

На правах рукописи



ДЯТЛОВА ЕВГЕНИЯ АЛЕКСЕЕВНА

**МЕХАНИЗМЫ ПОИСКА ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗАМИ
СУПЕРСЕМЕЙСТВ «СПИРАЛЬ — ДВА ПОВОРОТА — СПИРАЛЬ» И
« α/β -УКЛАДКА»**

1.5.4 — биохимия

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск — 2023

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», зав. лабораторией

Официальные оппоненты:

Тарантул Вячеслав Залманович, д. б. н., профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. н. с.

Кузнецов Никита Александрович, д. х. н.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, зав. лабораторией

Гончар Данила Александрович, к. б. н.
общество с ограниченной ответственностью «СибЭнзайм», заместитель директора по производству

Защита состоится «16» июня 2023 г. в 12 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 «16» мая 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
к.х.н.



Пестряков П. Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Вопрос о механизмах поиска мишеней белками, специфичными к определенным последовательностям или структурным элементам ДНК, впервые был поставлен более 50 лет назад, однако по сей день остается открытым. В классической серии работ Берга, Винтера и фон Гиппеля 1981 г. было предложено различать две группы таких механизмов, не требующих затрат энергии: процессивный поиск, при котором белок связывается с ДНК в произвольном месте и ищет мишень в режиме одномерной диффузии по контуру ДНК, и дистрибутивный поиск, который происходит в трех измерениях без движения по ДНК. Максимальная скорость поиска достигается при оптимальном сочетании вклада процессивных и дистрибутивных механизмов. На относительную эффективность этих механизмов оказывают влияние многие факторы окружения белка: ионная сила, связывание с ДНК низкомолекулярных соединений и других белков, краудинг-эффект и т. п.

Модель одномерной диффузии, первоначально разработанная для факторов транскрипции и других белков, специфичных к последовательности ДНК, была вскоре адаптирована для ферментов репарации ДНК, узнающих поврежденные нуклеотиды. За прошедшие годы механизмы поиска были изучены для ряда ферментов систем эксцизионной репарации оснований, эксцизионной репарации нуклеотидов, мисматч-репарации, рекомбинационной репарации и фотореактивации. В последнее время прогрессу таких работ способствует развитие одномолекулярных методов исследования, в частности, флуоресцентной микроскопии единичных молекул и атомно-силовой микроскопии. Параллельно с этим появляются новые методы в рамках традиционной ферментативной кинетики и теоретические модели, позволяющие изучать разные механизмы поиска мишеней.

К числу основных ферментов системы эксцизионной репарации оснований принадлежат ДНК-гликозилазы — ферменты, узнающие поврежденные основания и гидролизующие *N*-гликозидную связь между основанием и остатком дезоксирибозы. В геномах всех живых организмов, в том числе некоторых вирусов, закодировано несколько ДНК-гликозилаз. Эти ферменты отличаются специфичностью к определенным типам повреждений: некоторые из них узнают окисленные пуриновые основания, другие — окисленные пиримидины, либо дезаминированные основания, либо алкилированные основания и т. п. Для некоторых ДНК-гликозилаз механизмы поиска повреждений изучены достаточно хорошо, в то время как другие остаются в этом отношении малоисследованными. Так, из числа ДНК-гликозилаз, принадлежащих к структурному суперсемейству «спираль — два поворота — спираль» (H2TH), основная часть работ по механизмам поиска выполнена на формамидопиримидин-ДНК-гликозилазе (Fpg) *Escherichia coli* и *Geobacillus stearothermophilus*, однако другие ферменты из этой группы,

заметно отличающиеся от Fpg по своей специфичности — эндонуклеаза VIII (Nei) бактерий и ее эукариотические гомологи NEIL1 и NEIL2 — практически не исследовались. Даже для более тщательно изученных ДНК-гликозилаз — например, урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* (Ung), принадлежащей к структурному суперсемейству α/β -укладка — остаются открытыми многие вопросы, связанные с характером их передвижения по ДНК и взаимодействия с другими молекулами. В особенности это касается белков из тех видов, которые важны с практической точки зрения (патогенные или биотехнологически ценные), но не входят в узкий круг модельных организмов. Например, считается, что урацил-ДНК-гликозилаза вируса осповакцины (vvUNG), помимо участия в репарации, играет роль процессивной субъединицы вирусного репликативного комплекса, что дает уникальный пример фактора процессивности, отличного от белков-«зажимов» DnaN/PCNA, однако собственная процессивность этого фермента никогда не изучалась.

Цель настоящей работы заключается в изучении механизмов поиска мишеней некоторыми ферментами эксцизионной репарации оснований: эндонуклеазами VIII *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши, урацил-ДНК-гликозилазами *E. coli* и вируса осповакцины. Эта цель подразумевает решение нескольких **задач**:

- 1) изучить эффективность процессивного поиска повреждений ферментами суперсемейства H2TH — Nei *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши: оценить влияние моно- и дивалентных ионов металлов, расстояния между повреждениями и структуры субстрата на процессивные свойства ферментов;
- 2) изучить влияние ковалентных аддуктов ДНК, а также нековалентных лигандов малой и большой бороздки на процессивность фермента Ung *E. coli*;
- 3) изучить собственную процессивность фермента vvUNG, выполняющего роль субъединицы фактора процессивности репликативного комплекса вируса: оценить эффективность коррелированного расщепления в присутствии моно- и дивалентных ионов металлов, препятствий в виде разрывов, брешей и аддуктов в ДНК, определить зависимость эффективности транслокации от расстояния между повреждениями, и на основе этого с использованием модели случайных блужданий получить микроскопические параметры поиска повреждений;
- 4) провести поиск соединений, способных ингибировать активность vvUNG и подавлять ее процессивность.

Научная новизна работы. Соискателем впервые показано, что даже для гомологичных белков, принадлежащих к одному суперсемейству ДНК-гликозилаз H2TH, механизмы поиска повреждений могут значительно отличаться, что, скорее всего, связано с отличиями в клеточных функциях этих ферментов. Также впервые для фермента Ung *E. coli* изучено влияние на

процессивный поиск ковалентных аддуктов в ДНК и связанных с ДНК нековалентных лигандов. Охарактеризована собственная процессивность vvUNG — ключевого компонента вирусного репликативного комплекса, найдены низкомолекулярные соединения, способные подавлять активность и процессивность этого фермента.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы имеют фундаментальное значение для понимания механизмов поиска повреждений ДНК-гликозилазами и механизмов эксцизионной репарации оснований ДНК в целом, а также для характеристики свойств репликативного комплекса вирусов семейства *Poxviridae*. Обнаруженные ингибиторы UNG потенциально могут стать основой терапевтических средств против инфекций, вызванных ортопоксвирусами, в частности, таких опасных для человека заболеваний, как натуральная оспа и оспа обезьян.

Методология и методы исследования. В работе применялись методы генной инженерии, продукции и выделения рекомбинантных белков, стандартные методы стационарной ферментативной кинетики и метод остановленной струи, микромасштабного термофореза, также применялись вычислительные методы исследования биополимеров. Для изучения механизмов поиска мишеней ферментами репарации в работе был использован биохимический метод, разработанный в лаборатории, где выполнялось исследование. Метод основан на измерении вероятности коррелированного расщепления (probability of correlated cleavage, P_{cc}) олигонуклеотидных субстратов, содержащих два повреждения.

