

На правах рукописи

ЮДКИНА АННА ВЛАДИМИРОВНА

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ С БЛОКИРУЮЩИМИ
ПОВРЕЖДЕНИЯМИ ДНК РАЗНЫХ КЛАССОВ**

03.01.04 — биохимия

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск — 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Научный руководитель:

Жарков Дмитрий Олегович, д. б. н., доцент, чл.–корр. РАН

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Официальные оппоненты:

Трифонов Владимир Александрович, д. б. н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, заведующий лабораторией.

Кульбачинский Андрей Владимирович, д. б. н., проф. РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заведующий лабораторией.

Белоусова Екатерина Анатольевна, к. х. н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, старший научный сотрудник.

Защита состоится «18» сентября 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева 8.

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

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «__» августа 2020 г.

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



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Под воздействием эндогенных и экзогенных генотоксичных агентов в ДНК образуется широкий спектр повреждений, многие из которых относятся к блокирующим — препятствующим синтезу ДНК и приводящим к гибели клетки. Блокирующие свойства часто проявляют крупные аддукты и сшивки, а также во многих случаях апурин-апирииминовые (АП-) сайты. Образование блокирующих повреждений лежит в основе многих способов химио- и радиотерапии онкологических заболеваний, поэтому понимание механизмов действия этого типа повреждений на клетку имеет не только фундаментальный, но и практический интерес. Хотя влияние блокирующих повреждений ДНК на клетку привлекает большое внимание, разнородный характер таких повреждений затрудняет выделение общих черт их взаимодействия с репликативным аппаратом. В области изучения ДНК-белковых сшивок (ДБС) главным препятствием остается отсутствие хороших экспериментальных моделей и гетерогенность повреждений, образуемых под влиянием генотоксичных факторов, вызывающих сшивки. Для аддуктов и модифицированных нуклеотидов хорошо изучены на молекулярном уровне механизмы их взаимодействия с ДНК-полимеразами только для нескольких удобных экспериментальных моделей, а другие повреждения этих классов, несмотря на их возможные уникальные особенности, обычно рассматриваются как в принципе аналогичные исследованным моделям. Таким образом, в настоящее время любая информация о механизмах влияния блокирующих повреждений на синтез ДНК важна для дальнейшего понимания причин чувствительности клеток к генотоксичному стрессу, а также может быть полезна для разработки новых противоопухолевых препаратов.

Цель настоящей работы заключается в изучении взаимодействия ДНК-полимераз с препятствиями разной природы, потенциально блокирующими их перемещение по ДНК. Эта цель подразумевает решение нескольких **задач**, различающихся в зависимости от природы блокирующих структур:

- 1) изучить эффективность элонгации праймера ДНК-полимеразами разных семейств при наличии в матричной либо вытесняемой цепи ДНК-белковой сшивки;
- 2) изучить способность белков, активно передвигающихся по ДНК или пассивно диффундирующих по контуру ДНК, преодолевать препятствие в виде прочно нековалентно связанного белка;
- 3) установить возможность образования аддуктов ДНК с крупными неорганическими комплексами — полиоксометаллатами платины и влияние такой модификации на действие ДНК-полимераз;
- 4) изучить влияние аддуктов АП-сайта с метоксиамином, ингибирующих эксцизионную репарацию оснований ДНК, на эффективность и специфичность включения dNMP ДНК-полимеразами разных семейств.

Научная новизна работы. В рамках исследования разработан высокоэффективный способ получения химически детерминированных модельных ДНК-белковых сшивок. Впервые картированы места останковки ДНК-полимераз семейств А, В, Х и Y в области ДНК-белковых сшивок. Установлена способность ДНК-полимераз вытеснять прочно связанные белки (на примере белков OGG1, NEIL1, Cas9) из комплекса с ДНК при элонгации и при пассивной диффузии. Впервые обнаружена способность полиоксометаллатов платины образовывать ковалентные аддукты с ДНК и подавление активности ДНК-полимераз в присутствии полиоксометаллатов платины. Впервые проведено сравнение включения dNMP напротив альдегидного АП-сайта и АП-сайта, модифицированного метоксиамином, и показано сохранение специфичности для ДНК-полимераз семейств А, В, Х и Y.

Теоретическая и практическая значимость работы. По сравнению с другими повреждениями, ДБС представляют собой наименее изученный тип. В работе сформулированы общие структурные принципы взаимодействия ДНК-полимераз и ДБС с деформацией полипептидных глобул, которые в принципе применимы и к другим белкам, передвигающимся по ДНК. Аналогичную модель можно приложить и к случаю столкновения белков, нековалентно связанных с ДНК. Что касается низкомолекулярных агентов, повреждающих ДНК, данная работа вводит в список повреждающих ДНК комплексов металлов еще один класс — полиоксометаллаты, уникальные свойства лигандов которых заметно отличают их взаимодействие с клеткой от традиционных комплексов платины. Другой модифицирующий ДНК агент — метоксиамин (МОХ) — уже проходит клинические испытания как потенциальный сенситизатор опухолевых клеток к повреждению ДНК, но до настоящего исследования оставались неизученными многие аспекты его действия, в том числе последствия взаимодействия его аддуктов с ДНК-полимеразами. Актуальность работы в значительной мере обусловлена и тем, что ее результаты могут послужить отправными точками для множества исследований взаимодействия клеточных систем с блокирующими повреждениями ДНК. В самом деле, наличие хорошо охарактеризованной модели ДНК-белковых сшивок поможет впоследствии установить и уточнить механизмы их репарации, клеточного ответа на них, оценить их вклад в цитотоксичность при химио- и радиотерапии онкологических заболеваний. Развитие части проекта, связанной с повреждающими ДНК агентами — комплексами платины и метоксиамином — дает возможность разработки противоопухолевых средств и средств для лечения инфекционных заболеваний.

Методология и методы исследования. В работе широко использовались стандартные биохимические методы характеристики биохимических свойств белков, методы ферментативной кинетики, методы геной инженерии, продукции и выделения рекомбинантных белков. Также применялись компьютерные методы исследования биополимеров.

Положения, выносимые на защиту

1. ДНК-полимеразы семейств А, В, X и Y не способны пройти ДНК-белковую сшивку, находящуюся в ДНК в матричной цепи и не способны вытеснить впереди лежащую цепь, содержащую ДНК-белковую сшивку. ДНК-полимеразы варьируют по своей способности вести синтез до точки сшивки, причем некоторые из них способны достигать непосредственно точки сшивки, что невозможно без значительного искажения структуры полимеразы или сшитого с ДНК белка.

2. Как белки, активно передвигающиеся по ДНК с затратой энергии, так и белки, пассивно диффундирующие по контуру ДНК, способны вытеснять другие нековалентно связанные белки из комплекса с ДНК, причем эффективность этого процесса зависит от сродства вытесняемого белка к ДНК.

3. Комплексные соединения платины с полиоксониобатными лигандами образуют аддукты с ДНК, что подавляет активность ДНК-полимераз.

4. Присоединение метоксиамин к АП-сайту в ДНК не меняет специфичности ДНК-полимераз к включаемому dNMP по сравнению с немодифицированным АП-сайтом, но влияет на эффективность этой реакции.

