СПЕЦВЫПУСК том 2 | 2019

ActaNaturae

МЕЖДУНАРОДНАЯ АССОЦИАЦИЯ АКАДЕМИЙ НАУК (МААН)
СОЮЗ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЩЕСТВ СТРАН СНГ
ФЕДЕРАЦИЯ ЕВРОПЕЙСКИХ БИОХИМИЧЕСКИХ ОБЩЕСТВ (FEBS)
РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО БИОХИМИКОВ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОНД
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ
ИНСТИТУТ ИММУНОФИЗИОЛОГИИ

II ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ

VI СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ
VI СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ
IX РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

НАУЧНЫЕ ТРУДЫ

Под редакцией
Р.И. Сепиашвили, В.А. Ткачука, А.Г. Габибова,
А.И. Григорьева, В.Т. Иванова, М.А. Островского

Сочи – Дагомыс, Россия
1–6 октября 2019

модификации белков-мишеней поли(АДР-рибозой) (PAR). PARP1 активируется при взаимодействии с одно- и двухцепочечными разрывами ДНК. Функциональная кооперация APE1 и PARP1 в процессе BER показана в ряде исследований *in vitro*. В основе ее лежат прямые взаимодействия белков и их конкуренция за взаимодействие с разными ДНК-интермедиатами BER. Нами впервые показана PAR-связывающая активность APE1 и ковалентная модификация, катализируемая PARP1. Эффективность модификации зависит от структуры ДНК, активирующей PARP1: наличия в дуплексе повреждения и его типа (интактный или расщепленный AP-сайт, или однонуклеотидная брешь), а также от нуклеотидной последовательности AP-сайт-содержащей ДНК. Результаты исследования указывают на то, что сродство APE1 к ДНК, локальная структура ДНК в районе AP-сайта и длина дуплекса с 3'-стороны AP-сайт-несущей цепи контролируют эффективность поли(АДР-рибозил)ирования. Предложен механизм модификации в тройном комплексе APE1 и PARP1 с ДНК и показано, что он не является общим для ДНК-зависимых PARP. Сайты модификации локализованы в С-концевом каталитическом домене APE1. В нековалентном взаимодействии APE1 с PAR участвует наряду с каталитическим доменом N-концевой неупорядоченный фрагмент, специфичный для эукариот. Модификация APE1, катализируемая PARP1, представляет собой новый механизм кооперации ключевых участников BER, который может играть функциональную роль в регуляции процессов репарации ДНК. *Работа выполнена при поддержке Российского фонда научных исследований (грант №19-1400107).*

СПЕЦИФИЧНОСТЬ УЗНАВАНИЯ КОНФОРМАЦИОННО СЛОЖНЫХ СУБСТРАТОВ ФЕРМЕНТАМИ РЕПАРАЦИИ ДНК И ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

Д. О. Жарков[1,2]
[1]Новосибирский государственный университет; [2]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Многие ферменты, участвующие в репарации и редактировании геномной ДНК, сталкиваются с задачей поиска редко встречающихся мишеней среди огромного избытка конкурирующей неспецифичной ДНК. Такие мишени могут представлять конкретные или консенсусные последовательности ДНК, либо модифицированные нуклеотиды и неканонические структуры ДНК. При поиске должен соблюдаться необходимый баланс между скоростью нахождения мишени и частотой ошибок (нераспознавание мишени или ошибочное распознавание нецелевой ДНК), причем ошибки могут приводить к огромным затратам для клетки вплоть до ее гибели. Механизмы, с помощью которых ДНК-зависимые ферменты достигают оптимального баланса между скоростью и точностью, в значительной степени неясны. Ферменты репарации ДНК находят свои мишени путем быстрой одномерной диффузии по контуру ДНК с периодическими редкими событиями переноса на другой участок ДНК, удаленный по контуру, но близко расположенный в трехмерном пространстве относительно текущего местоположения. Этот поиск облегчается неупорядоченными N- или С-концевыми доменами, присутствующими во многих ферментах и, по-видимому, эволюционировавшими из высокодивергентных повторов коротких последовательностей. Одномерная диффузия может использоваться и для других целей: так, например, некоторые вирусы сумели приспособить урацил-ДНК-гликозилазы в качестве факторов процессивности своих ДНК-полимераз. Ферменты репарации при поиске мишеней активно используют непрямое узнавание, пытаясь деформировать ДНК для первичной оценки наличия повреждения. При обнаружении такой «слабой точки» основание выворачивается из двойной спирали, преодолевая несколько энергетических барьеров, что позволяет ферменту не допускать в активный центр нормальные основания. Узнавание в активном сайте вносит небольшой вклад в специфичность, причем скорость собственно каталитической стадии в основном зависит от взаимодействий с фрагментами ДНК в стороне от повреждения. С другой стороны, РНК-направляемая нуклеаза Cas9, по-видимому, не способна диффундировать по ДНК, и ее специфичность определяется исключительно сравнительной стабильностью дуплекса ДНК и гетеродуплекса ДНК-РНК в области мишени. Мутации Cas9, селективно дестабилизирующие гетеродуплекс, снижают эффективность действия фермента, но повышают его точность.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ КЛЮЧЕВЫМИ БЕЛКАМИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИСТЕМ РЕПАРАЦИИ ДНК-«МИСМАТЧЕЙ» И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫМ ПАРАЛЛЕЛЬНЫМ G-КВАДРУПЛЕКСОМ В ДНК