Положения, выносимые на защиту:

1. ДНК-гликозилазы, относящиеся к суперсемейству H2TH, значительно отличаются друг от друга по способности вести процессивный поиск повреждений в ДНК.
2. Эффективность транслокации урацил-ДНК-гликозилаз вдоль двуцепочечной ДНК снижается при наличии ковалентного аддукта в большой бороздке, но эти ферменты могут преодолевать другие препятствия, такие как разрывы, нековалентно связанные лиганды малой и большой бороздки.
3. Фермент UNG вируса осповакцины осуществляет высокоэффективный процессивный поиск мишеней в ДНК, что подтверждает его роль как фактора процессивности репликативного комплекса вируса осповакцины.
4. Соединения класса тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиденов способны ингибировать активность и подавлять процессивность vvUNG.

Личный вклад соискателя. Все эксперименты и их анализ выполнены лично соискателем. Моделирование одномерного блуждания белка по ДНК выполнено В. Д. Жарковым (Томский государственный университет) и Н. А. Торгашевой (ИХБФМ СО РАН). Докинг низкомолекулярных соединений с UNG выполнен к. х. н. Г. Г. Чиловым (ИОХ РАН).

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения работы представлены на 7 российских и международных конференциях: Всероссийский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), международная конференция «Химическая биология», посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016), международная конференция «The 6th US-EU Conference on Repair of Endogenous DNA Damage» (Удине, Италия, 2017), международная конференция «BGRS\SB'2018: 11th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology» (Новосибирск, 2018), международная конференция «The 43rd FEBS Congress» (Прага, Чехия, 2018), международная конференция «EEMS 2019: 47th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society» (Ренн, Франция, 2019), 3-й Российский микробиологический конгресс (Псков, 2021).

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

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, приложения и списка цитированной литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 49 рисунков, 11 таблиц и 1 приложение. Библиография включает 262 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Механизмы поиска повреждений ферментами суперсемейства H2TH

Ферменты суперсемейства «спираль — два поворота — спираль» (H2TH) обладают общими структурными элементами и каталитическим механизмом, но при этом имеют отличающуюся субстратную специфичность: Fpg удаляет преимущественно окисленные пурины, а Nei и NEIL — окисленные пиримидины. В свою очередь, ферменты NEIL различаются по предпочтению структуры ДНК, и выполняют в клетке разные роли на разных этапах жизненного цикла. Так, NEIL1 взаимодействует с некоторыми репликативными белками и, вероятно, удаляет повреждения в двуцепочечной ДНК во время репликации, а NEIL2 предпочитает одноцепочечную ДНК и структуры типа «глазок», взаимодействует с РНК-полимеразой II, и его репаративная функция может быть сопряжена с транскрипцией. Данные о механизмах поиска мишеней ферментами Nei и NEIL помогли бы дополнить существующее представление о роли этих ферментов для клетки.

Для изучения процессивности ДНК-гликозилаз в работе был использован метод, основанный на измерении вероятности коррелированного расщепления олигонуклеотидного субстрата, содержащего два сайта узнавания ферментом. В условиях большого избытка субстрата над ферментом, когда вероятность того, что связавшаяся с субстратом молекула белка после диссоциации свяжется вновь с той же молекулой субстрата, крайне мала, будет формироваться 2

продукта расщепления по одному из сайтов (продукты P1 и P2, разной длины), и продукт расщепления по обоим сайтам (P3), соответствующий процессивному движению молекулы фермента по ДНК в процессе поиска (рис. 1А, Б). По соотношению начальной скорости накопления P3 (v_{P3}) (рис. 1В) к суммарной скорости расщепления субстрата ($v_{P1} + v_{P2} + v_{P3}$), рассчитывается вероятность коррелированного расщепления ДНК P_{cc} , которая зависит только от природы исследуемого фермента, состава реакционной среды и расстояния между повреждениями (Mechetin, Zharkov, 2011).

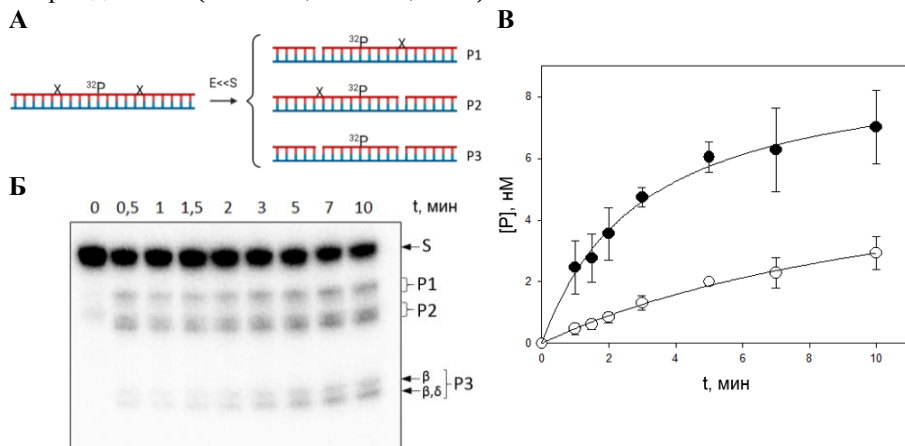


Рисунок 1. Расщепление субстрата X1-X2*/comG ферментом Nei при 0 мМ KCl. А — схематичное изображение субстрата и продуктов реакции (X = 5-OH-Ura). Б — радиоавтограф полиакриламидного геля после разделения продуктов реакции. Дорожка 0 — контроль без фермента, дорожки 0,5 — 10 мин отражают время инкубации с ферментом. S — нерасщепленный субстрат, P1, P2 — продукты расщепления по одному из остатков 5-OH-Ura, P3 — продукт расщепления по обоим остаткам 5-OH-Ura. Двойные полосы продуктов реакции отражают расщепление по механизмам β - и β,δ -элиминирования. В — кривые зависимости накопления продуктов P1+P2 (●) и P3 (○) от времени.

ДНК всегда окружена оболочкой из противоионов, при этом в обеих бороздках присутствуют как моновалентные катионы, которые взаимодействуют с ДНК электростатически, так и дивалентные, образующие водородные и координационные связи. При движении молекулы белка вдоль ДНК должно происходить вытеснение ионов белком, что приводит к снижению эффективности одномерной диффузии при увеличении ионной силы раствора. Зависимость транслкации белка от концентрации ионов обычно используют для доказательства того, что поиск мишени осуществляется процессивно, а не путем диффузии в трех измерениях.

В работе было изучено влияние катионов K^+ и Mg^{2+} на P_{cc} ферментов Nei *E. coli*, NEIL1 и NEIL2 мыши. Из трех ферментов только для NEIL1 характер

кривой полностью соответствовал ожидаемой зависимости для процессивного фермента: значение P_{cc} достигало 0,48 в отсутствие ионов металлов и падало с увеличением их концентрации (рис. 2, ●). NEIL2 практически не использовал процессивный поиск; значения P_{cc} для него составляли около 0,1 во всем диапазоне концентраций катионов (рис. 2, ●). График значений P_{cc} для Nei представлял из себя нечто среднее: наблюдалось очень небольшое (но статистически значимое) снижение P_{cc} от 0,28 до 0,21 при увеличении концентрации KCl (рис. 2, ●). Вполне вероятно, что такой профиль характеризует некоторые особенности взаимодействия Nei и NEIL2 с ДНК, указывая на возможный вклад неэлектростатических взаимодействий, например, гидрофобных или ван-дер-ваальсовых взаимодействий. В целом процессивность Nei, NEIL1 и NEIL2 была заметно ниже, чем у гомологичного им белка Fpg из *E. coli*, для которого на субстрате такой же структуры и в тех же условиях реакции значения P_{cc} достигали 0,9 (Sidorenko, Zharkov, 2008).