Личный вклад соискателя. Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором. Масс-спектрометрический анализ осуществлялся на базе Объединенного Центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения работы представлены на 5 российских и международных конференциях: Всероссийский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), «EEMS 2015: 44th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society» (Прага, Чехия, 2015), «EEMS 2016: 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society» (Копенгаген, Дания, 2016), международная конференция «Химическая биология», посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016), «BGRS\SB'2016: 10th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology» (Новосибирск, 2016).

По материалам диссертации опубликовано 4 научных статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 139 страницах, содержит 51 рисунок и 8 таблиц. Библиография включает 365 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Настоящая работа представляет собой первое исследование, в котором сравнивается процесс остановки ДНК-полимераз, принадлежащих к разным структурным семействам, на блокирующих повреждениях разного размера и

разной химической структуры. Такое сравнение позволяет выделить ряд закономерностей в остановке синтеза ДНК и определить некоторые направления для дальнейших исследований.

В работе использовали ряд ДНК-полимераз, отличающихся по способности к ведению процессивного синтеза и к вытеснению запирающего праймера, принадлежащих к разным семействам: фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (KF exo^+), а также его вариант D424A, лишенный 3'→5'-экзонуклеазной активности (KF exo^-), ДНК-полимеразу I *Thermus aquaticus* (Taq) (семейство A), ДНК-полимеразы бактериофагов RB69 и T4, ДНК-полимеразу *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (семейство B), ДНК-полимеразы β и λ человека (POL β и POL λ , семейство X), ДНК-полимеразу κ человека (POL κ), ДНК-полимеразу Dpo4 *Sulfolobus solfataricus* (семейство Y).

1. Взаимодействие ДНК-полимераз с ДНК-белковыми сшивками

ДНК в живых клетках постоянно связана с широким набором разнообразных белков. Под влиянием некоторых генотоксичных агентов между ДНК и белком может возникнуть ковалентная связь. Наличие такого большого аддукта, как ДБС, несомненно должно сказываться на взаимодействии других белков с ДНК. В частности, можно ожидать, что наличие сшивки осложнит работу ДНК-полимераз. Взаимодействие ДНК-полимераз с повреждениями может происходить в ходе репликации, транслезионного синтеза или репарации. В каждом из этих процессов участвует несколько ДНК-полимераз, принадлежащих к разным структурным семействам.

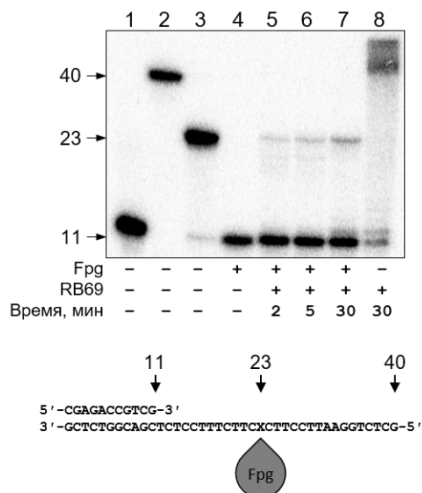
Для изучения активности ДНК-полимераз в присутствии ДБС были сконструированы субстраты, содержащие ДБС в запирающем праймере или в матричной цепи (как с запирающим праймером, так и без него). Для создания модельной химически детерминированной ДБС использовали способность бифункциональной ДНК-гликозилазы Fpg *E. coli* образовывать с ДНК в ходе реакции ковалентный интермедиат — основание Шиффа, который стабилизируется восстановлением NaBH_4 до третичного амина. Так как ДБС могут образовываться в клетке с множеством различных белков, ожидается, что механизм взаимодействия ДНК-полимераз с ДБС будет универсальным, не зависящим от природы конкретного белка, сшитого с ДНК.

В целом ДНК-полимеразы в присутствии субстратов, содержащих ДБС, эффективно вели элонгацию праймера на начальном этапе с дальнейшей остановкой синтеза за несколько нуклеотидов (в большинстве случаев за 3–5 н.) до точки сшивки (рис. 1). Однако ДНК-полимеразы семейства B на матрицах, содержащих ДБС в составе одноцепочечной ДНК, были способны вести синтез непосредственно до точки сшивки, несмотря на присутствие объемного белкового аддукта (рис. 1А).

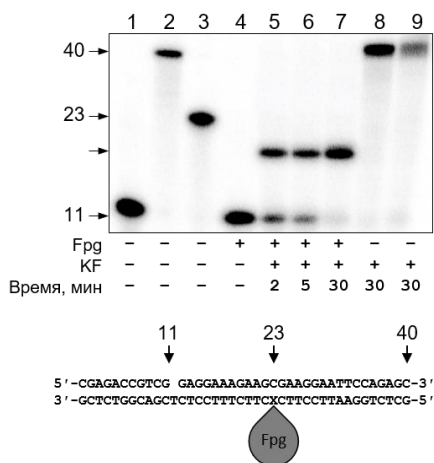
Ситуация, при которой ДБС расположена в вытесняемой цепи, представляет особый интерес, так как в данном случае транслезионного синтеза

не ожидается, и ДНК-полимераза потенциально способна пройти место повреждения. Однако полученные результаты показывают, что вытеснение цепи, несущей ДБС, проблематично даже для ДНК-полимераз, обладающих способностью к вытеснению впереди лежащей цепи (рис. 1В). В целом, наличие второй цепи в субстратах, содержащих ДБС, уменьшает способность ДНК-полимераз достигать сайта сшивки.

А



Б



В

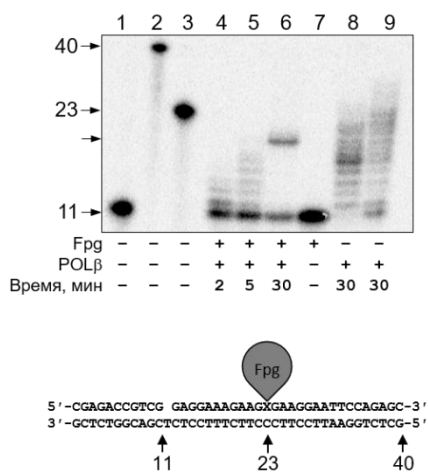


Рисунок 1. Радиоавтографы гелей после разделения продуктов элонгации праймера. Схемы субстратов приведены под радиоавтографами. А — ДНК-полимераза фага RB69, субстрат содержал ДБС в матричной цепи одноцепочечной ДНК. Б — ДНК-полимераза KF (exo⁻), субстрат содержал ДБС в матричной цепи двуцепочечной ДНК. В — ДНК-полимераза β , субстрат содержал ДБС в запирающем праймере. Во всех случаях стрелками отмечены маркеры подвижности длиной 11, 23 и 40 н. Дорожка 8 — элонгация неповрежденного субстрата праймер-матрица, Дорожка 9 — элонгация неповрежденного субстрата праймер-матрица-запирающий праймер.

