых нами кластерных структурах процесс BER может быть инициирован и AP-сайт – конвертирован в одноцепочечный разрыв ДНК.

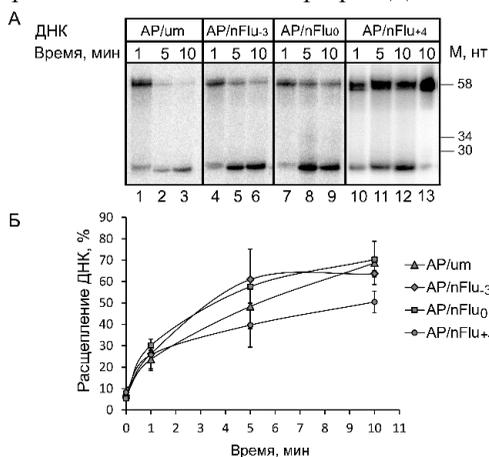


Рис. 6. (А). Радиоавтографы ПААГ (20%) после разделения продуктов расщепления ДНК ферментом APE1. Реакционные смеси, содержащие 10 нМ ДНК, 2 нМ APE1 и буфер (50 мМ Трис-НСl рН 7.5, 5 мМ MgCl₂, 40 мМ NaCl, 1 мМ DTT и 0.25 мг/мл БСА), инкубировали в течение 1-10 мин при температуре 37°C. Смесь, не содержащую APE1 (дор. 13), выдерживали в течение 10 мин. (Б). Зависимость эффективности катализируемого ферментом APE1 расщепления цепей ДНК, содержащих AP-сайт, от расположения вставки nFlu в ДНК-дуплексе.

3.3. Эكсцизия объемного повреждения системой NER при наличии в комплементарной цепи ДНК-дуплекса аналога AP-сайта.

Целью последующих экспериментов было определить, как присутствие в противоположной цепи ДНК-дуплекса аналога AP-сайта влияет на эффективность эксцизии объемного повреждения nFlu белками системы NER. Показано, что в присутствии вставки на основе DEG в позициях -3, 0, +4 комплементарной цепи ДНК-дуплекса эксцизия повреждения nFlu системой NER полностью подавлена, а в позициях +6 и -6 – снижена на 50-60% по сравнению с уровнем эксцизии nFlu из ДНК nFlu/um (рис. 7).

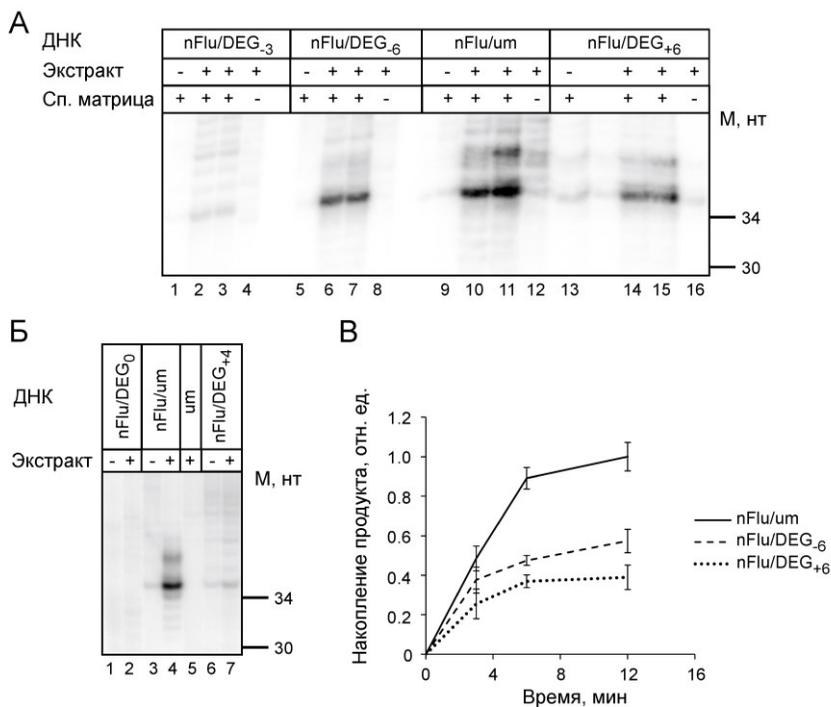


Рис. 7. (А), (Б). Радиоавтографы ПААГ (10%) после разделения продуктов реакции NER. Реакционные смеси, содержащие 20 нМ ДНК nFlu/DEG (137 п.о.), 1.2 мг/мл белков экстракта клеток CHO, 500 нМ матрицу в 1×NER-буфере инкубировали в течение 6 или 12 мин (Б) при 30°C. Длины ОДН, использованных в качестве маркеров, указаны справа. (В). Относительная эффективность эксцизии повреждения nFlu из ДНК белками системы NER; при расчетах эффективность эксцизии nFlu из ДНК nFlu/um была принята за единицу.