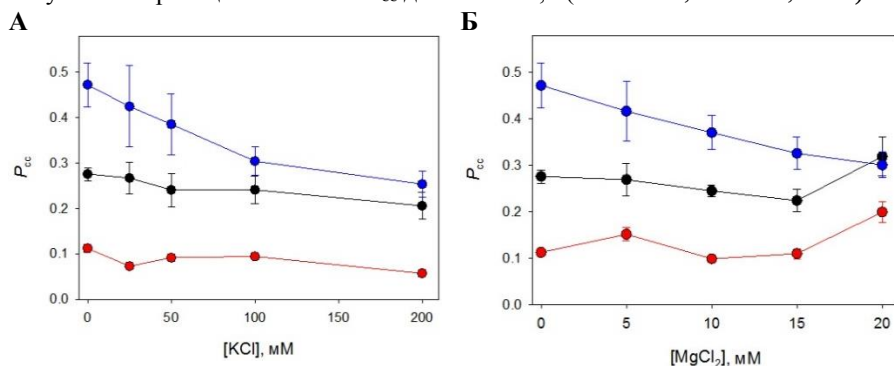


Рисунок 2. Влияние ионов K^+ (А) и Mg^{2+} (Б) на вероятность коррелированного расщепления двуцепочечного субстрата X1-X2*/comG ферментами Nei *E. coli* (●), NEIL1 (●) и NEIL2 (●) мыши.

Процессивный поиск мишеней в ДНК по сути представляет собой случайное блуждание молекулы белка с некоторой вероятностью диссоциации на каждом шаге. Таким образом, вероятность коррелированного расщепления должна снижаться с увеличением расстояния между повреждениями. Чтобы оценить, как далеко Nei и NEIL1 могут продвигаться в процессивном режиме вдоль ДНК, для этих двух ферментов были получены значения P_{cc} на субстратах с двумя основаниями 5-ОН-Uга, разделенными 20, 40, 60 и 80 п. н. Для NEIL2 такой эксперимент не проводился из-за его крайне низкой процессивности даже при 20 п. н. между повреждениями. Совершенно неожиданно, в обоих случаях не наблюдалось какого-либо значительного снижения P_{cc} на всем диапазоне расстояний (рис. 3А). В недавнем и единственном исследовании, посвященном поиску повреждений ферментом NEIL1, расчетное среднее расстояние

транслокации на плазмидных субстратах составило 80 п. н. (Kolbanovskiy et al., 2021). Возможно, снижение значений P_{cc} можно было бы наблюдать на расстояниях >80 п. н., но такие модельные субстраты сложно получить на основе синтетических олигонуклеотидов. Процессивность *Nei* тоже не зависела от расстояния между сайтами до 80 п. н. Такое поведение можно объяснить в рамках модели двух конформационных состояний поиска, предложенной в работе (Dunn et al., 2011). Согласно этой модели, одни молекулы движутся медленно, тесно связаны с ДНК и оценивают локальные параметры ДНК на соответствие ожидаемым параметрам мишени (сканирующая конформация), а другие — быстро диффундируют по ДНК и легко ее высвобождают (скользящая конформация). Если эти популяции медленно переходят друг в друга, значения P_{cc} в эксперименте с увеличением расстояния будут отражать долю молекул фермента в тесном состоянии с характерным расстоянием поиска $\gg 80$ п. н., в то время как остальные молекулы быстро высвобождают ДНК. Тогда, согласно модели, ~40% молекул *NEIL1* и 30% молекул *Nei* находятся в тесно связанном сканирующем состоянии (рис. 3А).

Так как *NEIL2* предпочитает в качестве субстрата не дцДНК, а структуры типа «глазок» и оцДНК, было решено проверить, может ли процессивный поиск лучше осуществляться на таких субстратах. Для одноцепочечного субстрата наблюдалась некоторая тенденция к повышению P_{cc} , которая не достигала статистической значимости. Между двуцепочечным субстратом и «глазком» не было статистически значимого различия. Эти данные вместе с отсутствием зависимости P_{cc} от концентрации K^+ и Mg^{2+} убедительно свидетельствуют о том, что *NEIL2* не использует процессивный механизм поиска мишеней в ДНК.

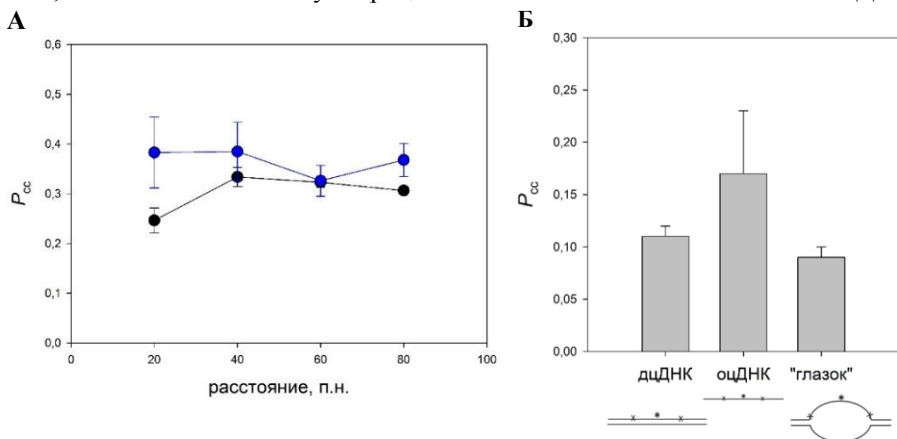


Рисунок 3. А — зависимость величины P_{cc} от расстояния между повреждениями для *Nei* (●) и *NEIL1* (●) в присутствии 25 мМ KCl. Б — коррелированное расщепление субстратов ферментом *NEIL2*. Значения P_{cc} для двуцепочечного (дцДНК), одноцепочечного (оцДНК) субстратов и «глазка».

Структуры связанных с ДНК молекул Fpg, Nei, и NEIL1 показывают, что у всех этих белков взаимодействие с ДНК организовано практически одинаково. Однако существенное различие между Fpg/NEIL1 с одной стороны и Nei/NEIL2/NEIL3 с другой заключается в организации триады аминокислот, которые интеркалируют в спираль ДНК для выявления повреждения и инициируют его выворачивание из ДНК. В Fpg и NEIL1 это абсолютно консервативная триада Met (Met80 в NEIL1), Arg (Arg117 в NEIL1) и Phe (Phe119 в NEIL1). Остаток Met расположен в петле между складками $\beta 4$ и $\beta 5$ в N-концевом β -сэндвич-доме, тогда как остатки Arg и Phe лежат в петле $\beta 7/\beta 8$ (рис. 4). У Nei все три аминокислотных остатка, функционально эквивалентных остаткам триады (Leu, Gln и Tyr) расположены в петле $\beta 4/\beta 5$, а $\beta 7/\beta 8$ полностью отсутствует. В белке NEIL2 сохраняется лишь два, а у NEIL3 — один остаток триады, петля $\beta 7/\beta 8$ у них также отсутствует, что, вероятно, отражает их предпочтение ДНК-субстратов, отличных от канонического дуплекса. Можно предположить, что наличие у Fpg и NEIL1 положительного заряда Arg непосредственно внутри дуплекса ДНК может быть одной из причин их более тесного взаимодействия и более выраженной процессивности по сравнению с незаряженными интеркалирующими остатками в Nei и NEIL2.

