

УДК 577.1

Синтетические повреждения с флуоресцеинкарбамоильной группировкой как аналоги объемных повреждений, удаляемых системой эксцизионной репарации нуклеотидов. Сравнительное исследование свойств

А. А. Попов, В. М. Голышев, Л. С. Королева, К. Д. Назаров, Р. О. Анарбаев, И. О. Петрусева
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090
Россия

E-mail: irapetru@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.05.2024

Принята к печати 05.07.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27419

РЕФЕРАТ Система эксцизионной репарации нуклеотидов млекопитающих (ЭРН) с широкой субстратной специфичностью удаляет из ДНК объемные повреждения. В работе системы ЭРН принимает участие более 30 белков. Большое число белков-участников, существование двух ветвей ЭРН (общегеномная репарация и репарация, ассоциированная с транскрипцией), необходимость в использовании протяженных ДНК-субстратов, а также объемные повреждения, индуцируемые в ДНК в ходе химиотерапии, направляют усилия исследователей в сторону поиска эффективных методов оценки активности ЭРН и модельных ДНК, имеющих выраженные субстратные свойства в реакции удаления повреждения. В данной работе проведено сравнительное исследование свойств модельных ДНК, содержащих объемные повреждения, одно из которых – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nFluL), эффективно распознается и элиминируется из ДНК системой ЭРН; второе, N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-3-амино-1,2-пропандиол (nFluS), ранее для создания субстратов системы ЭРН не использовали. Оценка эффективности специфической эксцизии этих повреждений белками ЭРН-компетентного клеточного экстракта, проведенная методом 3'-концевого мечения продуктов эксцизии, показала, что удаление nFluS происходит в 2 раза более эффективно. Результаты сравнительного анализа влияния nFluL и nFluS на геометрию и термостабильность ДНК-дуплексов, а также результаты спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования nFluL- и nFluS-ДНК комплементарной цепью ДНК позволяют заключить, что отсутствие в структуре nFluS протяженного гибкого линкера меняет характер взаимодействия объемного флуоресцеинового фрагмента ненуклеозидного повреждения с азотистыми основаниями соседних звеньев дцДНК и ассоциировано с эффективным удалением этого синтетического аналога объемного повреждения из модельного ДНК-субстрата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА эксцизионная репарация нуклеотидов, объемные повреждения ДНК, спектрометрическое титрование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов; ОГ-ЭРН – общегеномная ЭРН; nFluL – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nFluS – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-3-амино-1,2-пропандиол; ОДН – олигодезоксирибонуклеотид.

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание целостности и стабильности генома обеспечивается механизмами репарации ДНК. Одним из таких механизмов является эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН), ответственная за удаление объемных повреждений. Как правило, это ковалентные аддукты, присутствие кото-

рых вносит существенные изменения в регулярную структуру ДНК. В результате многостадийного процесса, в ходе которого белки последовательно формируют на ДНК в районе повреждения многосубъединичные комплексы переменного состава, повреждение распознается и удаляется из ДНК в составе окружающего его фрагмента цепи раз-

мером от 24 до 32 нуклеотидов. Исходная последовательность восстанавливается действием репарационных полимераз и ДНК-лигаз с использованием неповрежденной цепи ДНК в качестве матрицы. Различают две ветви ЭРН – независимую от функционального состояния генома, так называемую общегеномную ЭРН (ОГ-ЭРН), и репарацию, ассоциированную с транскрипцией [1, 2].

Система ЭРН характеризуется широкой специфичностью и удаляет из ДНК повреждения разной структуры: продукты, возникающие при воздействии УФ- и радиоактивного излучения, химически активных веществ из внешней среды, например, полициклических ароматических углеводородов и их активных метаболитов, диолэпоксидов. Действие многих химиопрепаратов также основано на формировании объемных аддуктов с ДНК. Изучению механизма ЭРН посвящено большое количество исследований. К настоящему времени обнаружены основные белки-участники ЭРН в клетках живых организмов, определены их функции, характер белковых взаимодействий и основные этапы данного процесса [1, 3]. Тем не менее многие детали механизма ЭРН и работы конкретных белков остаются неясными и продолжают изучаться на уровне белково-нуклеиновых комплексов [4–7]. Большой интерес – как фундаментальный, так и прикладной – вызывает сравнительная оценка активности ЭРН *in vitro*. Для оценки активности ОГ-ЭРН в таких исследованиях наиболее широко используются модельные субстраты, представляющие собой протяженные (не менее 120 п.н.) линейные ДНК-дуплексы, одна из цепей которых содержит во внутренней позиции объемное повреждение [8–11]. Подобные дуплексы различной длины используют и при изучении механизмов взаимодействия с поврежденной ДНК рекомбинантных белков, отвечающих за протекание обеих ветвей ЭРН [7, 12], а также при изучении функционирования ЭРН в контексте нуклеосом [4].

Модельные ДНК часто создают с использованием синтетических аналогов повреждений, вводимых в ДНК с помощью автоматического синтеза, что налагает определенные требования на свойства включаемого в цепь ДНК модифицированного звена [13]. Таким образом, поиск аналогов объемных

повреждений, структура которых, с одной стороны, обеспечивает их эффективное удаление системой ЭРН, а с другой – позволяет стабильно и с высокой эффективностью встраивать модифицированные звенья в модельные ДНК, является актуальной задачей. Модельные ДНК, содержащие такие повреждения, могут использоваться для оценки активности системы ЭРН, в том числе в практических целях, для понимания того, насколько активно те или иные клетки могут противостоять появлению индуцированных проведением химиотерапии или спонтанных повреждений, а также как инструмент для изучения деталей механизма работы этой системы репарации.

В данной работе предпринято сравнительное изучение свойств модельных ДНК-дуплексов, содержащих синтетические объемные повреждения, различающиеся способом соединения N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоильного фрагмента с пропандиольной вставкой. С использованием ДНК, содержащей N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nFluL), который эффективно удаляется белками системы ЭРН, проведены сравнительные исследования активности ЭРН в экстрактах клеток различных млекопитающих [14–17]. N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-3-амино-1,2-пропандиол (nFluS) в качестве модельного повреждения ранее не исследовали (рис. 1).

