

Физико-химическая ЭНЗИМОЛОГИЯ

Новосибирск
7-9 августа 2023

Конференция
«Физико-химическая энзимология»
приурочена к юбилею



Академика РАН
Ольги Ивановны Лаврик

Дорогие друзья, коллеги!

Физико-химическая энзимология – это важнейшая область знаний, в рамках которой изучаются механизмы ферментативных реакций, лежащих в основе всех биологических процессов.

Это направление в Сибирском отделении Российской академии наук было инициировано академиком Дмитрием Георгиевичем Кнорре и успешно развивается его ученицей и последователем – академиком РАН Ольгой Ивановной Лаврик, в честь Юбилея которой организована эта конференция.

Главные научные интересы Ольги Ивановны лежат в области изучения сложных надмолекулярных систем репликации и репарации ДНК, обеспечивающих стабильность генома человека. Достижения Ольги Ивановны в исследовании механизмов репарации ДНК признаны мировым научным сообществом – она включена в топ-лист рейтинга экспертов в области репарации ДНК.

В рамках конференции планируется обсудить актуальные научные и научно-практические вопросы, связанные с изучением ферментов матричного синтеза нуклеиновых кислот и ансамблей белков репликации и репарации ДНК. Исследование механизмов репарации ДНК – горячее направление мировой науки, поскольку напрямую связано как с механизмами старения и выживания организмов, так и с выбором наиболее оптимальных путей лечения серьезных болезней человека. Нарушения в работе систем репарации ДНК приводят к тяжелым наследственным патологиям человека, а также к возникновению онкологических и нейродегенеративных заболеваний.

Особое внимание в ходе конференции будет уделено обсуждению ключевых механизмов репарации ДНК, путей их регуляции и связанных с ними ферментативных процессов, а также путей создания ингибиторов ферментов репарации в качестве агентов в противоопухолевой терапии.

Председатель организационного комитета

к.х.н. В.В. Коваль

Программный комитет

Лаврик Ольга Ивановна, академик РАН

Габибов Александр Габибович, академик РАН

Власов Валентин Викторович, академик РАН

Жарков Дмитрий Олегович, чл.-корр. РАН

Зенкова Марина Аркадьевна, чл.-корр. РАН

Организационный комитет

к.х.н. Коваль Владимир Васильевич, председатель

к.х.н. Пестряков Павел Ефимович

д.х.н. Речкунова Надежда Ивановна

к.х.н. Лебедева Наталья Александровна

к.х.н. Красикова Юлия Сергеевна

Зуева Анна Игоревна

Генеральный спонсор



АО «ГЕНЕРИУМ»
123112, г. Москва,
ул. Тестовская, 10, подъезд 2
Тел./факс: +7 (495) 988-47-94
Generium@Generium.ru
www.generium.ru

Спонсоры



**ГК ООО «БИОСАН» и
ООО Биолабмикс»**
630090, г. Новосибирск,
ул. Инженерная, 28
+7 (383) 363-22-40
sales@biolabmix.ru
biolabmix.ru



ООО «Диаэм»
129346, г. Москва, а/я 100
+7 (495) 745-05-08
sales@dia-m.ru
www.dia-m.ru



ООО «Компания Хеликон»
121374, г. Москва, Кутузовский пр., 88
8 (800) 770-71-21
(звонки с любых телефонов РФ бесплатны)
+7 (499) 705-50-50 (в Москве)
mail@helicon.ru
www.helicon.ru

Спонсоры



ООО «РУСМЕДТОРГ»

129327, г. Москва,
ул. Ленская, 2/21, пом. III, к. 2, эт. 5
8 (800) 777-85-79
+7 (495) 181-76-29
sales@rmedtorg.ru
<https://rmedtorg.ru/>



ООО «Аламед»

125167, г. Москва,
ул. Красноармейская, 2,
стр. 4, оф. 204
+7 (495) 614-45-97
info@alamed.ru
www.alamed.ru



ООО «Лакопа»

117342, г. Москва,
ул. Бутлерова, 17,
эт. 3, к. 95, оф. 182
+7 (495) 740-88-30
info@lacora.group
<https://lacora.group>



Рассказы для ученых про иммунологию

С.А. Недоспасов

*Научно-технологический университет Сириус, Краснодарский край
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва*