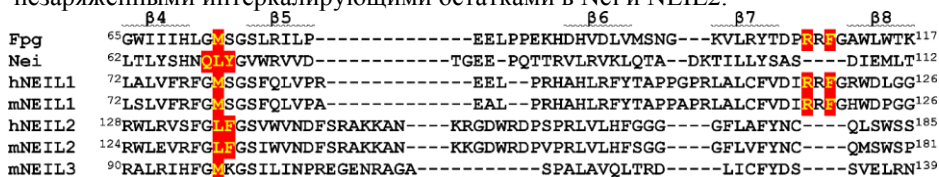


Рисунок 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей между β -складками $\beta 4$ – $\beta 8$ белков суперсемейства H2TH (Fpg *E. coli*, Nei *E. coli*, NEIL1 человека, NEIL1 мыши, NEIL2 человека, NEIL2 мыши, NEIL3 мыши). Интеркалирующая триада выделена красным.

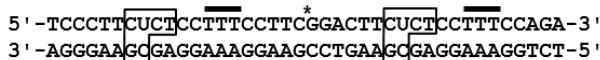
2. Процессивный поиск мишеней в присутствии объемных аддуктов и ДНК-связывающих лигандов Ung *E. coli*

В условиях клетки ДНК окружена множеством молекул, связанных с ней сильными или слабыми взаимодействиями, или даже ковалентно. Ферментам репарации приходится конкурировать с такими молекулами в процессе диффузии по контуру ДНК, и в целом показано, что ферменты способны вести процессивный поиск *in vivo*, однако неизвестно, как именно ведет себя молекула фермента при блокировании бороздок другими молекулами. В работе был исследован коррелированный поиск мишеней ферментом Ung из *E. coli* при блокировании бороздок ДНК крупным ковалентным аддуктом или лигандами, специфически связывающимися с малой или большой бороздками ДНК.

В качестве модели ковалентного аддукта использовали аналог тимина с присоединенным к нему остатком флуоресцеина через аминоксильный линкер (T-FAM, рис. 5, Б (I)). Аддукт располагается в большой бороздке ДНК.

Для сравнения значений P_{cc} использовали одноцепочечные и двуцепочечные субстраты, содержавшие Т-ФАМ, или в той же позиции каноническое основание Т и радиоактивную метку. Значения P_{cc} для двуцепочечного субстрата с Т-ФАМ (рис. 6, ○) оказались значительно ниже, чем для одноцепочечного субстрата с Т-ФАМ (рис. 6, Δ), а также в сравнении с субстратами, не содержащими молекулу флуоресцеина между повреждениями (рис. 6Б).

А



Б

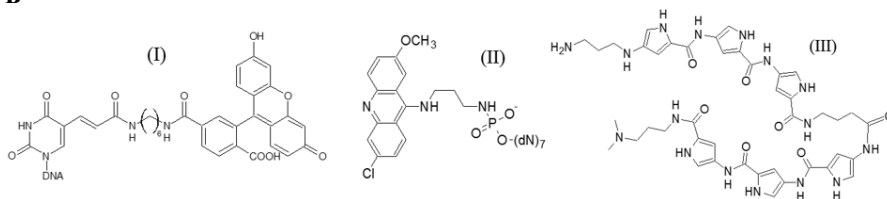


Рисунок 5. Структуры субстратов, заместителей и лигандов, использованных в работе. А — структура ДНК-субстрата для изучения процессивности Ung. Рамкой обведены звенья ДНК, образующие связи с молекулой Ung. Предполагаемые места связывания малобороздочного лиганда и триплексообразующего олигонуклеотида указаны линиями сверху и снизу от последовательности соответственно; * = ^{32}P . Б — структура Т-ФАМ (I), триплексообразующего ОДН (II) и малобороздочного лиганда (III).

Таким образом, присутствие объемного ковалентного аддукта между сайтами связывания фермента значительно снижает способность фермента Ung к одномерной диффузии по двуцепочечной ДНК, но не влияет на механизм поиска повреждений в одноцепочечной. Непосредственное столкновение молекулы фермента с остатком FAM маловероятно, так как он располагается в большой бороздке, а Ung сканирует ДНК, передвигаясь по малой бороздке. Вероятно, остаток флуоресцеина изменяет пространственную структуру самой ДНК, интеркалирует внутрь дуплекса или значительно влияет на его жесткость. Кроме того, отсутствие влияния FAM на P_{cc} для оцДНК говорит о значительном отличии между перемещением Ung по одноцепочечной и двуцепочечной ДНК.

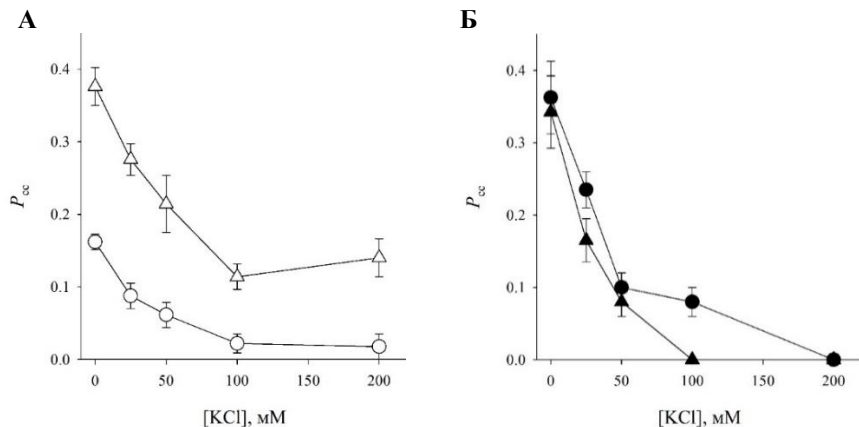


Рисунок 6. Расщепление одноцепочечного и двуцепочечного субстратов, содержащих два основания урацила и остаток T-FAM между ними. А — зависимость P_{cc} от концентрации KCl для одноцепочечных (треугольные символы) и двуцепочечных (круглые символы) субстратов, содержащих T-FAM. Б — зависимость P_{cc} от концентрации KCl в среде для одноцепочечных (треугольные символы) и двуцепочечных (круглые символы) субстратов, не содержащих T-FAM.

Для изучения влияния нековалентно связанных с ДНК молекул на эффективность сканирования Ung были синтезированы триплексобразующий ОДН, содержащий интеркалирующий остаток (6-хлор-2-метоксиакридин-9-ил)пропан-1,3-диамина (рис. 5, Б (II)) в качестве лиганда, блокирующего большую бороздку, и лиганд имидазольного ряда (рис. 5, Б (III)), блокирующий малую бороздку. На рис. 5А показаны предполагаемые места связывания этих лигандов с исследуемым субстратом. Поскольку достичь абсолютной специфичности таких лигандов к нуклеотидной последовательности практически невозможно, вместе с определением P_{cc} параллельно определяли ингибирование активности фермента в присутствии лиганда.

Влияние триплексобразующего ОДН как на активность Ung, так и на процессивный поиск, было слабым вплоть до концентраций ~50–100 мкМ (рис. 7, круглые символы). При высоких концентрациях значительно сильнее подавлялась активность, чем P_{cc} , что, вероятно, связано с конкурентным ингибированием Ung коротким одноцепочечным ОДН. В случае с малобороздочным лигандом наблюдался значительный спад и активности, и P_{cc} , уже при концентрации 1 мкМ (рис. 7, треугольные символы), что согласуется с литературными значениями сродства имидазольных малобороздочных лигандов к ДНК. Сходный профиль снижения обоих параметров говорит о том, что процессивный поиск в присутствии лиганда возможен, однако связывание лиганда вблизи сайта посадки Ung (рис. 5А) непосредственно препятствует связыванию молекулы фермента.