Структура повреждения nFluS, не содержащего гексаноильный линкер, выбрана на основании результатов наших работ, в которых была проанализирована эффективность первичного распознавания комплексами белка ХРС участка ДНК, содержащего повреждение, и проверки наличия в дестабилизированной области дцДНК объемного повреждения, осуществляемой АТФ-зависимой 5'→3'-хеликазой XPD – субъединицей комплекса ТФIIH. Выбрав для анализа несколько модельных ДНК, содержащих повреждения, которые с разной эффективностью удаляются белками системы ЭРН, мы показали, что самое высокое сродство XPD проявляет к nFlu-содержащей модельной ДНК [18]. Результаты моделирования молекулярной динамики показали, что наличие протяженного гибкого линкера позволяет флуоресцеиновому фрагменту менять расположение и взаимодействовать с несколь-

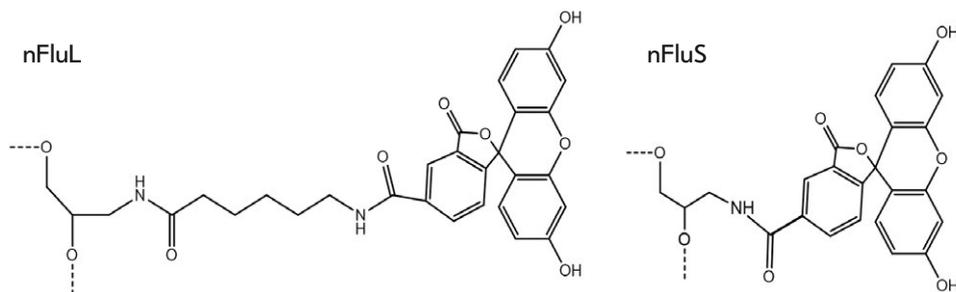


Рис. 1. Синтетические аналоги повреждений, используемые в работе. nFluL – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nFluS – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)]-3-амино-1,2-пропандиол

Таблица 1. ОДН, использованные в работе

№	Последовательность	Длина, н.	Описание
1	P-5'-atccagggcgacggtg	16	Немодифицированная цепь (серединное звено)
2	P-5'-atccagggm ^S gacggtg	16	ОДН с нуклеотидным звеном, несущим остаток флуоресцеина (nFluS), для включения в верхнюю цепь (серединное звено, ОДН-2)
3	P-5'-atccagggm ^L gacggtg	16	ОДН с нуклеотидным звеном, несущим остаток флуоресцеина и с линкером на основе аминокислотной кислоты (nFluL), для включения в верхнюю цепь (серединное звено верхней цепи, ОДН-3)
4	P-5'-caccgtcgccctggat	16	Нижняя цепь без модификации
5	5'-tggacgatatcccgaagagcccgccagctaccg-gcataaccaagcctatgcctacagc	59	5'-компонента для верхней цепи (левое плечо верхней цепи)
6	P-5'-ccgaggatgacgatgagcgcattgtagattcat acacgggtgctgactgcgtagcaatt	62	3'-компонента для верхней цепи (правое плечо верхней цепи)
7	5'-catctcggcaccgtcgccctggatgctgtaggcatag	38	Комплементарная цепь для лигирования трех фрагментов верхней цепи базовой последовательности
8	5'- tgcgctcatgctcatctcggcaccgtcgccctggatg ctgtaggcataggctt	54	Нижняя немодифицированная цепь (серединное звено для нижней цепи, ОДН-7)
9	5'-ggggcgctacctgtgagcaatcgtgttcatcat-P	34	Матрица для достройки продуктов эксцизии [α - ³² P]-dCMP
10	5'-P-gggtatgccggtactgcccggcctcttgcgggata tegtcca	42	3'-компонента для нижней цепи (правое плечо нижней цепи)
11	5'-cgatgagcgcattgtagatttc	23	Комплементарная цепь для лигирования ОДН-7 и левого плеча нижней цепи
12	5'-agtaccggcataaccaagcctatgcc	26	Комплементарная цепь для лигирования ОДН-7 и правого плеча нижней цепи

кими участками дцДНК, окружающей повреждение, в том числе и с 3'-стороны от повреждения, вызывающая дестабилизацию структуры ДНК в этой области [17, 18]. Связывание ХРС с расположенным таким образом участком дестабилизированной ДНК приводит к формированию непродуктивных для репарации комплексов ХРС–ДНК, поскольку связавшийся с 3'-стороны от повреждения и продвигающийся в направлении 5'→3' верифицирующий комплекс ТФИИ с повреждением не сталкивается и покидает ДНК [19, 20]. Наиболее детальное представление о структуре и взаимодействиях объемных повреждений ДНК обеспечивают методы ЯМР, однако для таких исследований необходимы миллиграммовые количества образцов ДНК, несущей повреждение.

Помимо сравнительной оценки эффективности специфической эксцизии nFluS и nFluL белками ЭРН-компетентного экстракта клеток HeLa, нами методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала определена также степень влияния nFluS или nFluL во внутренней позиции одной из цепей ДНК-дуплексов (16 п.н.) на геометрию дцДНК и ее термостабильность. Кроме того, проведены эксперименты по спектрометрическому титрованию, в результате которых получены данные о характере взаимодействия полициклических фрагментов объемных повреждений с азотистыми основаниями соседних звеньев ДНК [21].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

ЭРН-компетентный экстракт клеток HeLa был приготовлен по стандартной методике [22]. Использовали Т4-полинуклеотидкиназу, Т4-ДНК-лигазу и Таq-ДНК-полимеразу производства «Биосан» (Россия), протеиназу К (Sigma, США), EDTA, Tris, Нерес, дитиотреитол (ДТТ, Sigma). Олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН) синтезировали в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН, использованные при синтезе амидофосфиты были производства («НаноТех-С», Россия), [γ -³²P]-АТФ (3000 Ки/ммоль) и [α -³²P]-дСТР (3000 Ки/ммоль) произведены в ИХБФМ СО РАН. В работе также использовали DEAE-фильтры DE-81 (Whatman, Великобритания), мочевины, N,N'-метиленабисакриламид (Amresco, США), акриламид (Applichem, ФРГ), TEMED (Helicon, Россия). Использовали также: PSA, MgCl₂, NaCl, H₃BO₃, NaOH, NaCac, LiClO₄, (NH₄)₂SO₄, HCl, ацетон.