Сродство фактора XPC к ряду ДНК, содержащих близко расположенные (позиции DEG-6...+6) повреждения nFlu и DEG в противоположных цепях ДНК-дуплекса было в 1.2-1.9 раз выше по сравнению с ДНК nFlu/um (раздел 3.1, таблица 2). Таким образом, для проанализированных ДНК, содержащих повреждения nFlu и DEG, разделенные менее 6 п.о., большая стабильность комплексов белка XPC с модельными ДНК может быть ассоциирована с менее эффективной эксцизией повреждения nFlu системой NER (рис. 8).

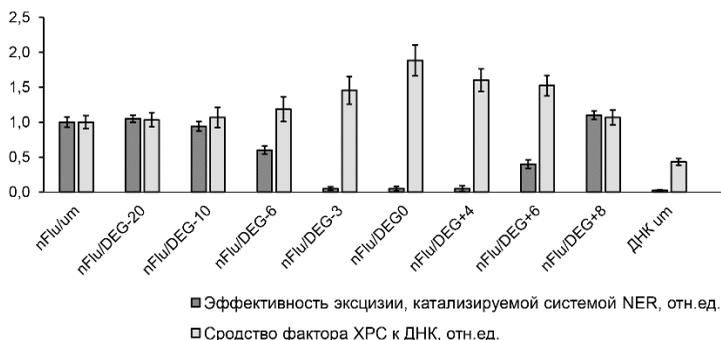


Рис. 8. Сравнение эффективности эксцизии повреждений ДНК, катализируемой системой NER, и сродства фактора XPC к ДНК, содержащим кластерные повреждения. За единицу принята эффективность эксцизии nFlu из ДНК nFlu/um (137 п.о.) при ее инкубации с белками клеточного экстракта СНО в течение 12 мин, а также уровень сродства (значение, обратно пропорциональное величине EC50) фактора XPC к соответствующей 54-звенной ДНК.

Для объяснения причин устойчивости ДНК, содержащих nFlu в составе кластерных повреждений, к репарации по механизму NER мы обратились к данным, полученным с применением моделирования их молекулярной динамики. На основании экспериментальных данных (рис. 8) были выбраны 54-звенные ДНК nFlu/um, nFlu/DEG₀ и nFlu/DEG₊₆, эффективность эксцизии повреждения nFlu из которых системой NER значительно различается. Согласно результатам моделирования, в ДНК nFlu/DEG₀ соседние с повреждением nFlu пары оснований подавляющую часть времени остаются в эффективном стэкинг-взаимодействии, что приводит к «схлопнутому» состоянию двойной спирали в районе повреждения ДНК. Кроме того, в ДНК nFlu/DEG₀ фрагмент флуоресцеина (nFlu) в течение ~10% времени траектории взаимодействует с DEG на противоположной стороне спирали ДНК. Такое расположение повреждений ДНК может стерически затруднять связывание фактора XPC поврежденным участком. Также в ДНК nFlu/DEG₀ присутствуют участки с

высокой подвижностью цепей, расположенных вне сайта введения nFlu (Naumenko N. V., et al., 2021). Эти области могут служить мишенями для непродуктивного связывания фактора ХРС. Для ДНК nFlu/DEG₊₆ характерна более низкая конформационная подвижность по сравнению с другими исследованными ДНК-дуплексами, что может указывать на присутствие области с повышенной стабильностью и жесткостью структуры. Выявленные структурные особенности могут препятствовать раскрытию ДНК фактором ХРС и снижать вероятность образования продуктивных комплексов ХРС-ДНК, и, как следствие, эффективность эксцизии nFlu системой NER. На основании выполненного исследования можно полагать, что подавленная эксцизия объемных повреждений из состава кластеров с AP-сайтами обусловлена затруднениями, возникающими на этапе формирования комплексов ХРС-ДНК.

На примере кластерных повреждений ДНК, состоящих из объемного аддукта nFlu и аналога AP-сайта, расположенных в пределах 4 п.о., показано, что AP-сайт расщепляется ферментом APE1 достаточно эффективно (рис. 6), в то время как эксцизия объемного повреждения белками системы NER из таких структур затруднена (рис. 7). Последовательная репарация повреждений ДНК может иметь адаптивное значение, поскольку позволяет избежать одновременной инициации процессов репарации по путям NER и BER, и таким образом, снижает риск образования ДЦР в клеточной ДНК.

4. Исследование взаимодействия комплекса субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH с ДНК, несущими модельные повреждения.