Результаты по всем ДНК-полимеразам, исследованным в данной работе, сведены в табл. 1. ДНК-полимеразы, принадлежащие к разным семействам, показали определенную гетерогенность в наличии точек паузы синтеза ДНК и в способности доходить до места сшивки. На основании известных структур ДНК-полимераз и Fpg можно оценить возможные взаимодействия этих белков на исследуемых субстратах. Вскоре после начала синтеза ДНК-полимеразы сталкиваются с препятствием в виде пришитого белка. При этом полученная точка остановки синтеза (в частности для POL β — за 4–5 н. до точки сшивки), соответствует 2–3 н. перекрыванию между футпринтами POL β и Fpg.

Таблица 1. Точки остановки ДНК-полимераз на субстратах, содержащих ДБС.

Семейство	ДНК-полимераза	ДБС в матрице в оцДНК	ДБС в матрице диДНК	ДБС в вытесняемой цепи в диДНК
A	KF	4 н. до ДБС	5 н. до ДБС	3–4 н. до ДБС
A	<i>Taq</i>	3–4 н. до ДБС	5 н. до ДБС	3–5 н. до ДБС
B	RB69	непосредственно перед ДБС	5–6 н. до ДБС	непосредственно перед ДБС
B	T4	непосредственно перед ДБС	не вытесняет цепь; 3'→5' экзонуклеаза	не вытесняет цепь; 3'→5' экзонуклеаза
B	<i>Pfu</i>	4 н. до ДБС	не вытесняет цепь ¹	не вытесняет цепь
X	POL β	4–5 н. до ДБС	3–4 н. до ДБС	4–5 н. до ДБС
X	POL λ	3 н. до ДБС	8 н. до ДБС	8 н. до ДБС
Y	Dpo4	непосредственно перед ДБС	слабо вытесняет цепь ²	слабо вытесняет цепь
Y	POL κ	4 н. до ДБС	слабо вытесняет цепь	слабо вытесняет цепь ³

¹Не вытесняет впереди лежащую цепь: включение одного нуклеотида при заполнении бреши без дальнейшего продолжения синтеза на неповрежденном контрольном субстрате

²Слабо вытесняет впереди лежащую цепь: включение 3–4 нуклеотидов без дальнейшего продолжения синтеза ДНК на неповрежденном контрольном субстрате

³Для POL κ наблюдалось крайне ограниченное продвижение до 2–3 н. до ДБС.

Таким образом, исходя из полученных данных и структурных соображений, синтез ДНК на матрицах, содержащих ДБС, можно описать механизмом «kiss-and-push», представленном на рис. 2. Удлинение праймера на первом этапе в основном зависит от способности ДНК-полимераз вести синтез на субстратах данного типа до момента, когда поверхность ДНК-полимеразы не столкнется с поверхностью сшитого белка («kiss»). Дальнейший синтез обуславливается лишь способностью ДНК-полимеразы выталкивать и деформировать сшитый белок до тех пор, пока, вероятно, структура самой ДНК-полимеразы не искажается до такой степени, что она более не способна катализировать включение нуклеотидов. Семейство В ДНК-полимераз обладает наибольшей способностью деформировать белковые препятствия.

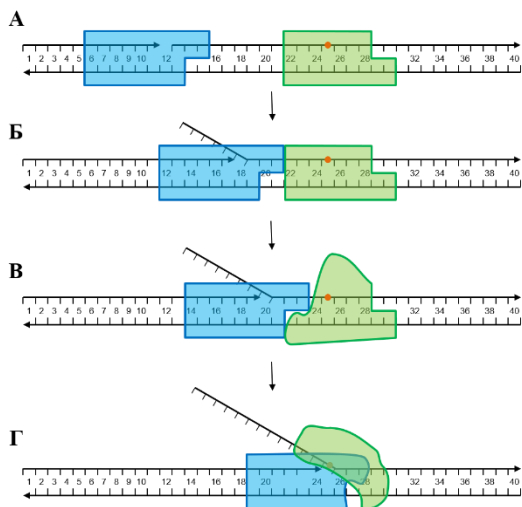


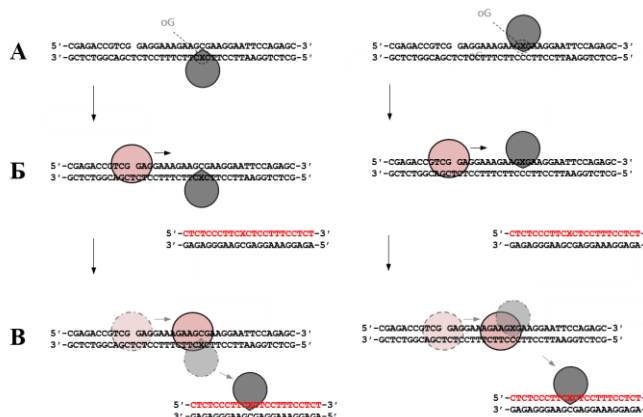
Рисунок 2. Схема механизма «kiss-and-push» на примере субстрата, содержащего ДБС в вытесняемой цепи в составе двуцепочечной ДНК. Схематичное взаимное расположение ДНК-полимеразы (синяя) и ДБС (зеленая) в начале синтеза (А). После включения нескольких нуклеотидов поверхности ДНК-полимеразы и белка в ДБС встречаются — стадия «kiss» (Б). Способность некоторых ДНК-полимераз деформировать сшитый белок приводит к включению еще нескольких нуклеотидов в растущую цепь — стадия «push» (В). Синтез останавливается, когда искажается структура ДНК-полимеразы (Г).

2. *Взаимодействие белков, движущихся по ДНК, с белками, прочно нековалентно связанными с ДНК*

Геномная ДНК всегда связана с множеством структурных, регуляторных и каталитических белков, причем многие из них демонстрируют очень высокое сродство к ДНК. Однако практически не изучен вопрос о том, как будут вести себя белки, перемещающиеся по контуру ДНК, при столкновении с препятствиями в виде прочно связанных с ДНК белков. При этом достаточно логично предположить, что способность пассивно диффундирующих белков преодолевать такие препятствия будет зависеть от относительного сродства обоих полипептидов к ДНК, а в случае активного перемещения с затратой энергии, как при матричном синтезе, способность вытеснять другие белки будет выше. Как и для ДНК-белковых сшивок, разнообразие природы белков, прочно связанных с ДНК, позволяет исходить из мысли, что какие-то специфичные системы удаления препятствий могут существовать только для некоторых из них (например, для нуклеосом), а в большинстве случаев будет иметь место некий универсальный механизм взаимодействия между белками.

Для исследования взаимодействий между белками, связанными в прочном специфичном комплексе с ДНК, и белками, которые передвигаются по ДНК, в качестве связанных белков-препятствий были использованы ДНК-гликозилазы OGG1 и NEIL1 и нуклеаза адаптивного иммунитета бактерий *Cas9 Streptococcus pyogenes*, обладающие разным сродством к определенным сайтам в ДНК. И эти белки, и белки, перемещающиеся по ДНК (ДНК-полимеразы и белок D4 — субъединица фактора процессивности ДНК-полимеразы вируса

осповакцины) происходят из нескольких разных видов, что позволило изучить и потенциально специфичные, и биоортогональные взаимодействия.