Нуклеотидные последовательности всех ОДН, использованных в работе, приведены в *табл. 1*.

Синтез протяженных модельных ДНК

Протяженные модельные ДНК 137 п.н. синтезировали с использованием ОДН 1–3 и 5–12 и Т4-ДНК-лигазы как описано ранее [14]. Последовательности

ОДН и протяженных модельных ДНК не отличались от использованных нами ранее.

Оценка субстратных свойств модельных ДНК-дуплексов, содержащих флуоресцеиновые аддукты
Для сравнительного анализа эффективности специфической эксцизии использовали метод 3'-концевого мечения продуктов эксцизии [14]. Реакционную смесь для проведения реакции (30 мкл), которая содержала 16 нМ ДНК-субстрат, 1.6 мг/мл NER-компетентного экстракта клеток и 0.5 мкМ матричный ОДН-9 для гибридизации продуктов эксцизии, в буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 7.8; 45 мМ NaCl; 4.4 мМ MgCl₂; 0.1 мМ EDTA; 4 мМ АТР) инкубировали при 30°C в течение 10–40 мин. Для инактивации реакции смесь нагревали до 95°C, после чего охлаждали до комнатной температуры. После добавления 3 мкл смеси, содержащей 100 мкМ dATP, dGTP и dTTP, 5 ед. Taq-ДНК-полимеразы и 500–750 Бк [α -³²P]-dCTP, смесь инкубировали при 37°C в течение 5 мин, затем добавляли 0.5 мкл 50 мкМ dCTP, после чего инкубировали в течение еще 15 мин. Реакцию останавливали, добавляя раствор протеиназы К (4 мкг/мл), 10% SDS (по 1 мкл) и выдерживая смесь в течение 30 мин при 37°C. Продукты реакции переосаждали в 96% этаноле, после чего центрифугировали при 12000 g (4°C), отмывали в 70% этаноле, а полученный осадок растворяли в воде. Продукты реакции разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. Гели, содержащие радиоактивно меченные образцы ДНК, анализировали с помощью радиолуминесцентного экрана Imaging Screen-K (Kodak, США) с последующим сканированием на GE Turphoon FLA 9500. Для количественного анализа результатов использовали программу Quantity One.

Определение угла изгиба ДНК-дуплексов

Угол изгиба дуплексов рассчитывали на основе данных об электрофоретической подвижности в неденатурирующих условиях (10% ПААГ, 1 × TBE, 4°C) по формуле:

$$\alpha = \pi - \arccos \sqrt{\frac{\mu_{\text{модиф.}}}{\mu_{\text{немодиф.}}}}$$

где $\mu_{\text{модиф}}$ и $\mu_{\text{немодиф}}$ – электрофоретические подвижности дуплексов при разделении в неденатурирующем геле.

Оценка термостабильности ДНК-дуплексов методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала

В экспериментах использовали спектрофотометр Cary 300-Bio (Varian, Австралия), оборудованный шестисекционным элементом Пельтье для изме-

нения температуры, и кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0.2 см. Использовали диапазон температур 5–95°C. Температуру образца в каждой кювете откалибровывали с использованием термодатчиков Temperature Probes Series II (Varian, Австралия). Измерения проводили на длинах волн 260, 270 и 300 нм (базовая линия; ширина щели 1 нм, время усреднения сигнала 1 с, скорость изменения температуры 0.5°C/мин). Все образцы для термической денатурации растворяли в деионизированной воде Mili-Q и в 10-мМ какодильном буфере (CH₃)₂AsO₂Na pH 7.2, 0.1 М NaCl. Значения термодинамических параметров рассчитывали, обрабатывая данные об изменении оптической плотности при нагреве и охлаждении на длинах волн 260 и 270 нм путем подгонки теоретических кривых в рамках приближения модели двух состояний с помощью программы Simplex. Базу данных, характеризующую термостабильность ДНК-комплексов, формировали в MS Excel.

Спектрометрическое титрование

Спектрометрическое титрование проводили с использованием 16-звенных ОДН (табл. 1). Были приготовлены две серии образцов, которые содержали ОДН-2 (nFluS-ОДН) или ОДН-3 (nFluL-ОДН) в постоянной концентрации (5.4 мкМ) и комплементарную цепь (ОДН-4), концентрация которой варьировала от 1.25 до 5.4 мкМ, в 20 мМ Tris-HCl-буфере pH 8.0, содержащем 50 мМ NaCl. Контрольные образцы содержали только ОДН с модификацией. Образцы инкубировали в течение 5 мин при температуре 95°C в 1 × TE, затем охлаждали со скоростью 1°C/мин до комнатной температуры для формирования дуплекса. Спектры образцов были записаны с использованием спектрофлуориметра Clariostar plate reader (BMG Labtech, ФРГ) в UV-прозрачных планшетах Corning 3635.