А.В. Павлова[1], М.В. Монахова[2], Н.Г. Долинная[1], В.Ю. Савицкая[1], Т.С. Орецкая[2], Е.А. Кубарева[2]
[1]Химический факультет и [2]НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Система репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») и небольших петель (MMR), способствует сохранению целостности генома, препятствуя накоплению мутаций. Ключевыми компонентами системы являются белки MutS и MutL, проявляющие ДНК-связывающую и АТФазную активность. MutS отвечает за узнавание «мисматча». Образование комплекса MutS-ДНК-MutL активирует в клетках E. coli эндонуклеазу MutH, которая вносит одноцепочечный разрыв в содержащую «ошибку» цепь ДНК. В большинстве других бактерий и в эукариотах MutH отсутствует, а гидролиз фосфодиэфирной связи в ДНК выполняет С-домен белка MutL. MutS способен узнавать не только «мисматчи», но и неканонические структуры ДНК, в частности, G-квадруплексы (G4). Нами впервые изучено влияние G4 на функционирование MMR E. coli (ec) и *Rhodobacter sphaeroides* (rs). Для этого сконструирована линейная модель ДНК со всем набором элементов, необходимых для инициации MMR в *E. coli* (G/T-пара и участок узнавания белка MutH), в которой внутримолекулярный G4 параллельной топологии закреплен внутри двуспиральной структуры. Наличие G4-вставки в линейной ДНК доказано методами УФ-, КД- и ЯМР-спектроскопии и «футпринтинга». Охарактеризовано сродство белков ecMutS и rsMutS к 76-звенному совершенному и «мисматч»-содержащему дуплексам, а также к ДНК со вставкой G4 или выпетленным участком, в состав которого входят повторы GT, в присутствии АДФ, АТФ и негидролизуемого аналога АТФ – АТФγS. Белки MutS из обеих бактерий проявляют наибольшее сродство к G4-ДНК по сравнению с другими ДНК-лигандами во всех рассмотренных условиях. Эффект особенно выражен для rsMutS в присутствии АТФγS. Поскольку ДНК-связывающая и АТФазная функции MutS взаимозависимы, мы исследовали скорость гидролиза АТФ в присутствии сконструированных ДНК. Наблюдается существенное увеличение

начальной скорости реакции при добавлении ДНК, однако наличие G4 внутри двуспиральной структуры не влияет на АТФазную активность ecMutS. Белок ecMutL в 2-3 раза эффективнее взаимодействует с G4-ДНК по сравнению с «мисматч»-содержащей ДНК. rsMutL также образует стабильный комплекс с таким лигандом; показано, что в этом взаимодействии участвует С-концевой (каталитический) домен белка. Несмотря на большее сродство ecMutS и ecMutL к ДНК с квадруплексом, комплекс этих белков с эндонуклеазой MutH не дискриминирует G4. Механизм и функциональная значимость эффективного связывания MutS и MutL из разных бактерий с G-квадруплексами находятся в стадии изучения. *Работа проводилась при поддержке РФФИ (грант № 18-34-00768*).