Действительно, по результатам экспериментов, полученных для пары OGG1–KF, присутствие фрагмента Кленова в реакционной смеси увеличивало количество продукта расщепления субстрата OGG1 в 2 и более раз (рис. 4А). Это позволяет сделать вывод о том, что фрагмент Кленова способен вытеснять ДНК-гликозилазу OGG1 из комплекса с ДНК. В присутствии POL β накопление продукта также увеличивалось, однако POL β заметно стимулировала OGG1 даже в отсутствие dNTP, т. е., без полимеразной реакции (рис. 4Б). Возможно POL β специфично связывается с брешью в первичном субстрате и, не получая субстратов-dNTP, может ограниченно диффундировать по контуру ДНК, вытесняя молекулу OGG1.

Способность POL β вытеснять OGG1 при пассивной диффузии вызывает вопрос о том, могут ли другие белки, перемещающиеся по контуру ДНК, действовать аналогичным образом. Оказалось, что белок D4 — часть фактора процессивности репликативного комплекса вируса осповакцины — также способен вытеснять OGG1 из комплекса с ДНК.

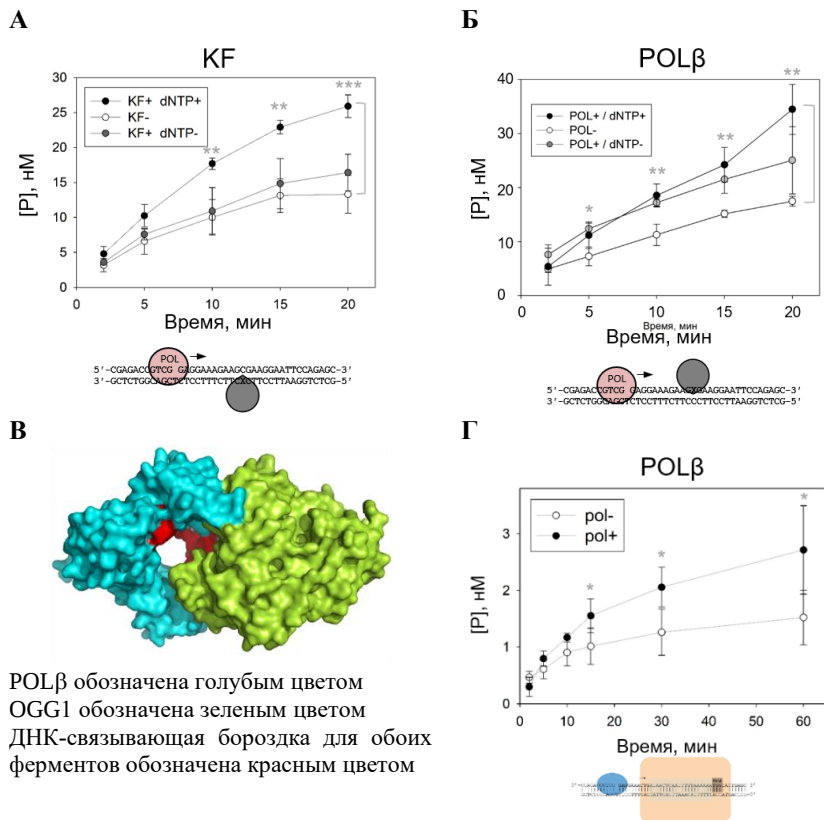


Рисунок 4. А — ускорение реакции расщепления вторичного субстрата ДНК-гликозилазой OGG1 в присутствии KF; Б — ускорение реакции расщепления вторичного субстрата ДНК-гликозилазой OGG1 в присутствии POL β ; В — модель взаимодействия POL β и OGG1, полученная на основании молекулярного докинга; Г — ускорение реакции расщепления вторичного субстрата нуклеазой Cas9 в присутствии POL β . Для панелей А, Б, Г: черные кружки — реакция в присутствии соответствующей ДНК-полимеразы и смеси dNTP; серые кружки — реакция в присутствии соответствующей ДНК-полимеразы, но без смеси dNTP; белые кружки — реакция в отсутствие соответствующей ДНК-полимеразы. Соответствующий субстрат обозначен схематично под каждым графиком.

Таким образом, как белки, активно передвигающиеся по ДНК с затратой энергии (KF, POL β), так и пассивно диффундирующие по контуру ДНК белки (D4) способны вытеснять из комплекса с ДНК прочно связанный белок OGG1. Для ответа на вопрос, специфичны ли обнаруженные взаимодействия для OGG1 или они отражают более универсальные аспекты белок-белковых взаимодействий на ДНК, была исследована способность KF, POL β и D4 вытеснять другие белки, на примере РНК-адресуемой нуклеазы Cas9 и ДНК-гликозилазы NEIL1. Белок Cas9 биоортогонален для клетки человека и, очевидно, может взаимодействовать с ее компонентами только неспецифически. С другой стороны, из-за широкого использования Cas9 для геномного редактирования представляет интерес, как клеточные системы человека реагируют на него. По результатам аналогичных экспериментов на адаптированных для Cas9 модельных оказалось, что лишь POL β была способна с некоторой эффективностью вытеснять Cas9 (рис. 4Г).

Для проверки влияния комплекса Cas9 с ДНК на способность ДНК-полимераз к элонгации праймера, был проведен эксперимент, в котором наблюдали за синтезом ДНК в присутствии и в отсутствие Cas9, дефицитного по нуклеазной активности (dCas9). Было продемонстрировано, что наличие в ДНК препятствия в виде dCas9 блокирует элонгацию праймера полимеразми KF, POL β и RB69 (рис. 5).

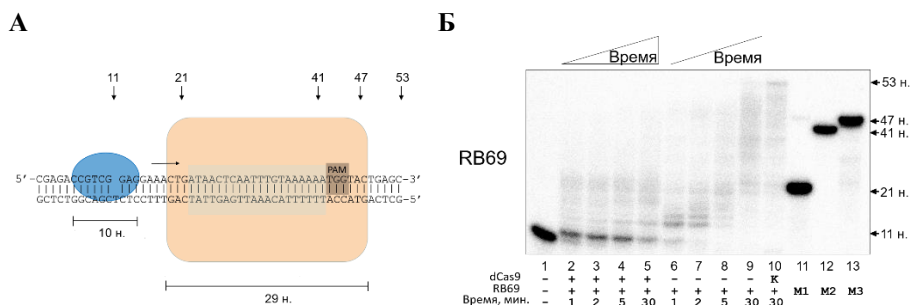


Рисунок 5. А — схематичное изображение субстрата и взаимное расположение Cas9 и ДНК-полимеразы на нем. Область протоспейсера обозначена светло-голубым. ДНК-полимераза обозначена голубым. Cas9 обозначен светло-желтым. Б — радиоавтограф геля после разделения продуктов синтеза ДНК ДНК-полимеразой RB69 при наличии на субстрате прочно связанного белка dCas9. Время инкубации указано на рисунке; дорожка 1 — субстрат без ферментов, дорожки 2–5 — реакция с RB69 в присутствии dCas9, дорожки 6–9 — реакция с RB69 в отсутствие dCas9; дорожка 10 — реакция с RB69 в отсутствие dCas9 на субстрате праймер–матрица, дорожки 11–13 — маркеры подвижности.