Для полученных данных определяли стандартное отклонение по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}$$

где n – объем выборки; xi – i -й элемент выборки; \bar{x} – среднее арифметическое выборки. Планки погрешностей на всех рисунках представляют собой стандартные отклонения, полученные на основе не менее трех независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка эффективности удаления nFluL и nFluS из модельных ДНК в реакции специфической эксцизии

Влияние структурных различий nFluL и nFluS на эффективность их удаления из ДНК-субстратов

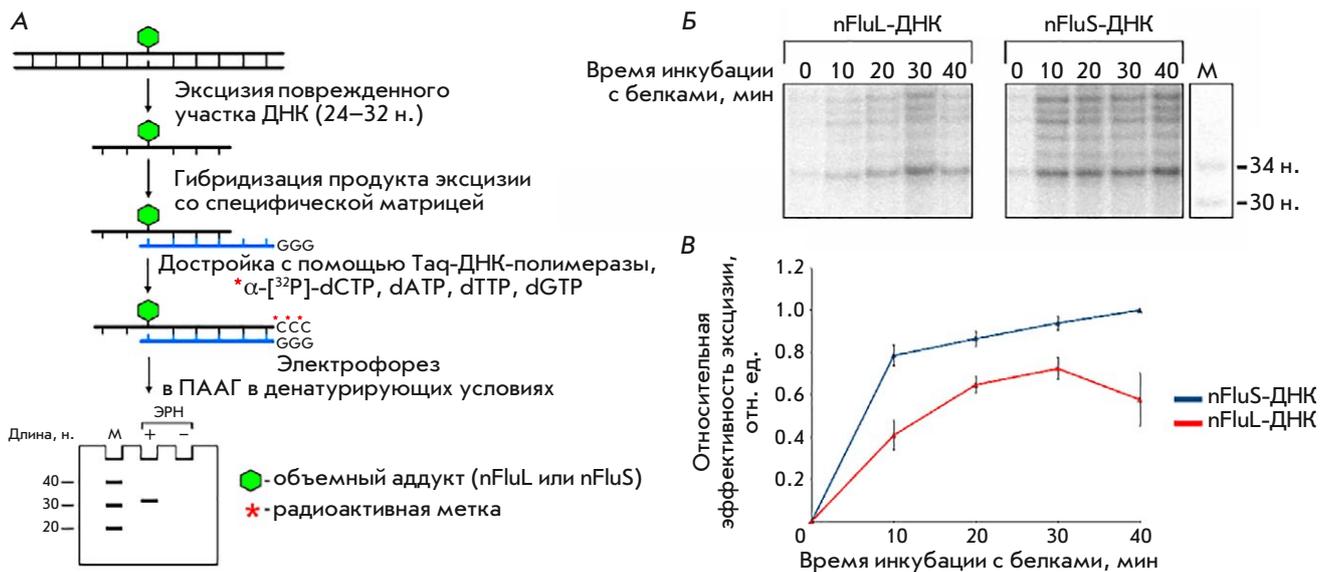


Рис. 2. Сравнительная оценка эффективности удаления nFluL или nFluS из модельных ДНК в реакции специфической эксцизии, катализируемой белками экстракта клеток HeLa. А – схематическое представление процедуры оценки эксцизионной активности ЭРН *in vitro* методом концевого мечения продуктов специфической эксцизии (адаптировано из [14, 23]); Б – радиоавтограф геля после разделения продуктов реакции эксцизии; В – график зависимости относительной эффективности эксцизии поврежденного участка ДНК от времени инкубации с белками ЭРН. Значения для кривых рассчитывали с учетом интенсивности сигнала продуктов длиной 34 н.

оценивали с помощью метода концевого мечения продуктов специфической эксцизии (рис. 2А) [14]. В качестве субстратов эксцизионной репарации нуклеотидов использовали протяженные (137 п.н.) ДНК-дуплексы, содержащие во внутренней (68) позиции одной из цепей ненуклеотидное звено nFluL или nFluS. Модельные ДНК-субстраты инкубировали в течение 0–40 мин при 30°C с белками экстракта клеток HeLa. После остановки реакции продукты специфической эксцизии (фрагменты цепи ДНК длиной 24–32 нуклеотидов, содержащие повреждение) гибридизовали с присутствующей в реакционной смеси матрицей (табл. 1, ОДН-9), комплементарной содержащему повреждение участку цепи ДНК (рис. 2А). Далее проводили достройку продуктов специфической эксцизии, гибридизованных на матрице, с помощью Taq-ДНК-полимеразы, а также смеси dNTP и α - ^{32}P -dCTP, благодаря чему происходило ^{32}P -мечение продуктов специфической эксцизии. Длина продуктов эксцизии после достройки составила, в основном, 34 нуклеотида. Продукты эксцизии разделяли с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 2Б). На основе данных об интенсивности полос, соответствующих 34 нуклеотидам, были построены графики зависимости относительной эффективности эксцизии от времени инкубации с белками экстракта (рис. 2В).

Как видно из представленных результатов, на всем временном промежутке удаление nFluS из модельной ДНК происходило в 1.5–2 раза более эффективно,

чем nFluL. Проведение последующих экспериментов позволило получить и сравнить данные об индуцированных этими объемными повреждениями изменениях геометрии дцДНК и ее стабильности – характеристик, от которых зависит эффективность удаления повреждений ДНК системой ЭРН.

Особенности геометрии модельных ДНК, содержащих объемную модификацию nFluL или nFluS

Перегиб сахарофосфатного остова в месте расположения объемного повреждения – одно из нарушений регулярной двухцепочечной структуры ДНК, распознаваемых на этапе первичного узнавания места повреждения. Величина перегиба зависит от типа повреждения и окружающей его последовательности [24]. Чем больше перегиб ДНК-дуплексов, который вызывает присутствие объемной модификации (т.е. чем больше значение угла изгиба отдалается от 180°), тем меньше их подвижность в геле при электрофорезе в неденатурирующих условиях. Это явление объясняется меньшей компактностью изогнутой структуры ДНК, затрудняющей ее прохождение через поры геля. Таким образом, особенности геометрии модельных 16-звенных ДНК-дуплексов, несущих модификацию nFluL или nFluS в одной из цепей, могут быть определены на основе данных об их подвижности в геле при электрофорезе в неденатурирующих условиях. Радиоавтограф геля, полученный в результате эксперимента, представлен на рис. 3.