МЕХАНИЗМЫ ТРАНСКРИПЦИИ ПОВРЕЖДЕННОЙ ДНК БАКТЕРИАЛЬНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ

А.В. Кульбачинский, А.А. Агапов, М.А. Простова, Д.М. Есюнина
Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

Перемещение РНК-полимеразы по матрице ДНК в ходе транскрипции происходит неравномерно, с многочисленными остановками, которые могут быть вызваны сигналами пауз, ошибками в синтезе РНК или наличием в ДНК повреждений. РНК-полимераза является одним из основных сенсоров повреждений ДНК в клетке, привлекая в поврежденные участки факторы репарации. В нашей работе исследуются механизмы, контролирующие остановку транскрипционных комплексов в участках ДНК, содержащих сигналы пауз и различные типы повреждений, а также роль регуляторных белков в узнавании таких участков и координации процессов транскрипции и репарации. Нами показано, что РНК-полимеразы различных бактерий, в том числе, экстремофилов, узнают неканонические и поврежденные нуклеотиды в составе ДНК-матрицы сходным образом. Установлено, что различные модификации ДНК, нарушающие комплементарные взаимодействия, способны значительно ингибировать транскрипцию, а также снижать точность синтеза РНК. Охарактеризованы мутации в активном центре РНК-полимеразы, которые могут как снижать, так и увеличивать эффективность транскрипции поврежденных матриц. Изучена роль факторов транскрипции и репарации (Gre-подобные белки, Mfd-транслоказа) в регуляции активности РНК-полимеразы и разборке транскрипционных комплексов в поврежденных участках ДНК. Полученные данные показывают, что регуляторные факторы могут значительно изменять эффективность транскрипции поврежденной ДНК, обеспечивая взаимосвязь процессов транскрипции и репарации. *Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ 17-14-01393.*

НОВОЕ СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕАЗ

И.В. Демидюк[1], К.Н. Чухонцева[1], М.А. Карасева[1], Д.Р. Сафина[1], Т.Н. Бозин[1,2], Э.В. Бочаров[3], П.В. Конарев[2,4], В.В. Сальников[5], С.В. Костров[1]
[1]Институт молекулярной генетики РАН; [2]НИЦ «Курчатовский институт»; [3]Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; [4]Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва; [5]Казанский (Приволжский) федеральный университет и Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казань, Россия

Осуществляя ограниченный высокоспецифичный гидролиз белков, в каждой клетке и организме протеазы регулируют множество разнообразных жизненно важных процессов. Активность протеаз в свою очередь строго и тонко регулируется. Имеющиеся данные демонстрируют, что важную роль в контроле протеолитической активности играют селективные белковые ингибиторы, которые, однако, остаются малоизученными. Во многих случаях биологические функции известных ингибиторов остаются невыясненными, и, по-видимому, значительное количество ингибиторов до сих пор не открыто. В ходе исследований протеализинподобных протеаз (ППП) – группы металлопротеаз, которые по полученным нами ранее и опубликованным другими исследователями данным участвуют во взаимодействии бактерий с высшими организмами и, по-видимому, являются факторами патогенности, нами было обнаружено, что гены ППП в геномах бактерий колокализованы с генами небольших гипотетических белков. Поскольку такая ассоциация предполагает общую функцию, мы получили гипотетический белок из *Serratia proteamaculans* в клетках *E. coli* и охарактеризовали его. В ходе исследований было установлено, что гипотетический белок является ингибитором ППП, а также других пептидаз, относящихся к семейству M4. Было продемонстрировано, что у *S. proteamaculans* гены ППП и ингибитора входят в состав оперона, а ингибитор имеет внутриклеточную локализацию. С использованием методов спектроскопии ЯМР и малоуглового рентгеновского рассеяния была определена пространственная структура ингибитора и установлено, что белок имеет уникальную пространственную укладку. Биоинформатический анализ показал, что гомологичные ингибитору из S. proteamaculans белки встречаются у тысяч бактерий, относящихся к 11 таксономическим типам. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что нами открыто новое семейство белковых ингибиторов протеаз. Ассоциация с ингибиторами нового семейства заставляет пересмотреть представления о функциях ППП у бактерий. Наши результаты позволяют предположить, что действие ингибитора направлено на подавление активности ППП, попадающих в бактериальную клетку извне. Это приводит к гипотезе об участии ППП не только во взаимодействии бактерий с высшими организмами, но и в межбактериальной конкуренции. *Работа поддержана грантом РФФИ №19-04-00756.*