Результаты для вытеснения ДНК-полимеразами белка NEIL1 были в целом аналогичными результатам для OGG1. Полученные в работе данные говорят в пользу того, что ДНК-полимеразы при синтезе ДНК взаимодействуют с ДНК-белковыми шшивками и прочно связанными белками по сходным механизмам, включающим деформацию обеих белковых глобул.

3. *Активность ДНК-полимераз в присутствии полиоксометаллатов платины*

Аддукты ДНК с низкомолекулярными соединениями — в том числе механизмы их возникновения, репарации и взаимодействия с ДНК-полимеразами — в целом изучены гораздо лучше, чем ДНК-белковые аддукты. Модификация ДНК низкомолекулярными соединениями лежит в основе многих современных методов химиотерапии злокачественных новообразований. Несмотря на очевидную важность исследований в этой области, основное внимание в фундаментальных исследованиях до сих пор уделяется лишь нескольким соединениям, образующим аддукты с ДНК. В связи с этим особый интерес представляет изучение как уже известных соединений с не полностью охарактеризованным механизмом действия, так и новых повреждающих ДНК агентов.

В данной работе были изучены свойства полиоксометаллатов платины — многообещающего ранее не исследованного класса соединений, которые могут обладать рядом преимуществ как генотоксичные агенты. Соединение структуры $[(\text{Nb}_6\text{O}_{19})_2\{\text{Pt}(\text{OH})_2\}_2]^{12-}$ (рис. 6А) представляющее собой комплекс платины с крупными неорганическими лигандами (далее Pt-ПОН), было любезно предоставлено Лабораторией синтеза комплексных соединений ИНХ СО РАН.

В первую очередь была изучена возможность подавления Pt-ПОН активности ДНК-зависимых ДНК-полимераз. При близком к эквимолярному соотношении концентрации ДНК-полимераз и ДНК-субстрата наблюдалось значительное уменьшение продукта включения dNMP в присутствии возрастающих количеств Pt-ПОН (рис. 6Б, рис. 6В). Сходная картина наблюдалась для всех исследованных ДНК-полимераз (KF (exo⁺), KF (exo⁻), RB69, POLβ, POLλ, Dpo4 и POLκ), что говорит о возможности подавления этим соединением процессов матричного синтеза ДНК.

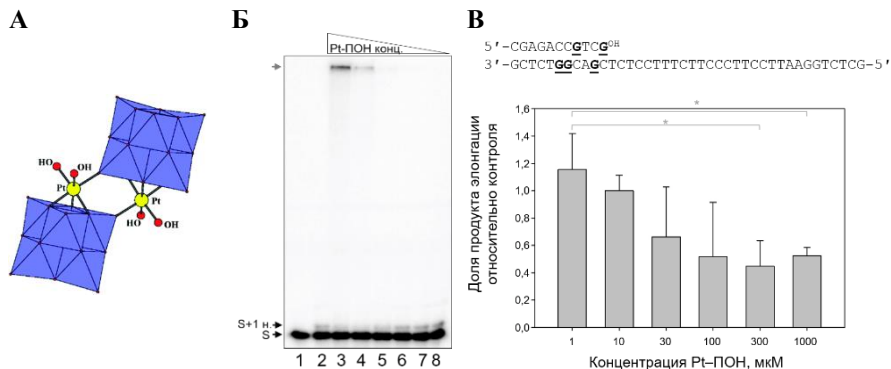


Рисунок 6. А — структура полиоксометаллата платины $[(Nb_6O_{19})_2\{Pt(OH)_2\}_2]^{12-}$.

Б — радиоавтограф геля, иллюстрирующий образование продуктов с низкой электрофоретической подвижностью (показаны серой стрелкой) при инкубации Pt-ПОН с KF (exo⁻) (10 нМ) и субстратом вида праймер–матрица (100 нМ). Дорожка 1 — субстрат в отсутствии Pt-ПОН и KF (exo⁻), дорожка 2 — субстрат и POLβ в отсутствие Pt-ПОН, дорожки 3–8 — субстрат и KF (exo⁻) в присутствии Pt-ПОН в концентрации 1000, 300, 100, 30, 10 и 1 мкМ соответственно. В — график, отображающий уменьшение включения dAMP KF (exo⁻) с увеличением концентрации Pt-ПОН. Схема субстрата изображена вверху, отмечены остатки G, подходящие для образования внутри- и межцепочечных сшивок с участием атома Pt.

Для изучения возможности ингибирования упомянутых ДНК-полимераз при непосредственном связывании с ними Pt-ПОН были подобраны условия стационарной кинетики, однако в этих условиях не происходило уменьшения количества продукта элонгации праймера даже при самых высоких концентрациях Pt-ПОН. Это позволяет сделать вывод о том, что полиоксониибаты платины не взаимодействуют непосредственно с ДНК-полимеразы.

Еще одна возможная причина снижения активности ДНК-полимераз в присутствии Pt-ПОН может быть связана с образованием ковалентных аддуктов комплексов Pt с ДНК, что свойственно для традиционных производных платины, используемых для противоопухолевой терапии. Действительно, в экспериментах с ДНК-полимеразами на субстратах вида праймер–матрица наблюдалось образование продукта с крайне низкой подвижностью (рис. 6Б). Продукты с низкой мобильностью в геле возникали во всех реакциях, содержащих ДНК и Pt-ПОН (рис. 7А) и разрушались под воздействием NaOH или гидроксилamina, конкурирующих с гуанином за связывание атома Pt. Эти данные согласуются с предположительным механизмом образования аддукта ДНК с Pt-ПОН: замещением гидроксигруппы при центральном атоме Pt нуклеофильной группой гуанина в составе ДНК. MALDI-TOF масс-

спектрометрический анализ аддуктов (рис. 7Б) показал, что они оказались легче ожидаемого комплекса Pt-ПОН с гидроксильным лигандом, замененным на гуанин. По-видимому, после связывания с ДНК комплекс Pt-ПОН может подвергаться реорганизации, приводящей к потере одного атома Pt и перестройке координационной сферы оставшегося атома (рис. 7Б), аналогично тем процессам, которые описаны для водного раствора этого соединения при длительном хранении.