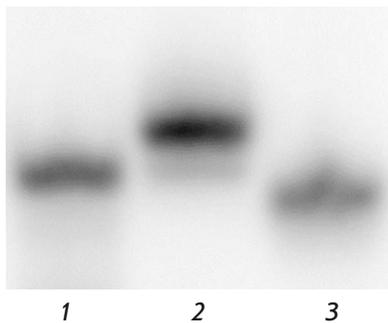


Рис. 3. Сравнение электрофоретической подвижности 16-звенных ДНК-дуплексов. Радиоавтограф геля после проведения электрофореза в неденатурирующих условиях. 1 – nFluS-дцДНК, 2 – nFluL-дцДНК, 3 – НМ-дцДНК

Согласно результатам обчислений по формуле (см. «Определение угла изгиба ДНК-дуплексов»), nFluL-содержащий ДНК-дуплекс изогнут сильнее – угол изгиба для него составляет $165.40 \pm 0.95^\circ$, что совпадает с данными, полученными ранее [17, 25], в то время как для nFluS-дцДНК угол изгиба составил $170.64 \pm 0.83^\circ$. Эти различия в перегибе сахарофосфатного остова двух эффективно процессуемых субстратов могут быть обусловлены различиями во взаимодействии флуоресцеинового фрагмента повреждений с азотистыми основаниями соседних нуклеотидных звеньев. Согласно результатам моделирования молекулярной динамики ДНК-дуплекс, содержащий nFluL, наряду с преимущественным нахождением флуоресцеинового фрагмента вне дуплекса, показал высокую подвижность в области введения повреждения; наблюдалась динамика возникновения/исчезновения изгиба в области повреждения на достаточно большой угол ($\sim 135^\circ$) [17]. Структура nFluS позволяет предполагать, что в этом случае Flu не склонен к выворачиванию, что может быть связано с преимущественным расположением флуоресцеинового фрагмента nFluS внутри дуплекса. Стоит также отметить, что, несмотря на меньшую степень изгиба nFluS-ДНК по сравнению с nFluL-ДНК, nFluS удалялся более эффективно белками экстракта клеток HeLa. Тем не менее эффективность репарации объемного аддукта не всегда коррелирует со степенью изгиба спирали ДНК, что показано нами ранее [11].

Сравнение термической стабильности дуплексов

Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала определены термическая стабильность и термодинамические характеристики формирования ДНК-дуплексов длиной 16 п.н. Проведена регистрация зависимости величины оптической плотности растворов ДНК-дуплексов от температуры. Анализ кривых термической денатурации различных субстратов показал, что гипохромный эффект в случае дуплекса без модификации выражен более заметно, чем у дуплексов,

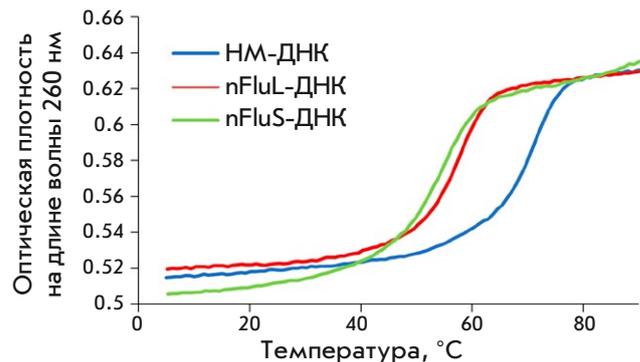


Рис. 4. График зависимости оптической плотности ДНК-дуплексов на длине волны 260 нм от температуры

содержащих ненуклеотидное звено. Согласно расчетам, гипохромный эффект НМ-ДНК составляет 14.75%, nFluL-ДНК 13.5%, nFluS-ДНК 14.3%. На нормированных графиках зависимости оптической плотности от температуры видны различия в термостабильности ДНК-дуплексов (рис. 4).

Наиболее стабильным оказался ДНК-дуплекс без модификации, T_m составила $67.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$; у nFluL-дуплекса T_m составила $55.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$ и наименее термостабильным оказался nFluS-дуплекс ($T_m = 51.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Таким образом, присутствие повреждений nFluL и nFluS сильнее, чем присутствие другого ненуклеотидного повреждения – nAnt (T_m для nAnt-ДНК составляет $59.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$) [16], однако nFluS дестабилизирует двухцепочечную структуру дуплексов наиболее заметно. Ранее с использованием компьютерного моделирования мы показали, что флуоресцеиновые фрагменты синтетических азотистых оснований, связанные с сахарофосфатным остовом ДНК протяженными линкерами (Flu-dU и nFluL), взаимодействуют с азотистыми основаниями нуклеотидных звеньев соседних участков дцДНК, нарушая и дестабилизируя регулярную структуру этих участков. С использованием молекулярно-динамического моделирования показано, что флуоресцеиновый фрагмент nFlu способен выворачиваться из дуплекса и большую часть времени находится снаружи [17, 25].

Полученные нами данные дают основание полагать, что более существенное снижение термостабильности nFluS-содержащего дуплекса (по сравнению с nFluL-содержащим) может быть связано с преимущественным расположением флуоресцеинового фрагмента nFluS внутри существенно искажаемого его присутствием дуплекса и его взаимодействиями с азотистыми основаниями ближайших нуклеотидных звеньев [26]. С использованием минимизации суммы квадратов отклонений между экспериментальной и теоретической кривой термической денатурации проведен расчет термоди-

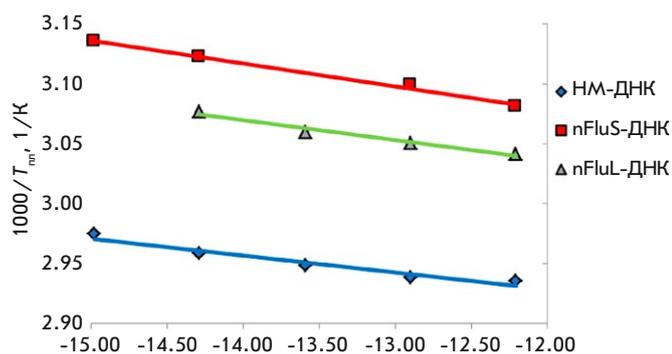


Рис. 5. График в линейных координатах Вант-Гоффа для немодифицированного ДНК-дуплекса и дуплексов, содержащих повреждение nFlu (nFluL) и (nFluS)

наимических параметров плавления. Значения ΔS° и ΔH° определяли путем линейризации выражения в координатах $1000/T_{пл}$ и $\ln(C_i/4)$ (координаты Вант-Гоффа) и построения линейной зависимости обратной величины температуры плавления от логарифма концентрации $\ln(C_i/4)$ методом наименьших квадратов. Графики, представленные на рис. 5, результаты расчетов термодинамических параметров в табл. 2 также говорят о повышенной способности nFluS к дестабилизации двухцепочечной структуры окружающей ДНК по сравнению с nFluL.