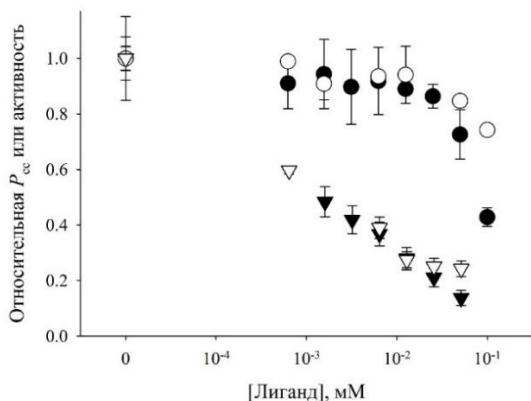


Рисунок 7. Сравнительное влияние малобороздочного (треугольные символы) и триплексобразующего (круглые символы) лигандов на активность (черные символы) и вероятность коррелированного расщепления (белые символы) субстрата ферментом Ung. По оси ординат отложены значения P_{cc} и скорости накопления продукта расщепления субстрата, содержащего одно повреждение, нормированные на максимум соответствующей величины при отсутствии лиганда.

Таким образом, Ung в значительной степени использует процессивный поиск, преодолевая препятствия в виде нековалентно связанных с ДНК молекул, вероятно, за счет хоппинга (процессивного механизма, при котором белок осуществляет небольшие прыжки в непосредственной близости от ДНК, при этом электростатическое взаимодействие с ДНК несколько ослабевает). Однако ковалентно связанные объемные аддукты сильно снижают процессивность на двуцепочечной ДНК, что говорит о важном вкладе конформационных искажений ДНК в процессе поиска.

3. Процессивность UNG вируса осповакцины

Почти все изученные ДНК-гликозилазы обладают способностью к процессивному поиску повреждений в ДНК, однако только для vvUNG показано ее участие в обеспечении репликативной процессивности. Белок D4 (vvUNG) в качестве субъединицы гетеродимера вместе с белком A20 образует фактор процессивности вирусной ДНК-полимеразы E9. В данном разделе работы была изучена собственная процессивность vvUNG для оценки ее роли в составе репликативного комплекса, а также изучено влияние потенциальных ингибиторов урацил-ДНК-гликозилаз на активность и процессивность vvUNG.

3.1. Механизм поиска мишеней vvUNG

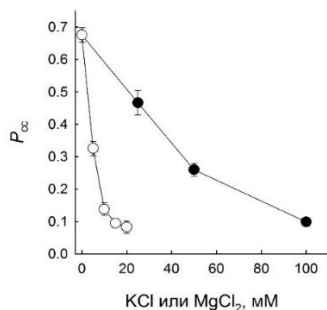
Для определения механизма поиска исследовали влияние на P_{cc} ионов K^+ и Mg^{2+} . В условиях низкой ионной силы P_{cc} составляла около 0,7 и значительно снижалась с постепенным увеличением концентрации KCl до 200 мМ (рис. 8А, ●), что указывает на активное использование вирусной UNG процессивного поиска, вероятно, с существенным вкладом механизма слайдинга (скольжения, диффузии белка вдоль цепи ДНК). Присутствие $MgCl_2$ оказывало еще более значительный эффект, что объясняется гораздо более

прочным координационным взаимодействием ионов Mg^{2+} с ДНК (рис. 8А, $\circ$) по сравнению с одновалентными катионами.

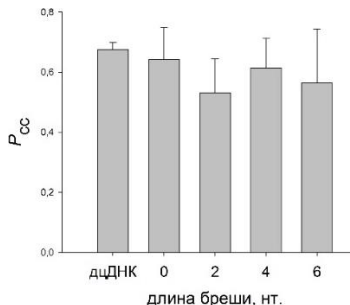
Известно, что урацил-ДНК-гликозилазы эффективно работают и на одноцепочечной, и на двуцепочечной ДНК. Из рис. 8Б видно, что UNG осповакцины может преодолевать разрывы и короткие брешы (2, 4 и 6 нуклеотидов) без высвобождения ДНК. Значения P_{cc} были сходными во всех случаях. Таким образом, одноцепочечная ДНК не представляет препятствия для перемещения vvUNG.

Введение в ДНК-дуплекс между повреждениями объемной флуоресцеиновой группы снижало P_{cc} при 0 мМ соли с 0,69 до 0,42 (рис. 8В), следовательно, около 40% событий одномерной диффузии на расстояние 20 п. н., которые исчезают в присутствии T-FAM, приходится на слайдинг. При этом фермент все же способен преодолевать препятствие с остаточной эффективностью, вероятно, посредством хоппинга. При 50 мМ KCl значения P_{cc} в присутствии и в отсутствие флуоресцеина примерно равны, что говорит о том, что с увеличением ионной силы способность к процессивному поиску полностью осуществляется за счет хоппинга.

А



Б



В

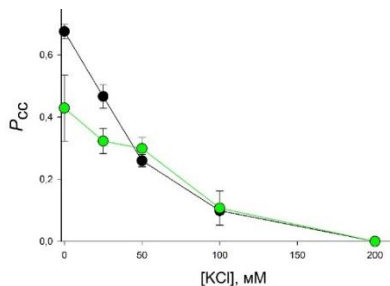


Рисунок 8. А — Влияние ионов K^+ ($\bullet$) и Mg^{2+} ($\circ$) на процессивность vvUNG. Б — зависимость величины P_{cc} vvUNG от размера брешы в комплементарной цепи. Длина брешы 0 соответствует отсутствию одного фосфата. В — зависимость величины P_{cc} vvUNG от концентрации KCl на субстрате с FAM ($\bullet$), с ^{32}P ($\bullet$).

Чтобы прояснить природу эффективной транслокации vvUNG по ДНК, методом микромасштабного термофореза для измерения сродства вирусной UNG к одноцепочечной и двуцепочечной ДНК, как неповрежденной, так и содержащей тетрагидрофуран (F) — аналог АП-сайта, имитирующий продукт

реакции. Сродство UNG ко всем изученным субстратам было одного порядка (таблица 1). F-содержащие ОДН связывались несколько лучше, но предпочтение поврежденной ДНК было не более чем трехкратным. Полученные данные свидетельствуют о том, что вирусная UNG обладает практически одинаковой способностью связываться с любой ДНК.

Таблица 1. Сродство vvUNG к поврежденной и неповрежденной ДНК

Субстрат / Код ОДН	K_D , мкМ
C (13C)	$7,0 \pm 2,0$
T (13T)	12 ± 7
F (13F)	$4,0 \pm 2,0$
C:G (13C//13comG)	$7,2 \pm 1,5$
T:A (13T//13comA)	$8,7 \pm 1,7$
F:G (13F//13comG)	$6,2 \pm 2,3$
F:A (13F//13comA)	$6,7 \pm 1,4$

Для оценки эффективного расстояния поиска для вирусной UNG была сконструирована серия субстратов, в которых два основания Ura были разделены неповрежденными промежуточными последовательностями разной длины (19, 20, 40, 60 и 80 п. н.). Значения P_{cc} снижались от 0,67 для расстояния 19 п. н. до 0,20 для расстояния 80 п. н. между повреждениями (рис. 9, Δ). При этом значения P_{cc} на всем исследуемом диапазоне расстояний были выше значений Ung *E. coli*, полученных в той же системе субстратов в тех же условиях (Mechetin, Zharkov, 2011), где P_{cc} снижалась от 0,39 до 0,12 (рис. 9, $\bullet$).