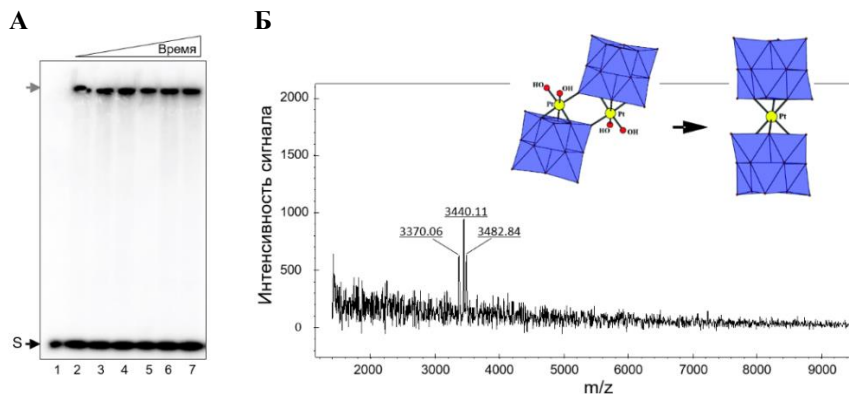


Рисунок 7. А — радиоавтограф геля, иллюстрирующий образование продуктов с низкой электрофоретической подвижностью (серая стрелка) при инкубации олигодезоксирибонуклеотида 5'-TTTTGTT-3' в отсутствии Pt-ПОН (дорожка 1) или в присутствии Pt-ПОН в концентрации 1 мМ в течении 1, 2, 5, 20, 60 и 120 мин. (дорожки 2–7 соответственно). Б — спектр MALDI-TOF олигодезоксирибонуклеотида 5'-TTGTT-3' после инкубации в присутствии 1 мМ Pt-ПОН.

4. *Исследование взаимодействия ферментов метаболизма ДНК с аддуктом АП-сайта с метоксиамином*

АП-сайты — небольшие повреждения ДНК, которые оказывают как блокирующее так и предмутагенное действие на ДНК-полимеразы. Из многих известных производных альдегидного АП-сайта особое внимание привлекает его конъюгат с метоксиамином (АП-МОХ). Он устойчив к действию АП-эндонуклеаз, что послужило основой нынешнего интереса к МОХ с точки зрения терапевтического применения в комбинации с повреждающими ДНК агентами. Однако до сих пор остаются неисследованными многие аспекты биологического действия этих производных, в частности, способность ДНК-полимераз вести синтез при наличии в матрице АП-МОХ.

Для получения модельных систем, содержащих аддукт с МОХ, альдегидный АП-сайт получали обработкой урацил-содержащих олигонуклеотидов урацил-ДНК-гликозилазой, образование АП-сайта

проверяли обработкой NaOH. Далее полученный альдегидный АП-сайт конъюгировали с MOX, для оценки полноты превращения АП-сайта в аддукт АП-MOX его обрабатывали АП-эндонуклеазой человека APX1. Для подтверждения природы полученного аддукта также проводили его масс-спектрометрический анализ методом MALDI-TOF, который показал совпадение массы продукта с ожидаемой.

Для изучения влияния присутствия АП-MOX на синтез ДНК была исследована элонгация праймера ДНК-полимеразами KF (exo⁻), RB69, POL β , POL λ и POL κ на матрицах, содержащих АП-MOX. Субстрат имел структуру праймер–матрица во всех случаях, кроме POL β , где использовался предпочтительный для этого фермента субстрат типа праймер–матрица–запирающий праймер.

Кинетику включения dNMP исследовали в реакциях с субстратами, содержащими альдегидный АП-сайт либо АП-MOX и праймер, заканчивающийся за 1 нуклеотид до места аддукта. Вследствие химической нестабильности альдегидного АП-сайта кинетические параметры для ДНК-полимераз чаще всего получают с использованием аналогов, не склонных к спонтанному β -элиминированию, в частности, «фуранового АП-сайта» (THF). Однако показано, что репликативный и репаративный синтез ДНК при наличии в матрице остатка THF *in vivo* отличается от синтеза при наличии альдегидного АП-сайта, поэтому представляется, что более корректное сравнение свойств АП-MOX как субстрата должно проводиться именно с альдегидным АП-сайтом. Измеренные кинетические параметры включения dNMP напротив альдегидного АП-сайта и аддукта АП-сайта с метоксиамином приведены в табл. 2. Для ДНК-полимераз семейств А, В, и Х при переходе с АП-сайт-содержащих субстратов на субстраты, содержащие аддукт с MOX, наблюдалось падение эффективности синтеза в 2–3 раза. Фрагмент Кленова следовал «правилу А» (преимущественное включение dAMP напротив АП-сайта), ДНК-полимераза RB69 предпочтительно включала dAMP наряду с dGMP. ДНК-полимеразы семейства Х сильно различались по специфичности включения dNTP: POL β предпочтительно включала dAMP и dCMP, а POL λ — исключительно dGMP, предположительно по механизму выпетливания матрицы. Интересно, что POL κ вела синтез на субстратах, содержащих аддукт с MOX эффективнее, чем на АП-сайт содержащих субстратах.

Таблица 2. Кинетические параметры реакции включения dNTP ДНК-полимеразы на субстратах, содержащих альдегидный АП-сайт и аддукт АП-сайта с МОХ.

ДНК-полимераза	ДНК-субстрат	dNTP субстрат	K_M , мкМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{sp} , мкМ ⁻¹ с ⁻¹
KF	АП-сайт	dATP	19,2±4,8	(21,4±1,4)×10 ⁻⁴	(11,1±2,8)×10 ⁻⁵
KF	АП-сайт	dGTP	— ²	— ²	(6,05±0,96)×10 ⁻⁷
KF	АП-сайт	dTTP	— ²	— ²	(5,57±2,10)×10 ⁻⁸
KF	АП-сайт	dCTP	— ¹	— ¹	— ¹
KF	АП-МОХ	dATP	40,7±8,5	(12,2±0,9)×10 ⁻⁴	(2,99±0,66)×10 ⁻⁵
KF	АП-МОХ	dGTP	— ²	— ²	(2,25±0,49)×10 ⁻⁷
KF	АП-МОХ	dTTP	— ²	— ²	(5,34±3,97)×10 ⁻⁸
KF	АП-МОХ	dCTP	— ¹	— ¹	— ¹
RB69	АП-сайт	dATP	109±30	(2,74±0,26)×10 ⁻²	(25,1±7,4)×10 ⁻⁵
RB69	АП-сайт	dGTP	112±37	(1,52±0,14)×10 ⁻²	(13,6±4,7)×10 ⁻⁵
RB69	АП-сайт	dTTP	— ²	— ²	(1,01±0,11)×10 ⁻⁶
RB69	АП-сайт	dCTP	— ¹	— ¹	— ¹
RB69	АП-МОХ	dATP	75,8±19,7	(8,60±0,85)×10 ⁻³	(11,4±3,2)×10 ⁻⁵
RB69	АП-МОХ	dGTP	60,1±12,0	(2,58±0,16)×10 ⁻³	(4,29±0,89)×10 ⁻⁵
RB69	АП-МОХ	dTTP	— ²	— ²	(1,01±0,10)×10 ⁻⁶
RB69	АП-МОХ	dCTP	— ¹	— ¹	— ¹
POLλ	АП-сайт	dATP	— ¹	— ¹	— ¹
POLλ	АП-сайт	dGTP	0,340±0,040	(8,30±0,20)×10 ⁻⁴	(2,41±0,29)×10 ⁻³
POLλ	АП-сайт	dTTP	— ¹	— ¹	— ¹
POLλ	АП-сайт	dCTP	— ¹	— ¹	— ¹
POLλ	АП-МОХ	dATP	— ¹	— ¹	— ¹
POLλ	АП-МОХ	dGTP	0,650±0,160	(9,40±0,40)×10 ⁻⁴	(1,45±0,36)×10 ⁻³
POLλ	АП-МОХ	dTTP	— ¹	— ¹	— ¹
POLλ	АП-МОХ	dCTP	— ¹	— ¹	— ¹
POLβ	АП-сайт	dATP	2,88±1,48	(4,40±0,20)×10 ⁻⁴	(1,52±0,78)×10 ⁻⁴
POLβ	АП-сайт	dGTP	— ²	— ²	(2,36±0,75)×10 ⁻⁷
POLβ	АП-сайт	dTTP	— ²	— ²	(1,01±0,33)×10 ⁻⁷
POLβ	АП-сайт	dCTP	2,83±1,42	(6,70±0,50)×10 ⁻⁴	(2,36±1,19)×10 ⁻⁴
POLβ	АП-МОХ	dATP	6,27±2,36	(5,20±0,30)×10 ⁻⁴	(8,29±3,16)×10 ⁻⁵
POLβ	АП-МОХ	dGTP	— ²	— ²	(1,88±0,61)×10 ⁻⁷
POLβ	АП-МОХ	dTTP	— ²	— ²	(1,11±0,19)×10 ⁻⁷
POLβ	АП-МОХ	dCTP	18,2±7,3	(7,30±0,60)×10 ⁻⁴	(4,02±1,64)×10 ⁻⁵
POLκ	АП-сайт	dATP	— ²	— ²	(3,49±0,35)×10 ⁻⁶
POLκ	АП-сайт	dGTP	— ²	— ²	(1,43±0,39)×10 ⁻⁷
POLκ	АП-сайт	dTTP	— ²	— ²	(1,63±0,33)×10 ⁻⁷
POLκ	АП-сайт	dCTP	— ²	— ²	(7,29±0,92)×10 ⁻⁷
POLκ	АП-МОХ	dATP	157±48	(3,06±0,44)×10 ⁻³	(19,5±6,59)×10 ⁻⁶
POLκ	АП-МОХ	dGTP	— ²	— ²	(2,23±0,37)×10 ⁻⁷
POLκ	АП-МОХ	dTTP	— ²	— ²	(1,73±0,44)×10 ⁻⁷
POLκ	АП-МОХ	dCTP	— ²	— ²	(11,0±0,8)×10 ⁻⁷