Спектрометрическое титрование

Метод спектрометрического титрования в сочетании с другими подходами позволяет на основе данных об изменениях спектральных характеристик, обусловленных формированием дуплекса, сделать вывод о наличии тех или иных взаимодействий. Наиболее заметные различия между двумя повреждениями, содержащими объемный карбоксифлуоресцеиновый фрагмент, выявлены при сравнительном изучении ДНК-дуплексов, содержащих объемные модификации nFluL и nFluS, с помощью спектрометрического титрования. Использование этого метода в сочетании с другими подходами позволяет на основе данных об изменениях спектральных характеристик при формировании дуплекса сделать выводы о взаимодействиях, в которые вовлекается (или не вовлекается) флуоресцентная группировка. Образцы содержали модифицированные цепи nFluS или nFluL

в постоянной концентрации 5.4 мкМ; концентрация комплементарной ДНК варьировала. Контрольные образцы в каждой серии содержали только модифицированную цепь. Измерения проводили после проведения гибридизации цепей. Спектры оптического поглощения представлены на рис. 6.

На длине волны 260 нм наблюдалось постепенное увеличение оптической плотности обеих серий образцов, происходящее в результате увеличения суммарной концентрации ДНК в смеси, в то время как на длине волны 495 нм (максимум поглощения флуоресцеина) характер изменения оптической плотности образцов, содержащих nFluS-ДНК и nFluL-ДНК, менялся по мере увеличения содержания в образцах комплементарной цепи, а следовательно, и двухцепочечных структур.

Сравнение оптического поглощения nFluS-ДНК и nFluL-ДНК, полученных при их титровании немодифицированной ДНК, показывает, что в области максимального поглощения нуклеотидов (260 нм) в обеих сериях ДНК наряду с ростом оптической плотности наблюдается одинаковый по величине гипохромный эффект, обусловленный формированием дуплексов (рис. 6). Характер изменений оптической плотности вблизи максимума поглощения флуоресцеина (495 нм) при этом отличается: в случае ДНК-дуплексов, содержащих nFluS, гипохромный эффект, проявляющийся при максимальной концентрации неповрежденной цепи, составляет 40%, в то время как у ДНК-дуплексов, содержащих nFluL, он не превышает 20% (рис. 6).

Ранее на примере спектров поглощения ДНК-дуплексов, которые содержали *цис*- и *транс*-B[α]P-N2-dG-повреждения, было показано, что образование дуплексов, в которых аддукт B[α]P формировал прочные интеркаляционные комплексы, сопровождается гипохромным эффектом, проявляющимся в области поглощения пиренильных колец B[α]P [27]. Таким образом, результаты спектрофотометрического титрования показывают, что, хотя присутствие повреждения с более протяженным спейсерным фрагментом приводит к локальной дестабилизации ДНК, достаточной для эффективного распознавания и удаления nFluL белками системы ЭРН, его флуоресцеинилкарбамоильный фрагмент

Таблица 2. Термодинамические данные и температура плавления ДНК-дуплексов

ДНК-дуплекс	ΔS° , ккал/моль \times К	ΔH° , ккал/моль	ΔG°_{37} , ккал/моль	T_m (20 мкМ), $^\circ\text{C}$
НМ-ДНК	-382 ± 167	-140.0 ± 56.7	-20.2 ± 4.8	$67.6 \pm 0.3^{**}$
nFluL-ДНК	-339 ± 187	-119.4 ± 61.2	-14.3 ± 3.2	$55.6 \pm 0.3^{**}$
nFluS-ДНК	-295 ± 104	-103.5 ± 33.5	-12.0 ± 1.2	$51.5 \pm 0.3^{**}$

**Стандартное отклонение для температуры взято исходя из погрешности измерительного прибора.

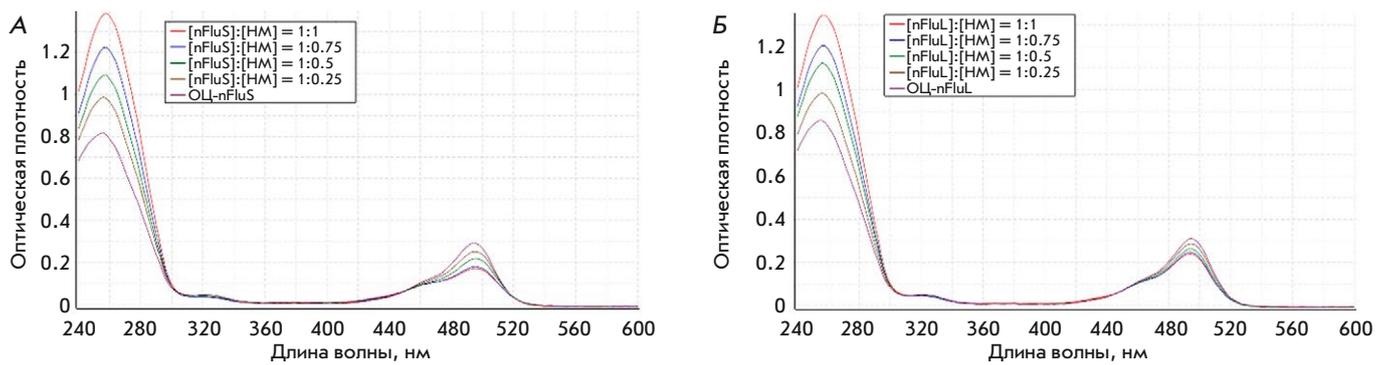


Рис. 6. Спектры оптического поглощения образцов, содержащих nFluS-ДНК (А) или nFluL-ДНК (Б) в постоянной концентрации 5.4 мкМ. Указаны соотношения концентраций в образцах, содержащих модифицированную (nFluS- или nFluL) и немодифицированную (НМ) цепи, формирующие дуплексы