4.1. Сравнительная оценка эффективности эксцизии фотоактивируемых модельных повреждений ДНК системой NER.

Для того, чтобы исследовать взаимодействие комплекса субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH, осуществляющего верификацию повреждений ДНК в процессе NER, с фотоактивируемыми аналогами повреждений, требовался ряд модельных повреждений с известной эффективностью эксцизии из ДНК системой NER. В данной работе впервые оценена эффективность эксцизии модифицированных пиримидиновых нуклеотидов, несущих объемные фотоактивируемые фрагменты, – Fab(5)-dC, Fab(g)-dC и Fap-dU, системой NER из линейных 137-звенных двухцепочечных ДНК.

Мы показали, что модельное повреждение Fab(5)-dC подвергается эксцизии белками системы NER из ДНК с высокой эффективностью (рис. 9), близкой к эффективности эксцизии нуклеотидных синтетических объемных повреждений nAnt и nFlu (Evdokimov A. N., et al., 2013), использованных в качестве положительного контроля. Эффективность

эксцизии повреждений Fab(g)-dC и Far-dU из ДНК была ниже на 40-60% ниже по сравнению с Fab(5)-dC.

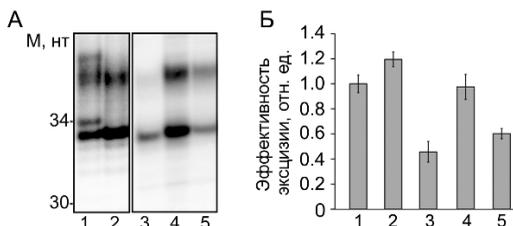


Рис. 9. (А). Радиоавтограф ПААГ (10%) после разделения продуктов реакции NER. 20 нМ 137-звенную модельную ДНК Fab(5)-dC/um (дор. 1), nAnt/um (дор. 2), Far-dU/um (дор. 3), nFlu/um (дор. 4) или Fab(g)-dC/um (дор. 5) инкубировали с 2.3 мг/мл белками экстракта клеток CHO и 500 нМ специфической матрицей в 1×NER-буфере (45 мин при 30°C). Длина ОДН, использованных в качестве маркеров, указана слева. (Б). Сравнение эффективности эксцизии поврежденных фрагментов ДНК системой NER. Эффективность эксцизии Fab(5)-dC из ДНК Fab(5)-dC/um принята за единицу.

4.2. Исследование эффективности комплексообразования субъединиц XPD и p44 фактора TFIIH с ДНК, содержащими модельные повреждения.

Целью следующей серии экспериментов было исследование взаимодействия рекомбинантных белков гриба *Chaetomium thermophilum*, субъединиц XPD и p44 фактора TFIIH, осуществляющего верификацию повреждений ДНК в процессе NER, с ДНК, содержащими модельные повреждения Fab(5)-dC, Fab(g)-dC и Far-dC. Между генами белка XPD гриба *Ct* и человека имеется высокая степень гомологии, при этом рекомбинантные белки *Ct* могут быть получены в количествах, необходимых для проведения различных биохимических исследований (Kuper J., et al., 2014). Эффективность эксцизии Fab(5)-dC, Fab(g)-dC и Far-dC – звеньев цитидина с объемными фотоактивируемыми группировками – из ДНК системой NER значительно различается: Fab(5)-dC подвергается эксцизии примерно на 40% более эффективно, чем Fab(g)-dC (рис. 9); Far-dC является нерепарируемым по механизму NER повреждением ДНК (Maltseva E. A., et al., 2007).

Методом торможения ДНК в геле мы показали, что сродство субъединицы XPD фактора TFIIH с к оц (одноцепочечным) ДНК значительно выше, чем к дц (двухцепочечным) ДНК. При 200 нМ концентрации белка XPD в реакционной смеси процент оц ДНК, входящей в состав комплексов с XPD, составлял около 45%, для дцДНК это значение составляло только 5-10%. Характеристики взаимодействия димера XPD-p44 с 49-звенными модифицированными оц ДНК, несущими на 3'-конце

репортерную группу Су3, были определены посредством измерения анизотропии флуоресценции. Средство комплекса XPD-p44 увеличивалось в ряду: ДНК um < ДНК Fap-dC < ДНК Fab(g)-dC << ДНК Fab(5)-dC; рассчитанные значения EC50 для комплексов XPD-p44 с ДНК приведены в таблице 3.

Таблица 3. Характеристики ДНК, содержащих фотоактивируемые модельные повреждения, как субстратов системы NER.