¹Включение ниже предела детекции методом флуоресцентного сканирования.

²Насыщение субстратом не достигается, не удается определить в виде отдельного кинетического параметра.

Изучение включения dNMP напротив повреждений с использованием единственного dNTP-субстрата и праймера, 3'-конец которого находится непосредственно перед повреждением, имеет определенные недостатки,

основной из которых — влияние сродства полимеразы к такому ДНК-субстрату на эффективность включения. Многие ДНК-полимеразы ведут процессивный синтез, и поврежденное звено матрицы попадает в их активный центр не при связывании субстрата из раствора, а при перемещении по уже связанной ДНК, что зачастую влияет на относительную эффективность включения разных dNMP. В связи с этим, спектр включения dNMP на таких субстратах был качественно оценен в условиях процессивного синтеза (рис. 8). Все ферменты вели элонгацию праймера до тех пор, пока ДНК-полимераза не встречала повреждение. Далее наблюдались две выраженных точки паузы за 1 н. до места повреждения и непосредственно напротив повреждения (рис. 8, дорожки 5–10). Эти последовательные сайты остановки ДНК-полимераз указывают на сложность включения dNMP напротив повреждения и на низкую эффективность следующего шага — включения нормального нуклеотида при расположении 3'-конца праймера напротив АП-сайта или АП-МОХ. Тем не менее, АП-сайт с некоторой эффективностью проходил ДНК-полимеразы KF и RB69, которые включали напротив него dAMP.

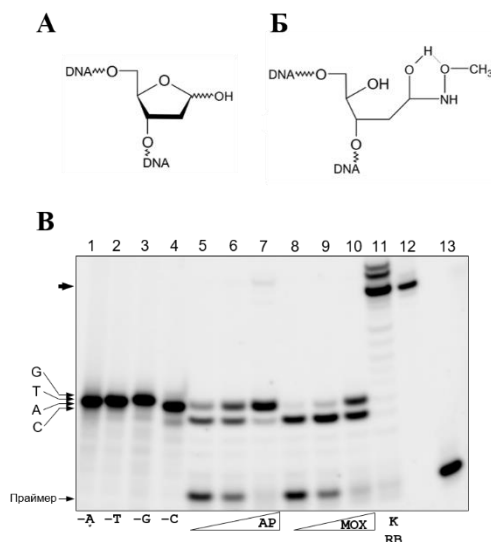


Рисунок 8. А — структура АП-сайта, Б — структура аддукта АП-сайта с МОХ. В — электрофореграмма геля после разделения продуктов синтеза ДНК-полимеразой RB69 на матрицах, содержащих АП-сайт или аддукт с МОХ. Дорожки 1–4 — маркеры подвижности, соответствующие длине до места повреждения, оканчивающиеся на А, Т, Г и С соответственно; дорожки 5–7 — реакция синтеза RB69 на матрице, содержащей АП-сайт, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожки 8–10 — то же для матрицы, содержащей аддукт с МОХ, время инкубации 2, 5, 30 мин соответственно; дорожка 11 — синтез RB69 на неповрежденном субстрате; дорожка 12 — маркер длиной 23, соответствующий полноразмерному продукту; дорожка 13 — исходный праймер. Стрелкой показан полноразмерный продукт синтеза.

Полученные данные показывают, что предпочтения ДНК-полимераз к включению dNMP напротив повреждения при сравнении АП-сайта и АП-МОХ в целом сохраняются, однако напротив АП-МОХ ДНК-полимеразы включают

dAMP с большей селективностью, хотя общая эффективность синтеза на таких матрицах несколько снижена. Интересно, что в отличие от ситуации с праймером, заканчивающимся перед местом повреждения, где наблюдалось четкое предпочтение POL λ включать dGMP предположительно по механизму выпетливания матрицы, в условиях процессивного синтеза имело место включение dAMP POL λ напротив обоих повреждений, что подчеркивает необходимость использования разных взаимодополняющих методов для оценки спектра включения ДНК-полимеразами dNMP напротив повреждений ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе на основании картирования сайтов остановок ДНК полимераз при взаимодействии с ДНК-белковыми сшивками впервые предложена модель взаимодействия ДНК-полимераз с объемными препятствиями, названная автором моделью «kiss-and-push». Она описывает взаимодействие в терминах соприкосновения поверхностей белковых глобул («kiss») и их дальнейшей деформации («push»). Данная модель имеет возможность прямой экспериментальной проверки: например, возможна идентификация экспонированных в раствор пептидов масс-спектрометрическими методами, анализ деформации белковых глобул флуоресцентной спектроскопией и непосредственный структурный анализ методами рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии. Очевидно, что такая же логика последовательных структурных событий может быть применима не только к ДНК-полимеразам и ДНК-белковым сшивкам, но и к нековалентным ДНК-белковым комплексам, препятствующим движению других белков вдоль контура ДНК. Процессы диффузии белков по контуру ДНК в условиях конкуренции за ее связывание в настоящее время изучены очень слабо, и предложено несколько механизмов, описывающих вытеснение одного белка другим: активное вытеснение с непосредственным контактом между белками, активное вытеснение за счет деформации ДНК, передающейся через ДНК-белковый футпринт, пассивная конкуренция за связывание определенных сайтов ДНК, передача заряда по ДНК между редокс-активными белками и т. п. Данные, полученные в настоящей работе при изучении взаимодействия ковалентных сшивок и прочно связанных белков, поддерживают первый из этих механизмов. Модель с пришивкой ДНК-гликозилаз к ДНК может быть расширена с использованием других ферментов этого класса, способных образовывать основания Шиффа; некоторые из них (например, OGG1) могут параллельно изучаться как в виде ковалентных сшивок, так и прочно связанных белков.