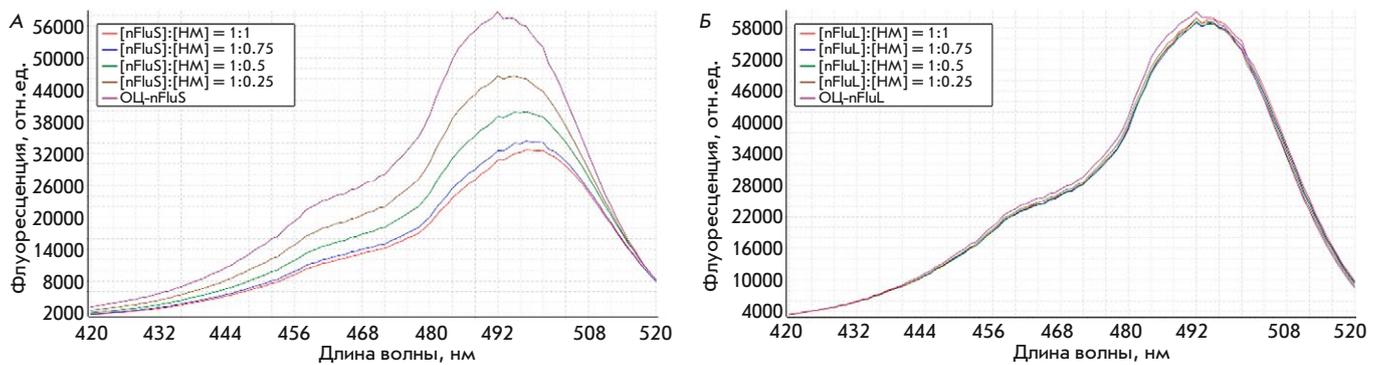


Рис. 7. Спектры возбуждения флуоресценции в диапазоне 420–520 нм в сериях образцов, содержащих nFluS-ДНК (А) или nFluL-ДНК (Б), в концентрации 5.4 мкМ и комплементарную цепь без модификаций (НМ)

не образует устойчивых сэндвич-структур либо других комплексов, формирование которых приводит к заметным изменениям в спектре, что коррелирует с данными недавно выполненного моделирования МД-траекторий nFluL-содержащих ДНК [17].

Наиболее наглядные результаты, позволяющие судить о причинах, лежащих в основе различий двух флуоресцеиновых повреждений, получены при сравнении спектров флуоресценции двух серий образцов, содержащих nFluS-ДНК либо nFluL-ДНК и немодифицированную цепь ДНК в таких же соотношениях, как и в экспериментах по анализу изменения оптических спектров. Полученные спектры возбуждения и испускания ДНК-дуплексов с повреждениями nFluS и nFluL представлены на рис. 7 и 8 соответственно. Спектры возбуждения флуоресценции записывали при фиксированной длине волны испускания 548 нм; длина волны возбуждения изменялась в диапазоне 420–520 нм с шагом 1 нм (рис. 7А,Б соответственно). Спектры испускания, представляющие собой зависимость интенсивности испускания света флуорофором (Flu) от длины волны возбуждающего света, снимали в диапазоне 500–600 нм с шагом измерения 1 нм при фиксированной длине волны возбуждающего света 533 нм (рис. 8А,Б).

Интенсивность флуоресценции образцов, содержащих nFluS-ДНК, заметно и последовательно уменьшается по мере увеличения концентрации комплементарной цепи, в то время как в случае образцов, содержащих nFluL-ДНК, в структуре которого есть протяженный линкер, интенсивность флуоресценции практически не изменяется (рис. 7А и 8А).

Таким образом, результаты спектрометрического титрования с большой уверенностью позволяют предполагать, что при образовании дуплекса флуоресцеинилкарбамоильный фрагмент повреждения nFluS располагается внутри дуплекса и способен взаимодействовать с гуанинами ближайших к повреждению звеньев ДНК аналогично тому, как это описано для некоторых вариантов расположения флуоресцеиновой модификации в дуплексе [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с нашим предположением, nFluS (N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)]-3-амино-1,2-пропандиол) представляет собой аналог объемного повреждения, эффективность специфической эксцизии которого из модельной ДНК выше, чем у nFluL (N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиола). В результате

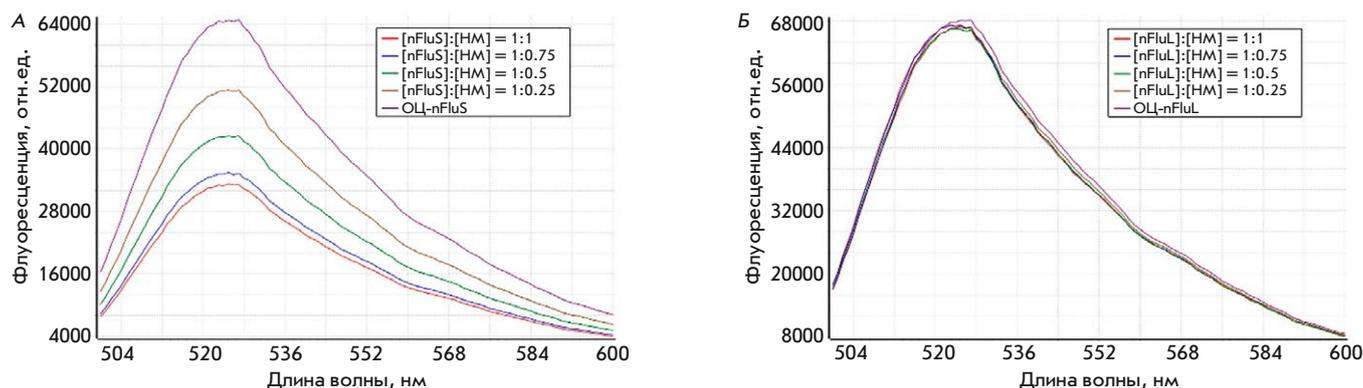


Рис. 8. Спектры испускания флуоресценции в серии образцов, содержащих nFluS (А) или nFluL (Б), в концентрации 5.4 мкМ и комплементарную цепь без модификаций (НМ)