Повреждение ДНК	Fab(5)-dC	Fab(g)-dC	Fap-dC	um
Эффективность эксцизии, отн. ед.	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	~0.1 (Maltseva E. A., et al., 2007).	~0
EC50 (XPD-p44 с оц ДНК), нМ	109 ± 15	265 ± 34	316 ± 38	321 ± 46
Увеличение уровня фотоаффинной модификации белка XPD фс ДНК-зондом при добавлении АТФ (при отсутствии белка p44)	в 3.2 ± 1.8 раз	в 2.2 ± 0.4 раз	в 1.1 ± 0.4 раз	–

Таким образом, эффективность взаимодействия комплекса субъединиц XPD-p44 фактора ТФИПН с ДНК, содержащими фотоактивируемые модельные повреждения, коррелировала с эффективностью эксцизии этих повреждений из ДНК по механизму NER.

4.3. Исследование взаимодействия субъединиц XPD и p44 фактора ТФИПН с поврежденными ДНК с методом фотоаффинной модификации.

С применением метода фотоаффинной модификации проведено сравнение взаимодействия субъединиц XPD и p44 фактора ТФИПН с фс ДНК-зондами (ДНК с удлиненными оц 5'-концами одной из цепей), содержащими фотоактивируемые модельные повреждения Fab(5)-dC, Fab(g)-dC или Fap-dC. При отсутствии белка p44 добавление АТФ повышало уровень образования аддуктов геликазы XPD: с ДНК фс Fab(5)-dC/um – приблизительно в 3.5 раза, с ДНК фс Fab(g)-dC/um – в 2.1 раз, в случае фс Fap-dC/um уровень модификации белка не повышался (рис. 10А – левая панель: дор. 2,3,8,9; правая панель – дор. 2,3; Б). Мы показали, что комплекс субъединиц XPD-p44 фактора ТФИПН гриба *St* различает объемные повреждения ДНК. Белковый комплекс XPD-p44 проявляет повышенное средство к оц ДНК, содержащей фотоактивируемое повреждение Fab(5)-dC (таблица 3); кроме того, наблюдается значительное увеличение интенсивности модификации белка XPD с использованием Fab(5)-dC-

ВЫВОДЫ

1. Эффективность эксцизии объемных повреждений ДНК системой эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) в случае их расположения в составе группы повреждений, находящихся на противоположных цепях ДНК в пределах одного-двух витков спирали (двухцепочечного кластера), существенно снижена. Степень снижения эксцизии зависит от химической структуры повреждений, образующих двухцепочечный кластер, и расстояния между ними в молекуле ДНК.
2. Повышенное сродство фактора XPC-RAD23B, инициирующего процесс общегеномной NER, к ДНК, содержащим объемные повреждения в составе двухцепочечного кластера, коррелирует со снижением эффективности их эксцизии системой NER. Устойчивость объемного ненуклеотидного повреждения с флуоресцентильным остатком (nFlu), расположенного в составе кластера с вставкой на основе фосфодиэфира диэтиленгликоля (аналогом апуринового/апиримидинового-сайта), к эксцизии по механизму NER обусловлена специфической топологией поврежденного участка ДНК, которая препятствует ее продуктивному распознаванию фактором XPC-RAD23B.
3. Комплекс рекомбинантных белков гриба *Chaetomium thermophilum* – субъединиц XPD-p44 фактора TFIIH, участвующего в процессе NER на стадии верификации повреждения, селективно взаимодействует с объемными повреждениями в ДНК. Эффективность взаимодействия комплекса XPD-p44 с ДНК, содержащими модельные объемные повреждения – звенья цитидина с фторазидобензоильными или фторхлоразидопиридинильными группировками, коррелирует с эффективностью их эксцизии системой NER.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лукьянчикова, Н. В., Петрусева, И. О., Евдокимов, А. Н., Сильников, В. Н., Лаврик, О. И. ДНК с повреждениями в обеих цепях как аффинные зонды и субстраты системы ЭРН // Биохимия. – 2016. – Т. 81. – С. 386-400.
2. Лукьянчикова, Н. В., Петрусева, И. О., Евдокимов, А. Н., Сафронов, И. В., Королева, Л. С., Лаврик, О. И. ДНК с объемными повреждениями в обеих цепях молекулы как субстраты системы эксцизионной репарации нуклеотидов // Молекулярная биология. – 2018. – Т. 52. – С. 277-288.
3. Petrusева I., Naumenko N., Kuper J., Anarbaev R., Kappenberger J., Kisker C., Lavrik O. The interaction efficiency of XPD-p44 with bulky DNA damages depends on the structure of the damage // – Front. Cell Dev. Biol. – 2021. –V. 9. – 617160.
4. Naumenko N., Petrusева I., Lomzov A., Lavrik O. Recognition and removal of clustered DNA damages via NER // – DNA repair. – 2021. – V. 108. – 103225.