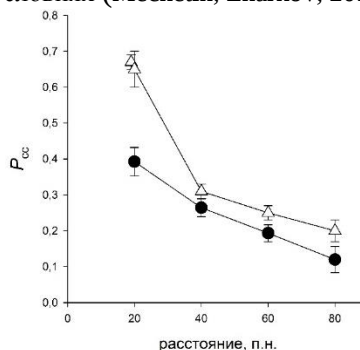


Рисунок 9. Зависимость величины P_{cc} от расстояния между повреждениями для Ung *E. coli* (●) (Mechetin, Zharkov, 2011) и vvUNG (Δ).

Вероятность коррелированного расщепления P_{cc} выражается как произведение двух величин: вероятности транслокации от одного сайта к другому (P_T) и вероятности выщепления урацила при его обнаружении (P_E) (Porecha, Stivers, 2008). Значение P_E всегда менее 1 из-за кинетической конкуренции между одномерной диффузией и верификацией повреждения перед гидролизом N-гликозидной связи. Чтобы из P_{cc} выделить

транслокационную компоненту P_T , было необходимо определить значение P_E в отдельном кинетическом эксперименте. Схема эксперимента (рис. 10, А) была практически идентична описанной в (Porecha, Stivers, 2008) для Ung *E. coli* и в (Schonhoft, Stivers, 2012) для UNG человека, с небольшими изменениями. vvUNG смешивалась с меченым субстратом в аппарате быстрого гашения потока, через 2,5 мс либо сразу гасили реакцию щелочью, либо запускали в смесь ловушку (гепарин) и затем гасили щелочью через 5–20 с. Экстраполяция накопления продукта на нулевое время с поправкой на количество продукта, успевшего образоваться за 2,5 мс (в данном случае $[P]_q = 6,1 \text{ нМ}$), дает количество продукта, образованного в результате одного акта связывания с повреждением. Отношение количества этого продукта в точке 0 ($[P]^* = 10,6 \text{ нМ}$) к экстраполированному количеству субстрата в точке 0 ($[S]^* = 3,3 \text{ нМ}$) эквивалентно отношению константы скорости разрыва гликозидной связи (k_{ex}) к константе скорости непродуктивного распада комплекса ES без разрыва связи (k_{off}). Вероятность выщепления P_E можно рассчитать как $P_E = k_{ex}/(k_{ex}+k_{off}) = [P]^*/([P]^*+[S]^*)$ (рис 10, Б). Для vvUNG эта величина составила 0,76, что довольно близко к $P_E = 0,73$ для Ung *E. coli* и 0,81 для UNG человека. Полученное значение $P_E = 0,76$ использовали для расчета P_T из P_{cc} в моделировании, описанном в следующем разделе.

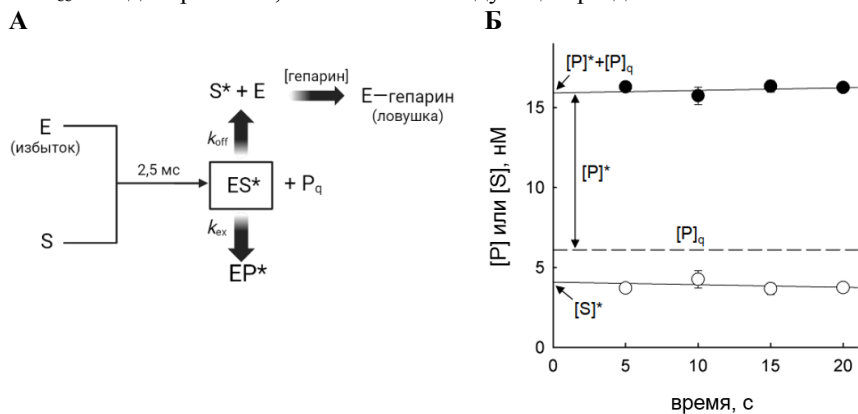
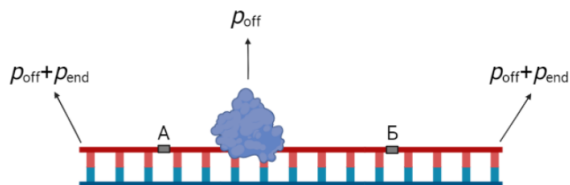


Рисунок 10. Определение величины вероятности удаления основания P_E с помощью метода остановленной струи. А — общая схема эксперимента. Б — график накопления продукта и расходования субстрата от времени, P^* и S^* — продукт и субстрат, образованные за время инкубации в присутствии гепарина.

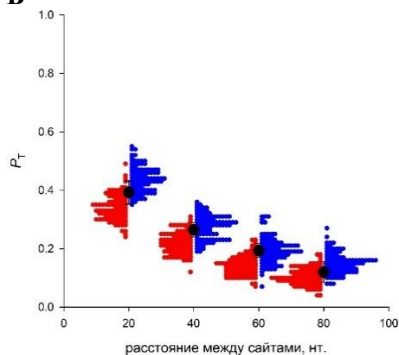
Для расчета характеристик транслокации UNG была разработана модель одномерного случайного блуждания с потерями. Модель представляет собой одномерную конечную решетку, по которой движется частица размером в 1 узел решетки. На каждом шаге частица может необратимо покинуть внутреннюю позицию решетки с вероятностью p_{off} или краевую позицию с большей вероятностью $p_{off}+p_{end}$ (рис. 11А). Расчет p_{off} и p_{end} был осуществлен

путем подгонки модельных проходов по решеткам различной длины (всего $\sim 3 \times 10^9$ проходов) к экспериментальным данным зависимости P_T от расстояния между сайтами.

А



Б



В

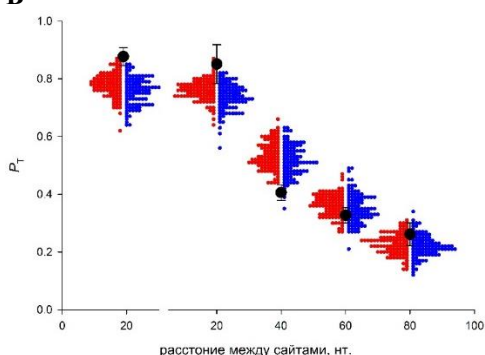


Рисунок 11. Моделирование одномерного случайного блуждания с потерями. А — модель одномерного блуждания по одномерной сетке с потерями со стартом и финишем в узлах «А» и «Б». Б-В — графики зависимости P_T (●) от расстояния между сайтами для Ung *E. coli* (Б) (значения P_T из (Mechetin, Zharkov, 2011)) и vvUNG (В). Красные и синие точки показывают долю успешных проходов с началом от узла «А» и узла «Б» соответственно.

Для валидации метода результаты моделирования сначала получили для Ung *E. coli* (рис. 11Б). Полученные моделированием значения ($p_{off} = 4,99 \times 10^{-5}$ и $p_{end} = 0,179$) достаточно хорошо согласуются с литературными, полученными аналитическим решением уравнения Белоцерковского–Зарлинг ($p_{off} \sim 1 \times 10^{-4}$ и $p_{end} = 0,17$) (Mechetin, Zharkov, 2011). Подгонка результатов моделирования к экспериментальным данным для vvUNG (рис. 11В) неожиданно дала в 5 раз более высокое значение $p_{off} = (2,41 \pm 0,07) \times 10^{-4}$ и в ~ 30 раз более низкое $p_{end} = (6,06 \pm 0,33) \times 10^{-3}$ по сравнению с Ung *E. coli*. Интересно, что вирусная UNG гораздо меньше подвержена потерям на концах дуплекса, чем бактериальная. Такое повышенное сродство поксвирусной UNG к концам может иметь биологический смысл, так как в процессе репликации вирусного генома в областях повторов формируются самозатравочные шпильки, и репликативный комплекс должен оставаться связанным с ними.