сравнительного исследования особенностей геометрии, термодинамических характеристик, анализа спектров оптического поглощения, а также спектров флуоресценции модельных ДНК-дуплексов, содержащих nFluS или nFluL, показано, что увеличение эффективности специфической эксцизии nFluS по сравнению с nFluL ассоциировано с обусловленной взаимодействием флуоресцеинилкарбамоильного фрагмента с соседними азотистыми основаниями дцДНК дополнительной дестабилизацией двухцепочечной структуры ДНК. При этом расположение

дестабилизированного участка в nFluS-содержащих дцДНК, вероятно, способствует формированию продуктивных комплексов ХРС-ДНК, внося вклад в улучшение субстратных свойств nFluS-ДНК в реакции специфической эксцизии. Для подтверждения последнего предположения необходимо проведение экспериментов по молекулярному моделированию. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-74-10056П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schärer O.D. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. № 10. P. a012609.
- Sugasawa K. // Enzymes. 2019. V. 45. P. 99–138.
- Krasikova Y., Rechkunova N., Lavrik O. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 12. P. 6220.
- Shafirovich V., Kolbanovskiy M., Kropachev K., Liu Z., Cai Y., Terzidis M.A., Masi A., Chatgililoglu C., Amin S., Dadali A., et al. // Biochemistry. 2019. V. 58. № 6. P. 561–574.
- Fu I., Mu H., Geacintov N.E., Broyde S. // Nucl. Acids Res. 2022. V. 50. № 12. P. 6837–6853.
- Fu I., Geacintov N.E., Broyde S. // Nucl. Acids Res. 2023. V. 51. № 22. P. 12261–12274.
- Kim J., Li C.L., Chen X., Cui Y., Golebiowski F.M., Wang H., Hanaoka F., Sugawara K., Yang W. // Nature. 2023. V. 617. № 7959. P. 170–175.
- Huang J.C., Sancar A. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 19034–19040.
- Reardon J.T., Sancar A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 11. P. 4056–4061.
- Kropachev K., Kolbanovskii M., Cai Y., Rodríguez F., Kolbanovskii A., Liu Y., Zhang L., Amin S., Patel D., Broyde S., et al. // J. Mol. Biol. 2009. V. 386. № 5. P. 1193–1203.
- Лукьянчикова Н.В., Петрусева И.О., Евдокимов А.Н., Сильников В.Н., Лаврик О.И. // Биохимия. 2016. Т. 81. № 3. С. 386–400.
- Li C.L., Golebiowski F.M., Onishi Y., Samara N.L., Sugawara K., Yang W. // Mol. Cell. 2015. V. 59. № 6. P. 1025–1034.
- Gillet L.C., Alzeer J., Schärer O.D. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 6. P. 1961–1969.
- Evdokimov A., Petrusseva I., Tsidulko A., Koroleva L., Serpukrylova I., Silnikov V., Lavrik O. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 12. e123.
- Evdokimov A., Kutuzov M., Petrusseva I., Lukjanchikova N., Kashina E., Kolova E., Zemerova T., Romanenko S., Perelman P., Prokopov D., et al. // Aging (Albany NY). 2018. V. 10. № 6. P. 1454–1473.
- Лукьянчикова Н.В., Петрусева И.О., Евдокимов А.Н., Королева Л.С., Лаврик О.И. // Мол. биология. 2018. Т. 52. № 2. С. 277–288.
- Naumenko N.V., Petrusseva I.O., Lomzov A.A., Lavrik O.I. // DNA Repair (Amst.). 2021. V. 108. P. 1–11.
- Petruseva I., Naumenko N., Kuper J., Anarbaev R., Kappenberger J., Kisker C., Lavrik O. // Front. Cell Dev. Biol. 2021. V. 9. P. 617160.
- Sugasawa K., Akagi J., Nishi R., Iwai S., Hanaoka F. // Mol. Cell. 2009. V. 36. № 4. P. 642–653.
- Cheon N.Y., Kim H.S., Yeo J.E., Schärer O.D., Lee J.Y. // Nucl. Acids Res. 2019. V. 47. № 16. P. 8337–8347.
- Liu Z., Ding S., Kropachev K., Jia L., Amin S., Broyde S., Geacintov N.E. // PLoS One. 2015. V. 10. № 9. P. e0137124.
- Reardon J.T., Sancar A. // Methods Enzymol. 2006. V. 408. P. 189–213.
- Попов А.А., Петрусева И.О., Науменко Н.В., Лаврик О.И. // Биохимия. 2023. Т. 88. № 11. С. 2235–2250.
- Reeves D.A., Mu H., Kropachev K., Cai Y., Ding S., Kolbanovskiy A., Kolbanovskiy M., Chen Y., Krzeminski J., Amin S., et al. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. № 20. P. 8752–8764.
- Evdokimov A.N., Tsidulko A.Y., Popov A.V., Vorobiev Y.N., Lomzov A.A., Koroleva L.S., Silnikov V.N., Petrusseva I.O., Lavrik O.I. // DNA Repair (Amst.). 2018. V. 61. P. 86–98.
- Nazarenko I., Pires R., Lowe B., Obaidy M., Rashtchian A. // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. № 9. P. 2089–2195.
- Huang W., Amin S., Geacintov N.E. // Chem. Res. Toxicol. 2002. V. 15. № 2. P. 118–126.