Соединения на основе платины с полиоксометаллатными лигандами, рассматриваемые как потенциальные противоопухолевые соединения, представляют интерес с точки зрения своей способности образовывать крупные

аддукты небелковой природы. Полиоксониобат платины, использованный в данной работе, давал моноаддукт с ДНК с молекулярной массой ~1.5 кДа. Есть основания полагать, что взаимодействие ДНК-полимераз с такими аддуктами может напоминать взаимодействие по модели «kiss-and-push». В свою очередь, образование комплекса продвигающейся ДНК-полимеразы и полиоксометаллатного моноаддукта может индуцировать ковалентный захват полимеразы при наличии подходящего электрофильного центра наподобие координирующего иона платины. Дальнейшее изучение подробного механизма взаимодействия ДНК-полимераз с полиоксометаллатами платины представляет значительный интерес, поскольку эти комплексные соединения могут обладать рядом фармакодинамических преимуществ по сравнению с классическими терапевтическими средствами на основе платины.

Метоксиамин — еще одно изученное в ходе работы соединение, способное образовывать ковалентные аддукты с ДНК, но не с каноническими нуклеотидами, а с АП-сайтами. Устойчивость таких аддуктов к репарации вызывает интерес с точки зрения использования метоксиамин в комбинации с повреждающими ДНК агентами, и в настоящее время он проходит клинические испытания. Однако его влияние на системы матричного синтеза и в целом на его токсичность для нормальных клеток еще не изучены. В настоящей работе впервые исследован спектр включения dNMP напротив аддуктов, образованных метоксиамином с АП-сайтом, а также их способность ингибировать другие компоненты эксцизионной репарации оснований. Выяснилось, что по своей потенциальной мутагенности аддукты с метоксиамином не более опасны, чем неконъюгированный АП-сайт. Подобные результаты крайне важны для характеристики биохимических свойств соединения, которое, возможно, в скором времени будет внедрено в клиническую практику. Как ни странно, в литературе описано очень мало результатов по биологическим свойствам метоксиаминовых аддуктов, и результаты работы уже легли в основу совместных исследований между ИХБФМ СО РАН и Майнцским университетом (Германия), посвященных изучению механизмов цитотоксичности и мутагенности метоксиамин в клетках человека.

Подытоживая сказанное, можно надеяться, что настоящая работа даст толчок исследованиям в нескольких направлениях, связанных с взаимодействием ДНК-полимераз и препятствий в ДНК и имеющих как фундаментальный, так и практический интерес.

ВЫВОДЫ

1. На основе стабилизированного восстановлением NaBH_4 конъюгата белка Fpg с ДНК созданы модели олигонуклеотидных дуплексов, содержащих ДНК-белковую сшивку в одноцепочечной ДНК, в матричной и нематричной цепях в составе двуцепочечной ДНК. Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*, ДНК-полимераза I *Thermus aquaticus*, ДНК-полимераза *Pyrococcus furiosus*, ДНК-полимераза IV *Sulfolobus solfataricus*, ДНК-полимеразы β , λ и κ человека, ДНК-полимеразы бактериофагов T4 и RB69 не способны пройти сшивку, находящуюся в ДНК в любом контексте. ДНК-полимеразы семейства В способны вести синтез до точки сшивки при ее наличии в одноцепочечной ДНК или в вытесняемой цепи. Прочие ДНК-полимеразы в основном останавливаются за 4–5 нуклеотидов до точки сшивки в одноцепочечной ДНК. Те из них, которые способны вытеснять впереди лежащую цепь, также останавливаются за 4–5 нуклеотидов до точки сшивки при ее наличии в вытесняемой цепи.

2. Как белки, активно передвигающиеся по ДНК с затратой энергии (фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-полимераза β человека, ДНК-полимераза бактериофага RB69), так и белки, пассивно диффундирующие по контуру ДНК (белок D4 вируса осповакцины), способны вытеснять белки OGG1 и NEIL1 из высокоаффинных комплексов с ДНК, но большинство из них неспособно вытеснять рибонуклеопротеин Cas9, комплекс которого дополнительно стабилизирован взаимодействиями РНК–ДНК.

3. Полиоксониобат платины структуры $[(\text{Nb}_6\text{O}_{19})_2\{\text{Pt}(\text{OH})_2\}_2]^{12-}$ образует аддукты с ДНК, которые подавляют синтез ДНК фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-полимеразой IV *S. solfataricus*, ДНК-полимеразами β и κ человека и ДНК-полимеразой бактериофага RB69.

4. ДНК-полимеразы различаются по способности включать dNMP напротив апурин-апириимидинового (АП-) сайта и его аддукта с метоксиамином. Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, принадлежащий к структурному семейству А, следует «правилу А», преимущественно включая dAMP в обоих случаях. Репликативная ДНК-полимераза бактериофага RB69 из семейства В включает dAMP и dGMP со сходной эффективностью. Репаративные ДНК-полимеразы β и λ семейства X отличаются друг от друга: первая включает dAMP и dCMP, а вторая — dGMP. Транслезионная ДНК-полимераза κ семейства Y включает в основном dAMP, при этом она использует субстрат с метоксиаминовым аддуктом значительно более эффективно, чем субстрат с АП-сайтом.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. **Yudkina A. V.**, Dvornikova A. P., Zharkov D. O. Variable termination sites of DNA polymerases encountering a DNA–protein cross-link // PLoS ONE. – 2018. – V. 13. – № 6. – e0198480. DOI: 10.1371/journal.pone.0198480
2. Endutkin A. V., **Yudkina A. V.**, Sidorenko V. S., Zharkov D. O. Transient protein–protein complexes in base excision repair // J. Biomol. Struct. Dyn. – 2019. – V. 37. – № 17. – P. 4407–4418. DOI:10.1080/07391102.2018.1553741
3. **Yudkina A. V.**, Sokolov M. N., Abramov P. A., Grin I. R., Zharkov D. O. Platinum polyoxoniobates form adducts with DNA // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2019. – V. 45. – No. 6. – P. 641-646. DOI:10.1134/S1068162019060414
4. **Yudkina A. V.**, Endutkin A. V., Diatlova E. A., Moor N. A., Vokhtantsev I. P., Grin I. R., Zharkov D. O. Displacement of slow-turnover DNA glycosylases by molecular traffic on DNA // Genes. – 2020. – V. 11. – № 8. – Article No. 866. DOI: 10.3390/genes11080866