Моделирование одномерного блуждания с экспериментально полученными кинетическими параметрами дало значение вероятности потери фермента на каждом шаге $p_{\text{off}} \sim 2,4 \times 10^{-4}$, что соответствует среднему смещению $p_{\text{off}}^{-1/2} \approx 65$ нт на ассоциацию при полностью случайном блуждании (Halford, Marko, 2004). Число шагов, после которых 50% молекул белка остаются связанными с ДНК ($n_{1/2}$) можно найти из уравнения $(1 - p_{\text{off}})^{n_{1/2}} = 1/2$, следовательно, $n_{1/2} = -1/\log_2(1 - p_{\text{off}})$. Среднее смещение белка от исходной точки в этом случае будет равно $n_{1/2} \approx 2900$ нт на ассоциацию. Репликативный комплекс в процессе синтеза ДНК движется однонаправленно, и поскольку распределение расстояний смещения при однонаправленном движении асимметрично, модальная величина смещения $\langle D \rangle$ (т. е. смещения большинства белковых молекул) не равна $n_{1/2}$ и может быть найдена из уравнения $\langle D \rangle = -1/\ln(1 - p_{\text{off}})$ (Halford, Marko, 2004). Значение $\langle D \rangle$ составляет ≈ 4200 нт на ассоциацию.

Изолированная ДНК-полимераза вируса осповакцины практически дистрибутивна (≤ 10 нуклеотидов, включенных за одно связывание), но в комплексе с субъединицами A20 и vvUNG она за одно событие связывания может реплицировать матрицу 2000–7000 нт (McDonald et al., 1994). Таким образом, собственная процессивность vvUNG имеет тот же порядок величины, что и процессивность полного репликативного комплекса вируса. Вполне возможно, что полностью собранный комплекс более процессивен, чем его отдельные субъединицы. Если предположить, что полный комплекс распадается, когда субъединицы полимеразы и vvUNG одновременно теряют связь с ДНК, и для изолированной ДНК-полимеразы оценить p_{off} в $\sim 0,2$ (тогда $(1 - 0,2)^{10} \approx 0,1$, что соответствует $\sim 10\%$ молекул полимеразы, которые остаются связанными с ДНК после включения 10 нт, и модальному значению 4–5 встраиваемых нуклеотидов на одно событие связывания), общее значение $p_{\text{off}} = p_{\text{off}}(\text{vvUNG}) \times p_{\text{off}}(\text{ДНК-полимеразы}) = 4,94 \times 10^{-5}$. При однонаправленном движении это соответствует среднему смещению $\sim 14\,000$ нт или $\sim 21\,000$ модальному количеству встроенных нуклеотидов.

3.2 vvUNG как мишень для противовирусной терапии

Процесс репликации — распространенная мишень для терапии бактериальных и вирусных инфекций. В случае ортопоксвирусов, где репликативный комплекс состоит из трех белков, один из которых — урацил-ДНК-гликозилаза — играет ключевую роль фактора процессивности, представляется целесообразным искать терапевтические молекулы, которые будут ингибировать одномерную диффузию этого белка и тем самым подавлять репликацию.

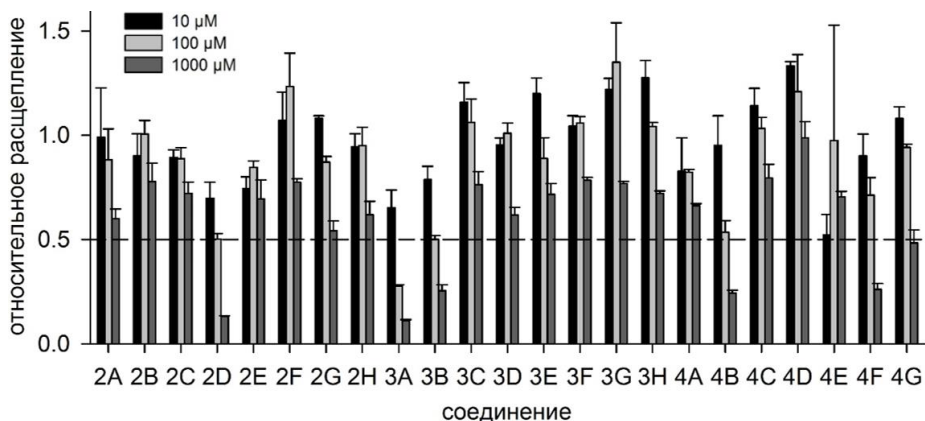
В работе была использована библиотека химических соединений — потенциальных ингибиторов UNG, отобранных на основе компьютерного

моделирования лигандов в активном центре UNG человека. Оказалось, что некоторые из них ингибировали вирусную UNG даже значительно сильнее, чем UNG человека: для 13 соединений наблюдался дозозависимый эффект, а 4 из них (2D, 3A, 3B, 4B) подавляли активность вирусной UNG на ~50% и более при концентрации 100 мкМ (рис. 12А). Все наиболее активные ингибиторы содержали общий фрагмент РyОЗ (рис. 12Б). Для наилучших ингибиторов vvUNG (2D, 3A, 3B, 4B и 4F) к. х. н. Чиловым Г. Г. (ИОХ РАН) был проведен их докинг со структурой белка. Во всех случаях молекула ингибитора хорошо встраивалась в урацилсвязывающий карман vvUNG. Хотя известно, что каталитическая активность UNG и не нужна непосредственно для репликации вируса, она необходима для его вирулентности, поэтому ингибирование активного центра UNG можно рассматривать как стратегию разработки противовирусных агентов.

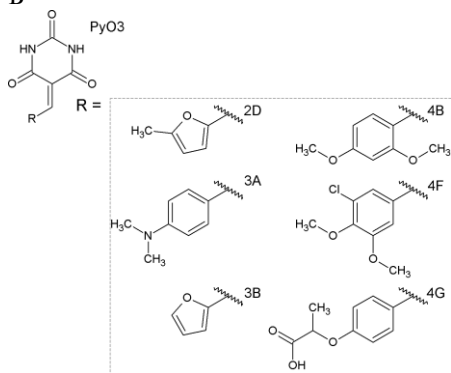
Таким образом, был выявлен фармакофор, обладающий умеренной цитотоксичностью ($EC_{50} \sim 100$ мкМ (Grin et al., 2021)) и оценочной эффективной концентрацией ингибирования ~10–100 мкМ. Присоединение к РyОЗ дополнительных групп для стабилизации взаимодействий в ДНК-связывающей бороздке могут уменьшить токсичность, а также улучшить афинность и селективность по отношению к UNG из различных организмов.

Представлял интерес вопрос, влияет ли ингибирование vvUNG производными РyОЗ на его способность оставаться процессивной субъединицей. Из библиотеки ингибиторов было изучено три соединения, из которых 2F не проявляло ингибирующих свойств, тогда как 2D и 3A достаточно эффективно ингибировали активность vvUNG (рис. 12А). В присутствии 2F до концентрации 1000 мкМ никаких изменений в P_{cc} не наблюдалось (рис. 12Б). 2D вызвало снижение P_{cc} на 15% при самой высокой используемой концентрации (1000 мкМ), однако оно не достигало статистической значимости. Эффект ингибитора 3A был более выраженным: P_{cc} снижалась на ~15% при 100 мкМ и на 37% при 1000 мкМ концентрации соединения; различия с контролем без ингибитора достигали статистической значимости ($p < 0,01$). Хотя степень подавления процессивности была невелика, эти результаты показывают, что транслокация UNG осповакцины может ингибироваться низкомолекулярными соединениями, которые предположительно конкурируют с ДНК за контакты в месте связывания повреждения или вблизи него.

А



Б



В

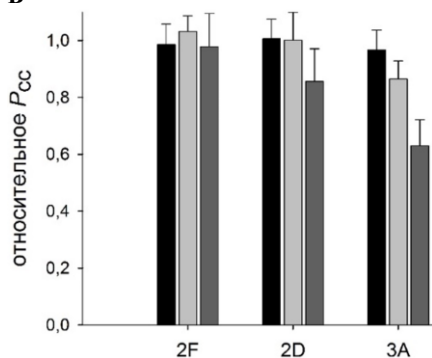


Рисунок 12. А — влияние соединений на активность vvUNG. Концентрации ингибиторов: 10 мкМ (черные столбцы), 100 мкМ (светло-серые) и 1000 мкМ (темно-серые). Активность нормирована на эффективность расщепления в отсутствии ингибиторов. Б — структуры ингибиторов 2D, 3A, 3B, 4B, 4E, 4F и 4G. Все соединения содержат общий фрагмент PyO3. В — ингибирование процессивного поиска vvUNG производными PyO3. Зависимость P_{cc} , нормированная на контроль без ингибиторов, от концентрации ингибитора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги работы в значительной мере расширяют понимание молекулярных основ функций ДНК-гликозилаз в живых системах. При изучении процессивности белков суперсемейства H2TH было показано, что, несмотря на гомологию и общую пространственную укладку этих ферментов, их способность вести процессивный поиск мишеней варьирует в широком диапазоне — от близких к единице значений P_{cc} для Fpg, отражающих высокоэффективный процессивный поиск, до стремящихся к нулю значений для NEIL2, соответствующих практически полностью дистрибутивному поиску. В клетке Fpg, NEIL1 и Nei, вероятно, ищут повреждения в ДНК самостоятельно, в то время как NEIL2 осуществляет этот процесс в комплексе с РНК-полимеразой II, что может объяснить низкую процессивность этого фермента в изолированном виде.

Работа внесла существенный вклад в развитие биохимического подхода к определению процессивности ферментов с помощью ДНК-субстратов, содержащих два специфических сайта. В частности, для исследования влияния на процессивный поиск внутриклеточных молекул, взаимодействующих с ДНК, были предложены соединения небелковой природы, связывающиеся с ДНК нековалентно в малой и большой бороздках. Показано, что Ung *E. coli* способна преодолевать такие нековалентные лиганды в процессивном режиме, однако ковалентные аддукты ДНК значительно снижают процессивность фермента на двуцепочечной ДНК, вероятно, за счет искажения ее структуры и изменения жесткости.

Значительная часть работы была посвящена характеристике фактора процессивности репликативного комплекса вируса осповакцины — урацил-ДНК-гликозилазы vvUNG. Проведенные в работе количественные оценки показывают, что присутствие субъединицы vvUNG способно повысить модальную процессивность вирусной ДНК-полимеразы с <10 до нескольких тысяч включенных нуклеотидов за один акт ассоциации. Более того, поскольку vvUNG как процессивная субъединица не похожа по структуре на фактор процессивности ДНК-полимеразы человека PCNA, vvUNG представляет собой удобную мишень для разработки новых противовирусных средств. Идентифицированные в работе соединения класса тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиденов могут стать прототипами таких соединений.

В целом результаты работы подтверждают, что белки, узнающие специфичные элементы ДНК, сочетают процессивный и дистрибутивный режимы для достижения наиболее эффективного поиска своих мишеней в ядрах эукариотических клеток, бактериальных нуклеоидах и, возможно, вирусных «репликативных фабриках». Примеров изучения процессивности в живых клетках пока еще очень мало, и только разработка методов *in situ* может дать ответ, согласуются ли механизмы, предложенные на основе экспериментов *in vitro*, с реальной динамикой поиска повреждений ферментами репарации.

ВЫВОДЫ

1. Для ферментов эндонуклеазы VIII *E. coli* (Nei) и гомологов эндонуклеазы VIII NEIL1 и NEIL2 мыши наблюдаются значительные различия в механизмах поиска поврежденных оснований в ДНК. Для этих ферментов впервые определены значения вероятности коррелированного расщепления субстрата (P_{cc}) — параметра, характеризующего процессивный поиск мишеней. Значения P_{cc} в условиях низкой ионной силы ($0,47 \pm 0,05$ для NEIL1, $0,28 \pm 0,01$ для Nei и $0,11 \pm 0,01$ для NEIL2), а также характер их зависимости от концентрации одно- и двухвалентных катионов свидетельствуют о том, что NEIL1 использует при поиске процессивный механизм, NEIL2 к нему практически не способен, а для фермента Nei наблюдается промежуточная ситуация. Отсутствие выраженной зависимости от расстояния между повреждениями для NEIL1 и Nei согласуется с гипотезой о существовании двух конформационных популяций с характерной дистанцией поиска более 80 нуклеотидов в сканирующей конформации.
2. Эффективность транслокации урацил-ДНК-гликозилазы *E. coli* (Ung) вдоль двуцепочечной ДНК зависит от типа препятствий. P_{cc} значительно снижается при наличии ковалентного аддукта в большой бороздке, который может затруднять конформационные изменения ДНК, сопровождающие передвижение фермента по ней. Однако фермент способен преодолевать нековалентно связанные лиганды как в малой, так и в большой бороздке ДНК.
3. Фермент vvUNG вируса осповакцины осуществляет процессивный поиск мишеней в ДНК, более эффективный по своим значениям P_{cc} ($0,68 \pm 0,02$ в условиях низкой ионной силы), чем поиск ферментом Ung *E. coli* ($0,30 \pm 0,03$ в тех же условиях). Зависимость значений P_{cc} от концентрации катионов указывает на основной вклад электростатических взаимодействий в удержание фермента в комплексе с ДНК в ходе поиска. Высокая процессивность поиска согласуется с ролью vvUNG как фактора процессивности репликативного комплекса вируса осповакцины. Моделирование процесса одномерного блуждания vvUNG позволило рассчитать значение вероятности диссоциации фермента на каждом шаге ($p_{off} \sim 2,4 \times 10^{-4}$), что в однонаправленно движущемся репликативном комплексе соответствует модальному смещению на ~ 4200 нуклеотидов за один акт ассоциации. Найдены соединения класса тетрагидро-2,4,6-триоксопиримидинилиденов, обладающие потенциалом использования в противовирусной терапии за счет ингибирования как активности, так и процессивности vvUNG.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Мечетин Г. В., Дятлова Е. А., Синяков А. Н., Рябинин В. А., Воробьев П. Е., Жарков Д. О. Коррелированный поиск мишеней урацил-ДНК-гликозилазой в присутствии объемных аддуктов и ДНК-связывающих лигандов // Биоорганическая химия. – 2017. –Т. 43. –No. 6. –С. 29–34.
2. Grin, I. R., Mechetin, G. V., Kasymov, R. D., Diatlova, E. A., Yudkina, A. V., Shchelnunov, S. N., Gileva I.P., Denisova A.A., Stepanov G.A., Chilov G.G., Zharkov, D. O. A new class of uracil–DNA glycosylase inhibitors active against human and vaccinia virus enzyme. // Molecules. –2021. –V. 26. –Article No. 6668.
3. Diatlova E. A., Mechetin G. V., Zharkov D. O. Distinct mechanisms of target search by endonuclease VIII-like DNA glycosylases // Cells. –2022. –V. 11. – Article No. 3192.