Иммунная система сформировалась в эволюции для защиты клетки или организма от внешнего вторжения. Наиболее древняя ветвь этой защиты – врожденный иммунитет, который есть у всех организмов, даже у одноклеточных. Система рестрикции-модификации – не что иное, как система врожденной защиты бактерий от бактериофагов. До недавнего времени считалось, что адаптивный иммунитет появился в эволюции у круглоротых, а в знакомом нам виде (с использованием иммуноглобулинового «фолда») – у рыб. Однако система CRISPR-Cas – не что иное, как адаптивный иммунитет бактерий для защиты от тех же бактериофагов. Интересно, что обе упомянутых системы лежат в основе технологий геной инженерии и редактирования генома. Молекулярные механизмы иммунитета включают в себя как уникальные для иммунной системы внеклеточные рецепторы, так и внутриклеточные сигнальные каскады, которые используются и другими системами клетки и организма. Примером может служить система репарации ДНК, которая задействована в процессе перестроек генов В- и Т-клеточных рецепторов.

Жидкофазные конденсаты Treacle являются платформой для сборки фибриллярных центров в ядрышке и способствуют привлечению факторов репарации при повреждении рДНК

Величко А.К.¹, Ковина А.П.¹, Лужин А.В.¹, Петрова Н.В.¹, Дериглазов Д.А.¹,
Разин С.В.^{1,2}, Кантидзе О.Л.^{1,3}

¹ *Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*

² *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

³ *Quantori LLC, Cambridge, MA, USA*

Создание в клеточном ядре микрокомпартов посредством биофизического процесса разделения жидких фаз играет большую роль в организации работы генома. В настоящем исследовании мы продемонстрировали, что присутствующий в ядрышке белок Treacle, который участвует в транскрипции и репарации генов рРНК, образует фазовые конденсаты *in vitro* и *in vivo*. Формирование этих конденсатов регулируется фосфорилированием Treacle, которое осуществляет киназа 2. В нормальных условиях конденсаты Treacle являются платформой для формирования фибриллярных центров в ядрышке. Эти конденсаты формируются на активных генах рРНК и к ним привлекаются UBF1 и Pol I. В условиях повреждения ДНК к жидкофазным конденсатам Treacle привлекается TOPBP1, что инициирует процесс репарации повреждений. В условиях оверэкспрессии Treacle и TOPBP1 кооперативные жидкофазные конденсаты Treacle-TOPBP1 формируются даже в отсутствие повреждения ДНК. Эти независимые от повреждений жидкие капли Treacle-TOPBP1 действуют как полноценные молекулярные платформы для активации клеточного ответа на повреждения ДНК (при фактическом отсутствии таких повреждений). Наши данные показывают, что, образуя жидкофазные конденсаты, Treacle может регулировать различные внутриклеточные процессы и направлять их в необходимые места внутри клеточного ядра.

Работа поддержана грантом РФФ 21-74-10018.

Передвижение ферментов репарации по ДНК: *in vitro* vs *in vivo*

Жарков Д.О.^{1,2}, Дятлова Е.А.²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Вопрос о механизмах поиска мишеней белками, специфичными к определенным последовательностям или структурным элементам ДНК, впервые был поставлен более 50 лет назад и по сей день остается открытым. В классической серии работ Берга, Винтера и фон Гиппеля 1981 г. [1-3] 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 процессивных и дистрибутивных механизмов. На эффективность этих механизмов оказывают влияние многие факторы окружения белка: ионная сила, связывание с ДНК низкомолекулярных соединений и других белков и т. п.

Модель одномерной диффузии, первоначально разработанная для факторов транскрипции, была вскоре адаптирована для ферментов репарации ДНК. Механизмы поиска активно изучались для 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. Параллельно с этим появляются новые методы в рамках традиционной ферментативной кинетики и теоретические модели, позволяющие изучать разные механизмы поиска мишеней.

Главным вопросом в этой области исследований остается то, насколько данные о передвижении белков, полученные *in vitro*, применимы к ситуации *in vivo*. Немногие исследования процессивности ферментов репарации в клетках человека и бактерий дают результаты, количественно приближенные к результатам *in vitro*. Более того, исследования механизмов субстратной специфичности ферментов репарации дают основания предположить, что они оптимизированы именно для узнавания повреждений в режиме одномерной диффузии.

1. Berg O.G., Winter R.B., von Hippel P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory // *Biochemistry*. – 1981. – V. 20. – No. 24. – P. 6929-6948.
2. Winter R.B., von Hippel P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 2. The *Escherichia coli* repressor-operator interaction: Equilibrium measurements // *Biochemistry*. – 1981. – V. 20. – No. 24. – P. 6948-6960.
3. Winter R.B., Berg O.G., von Hippel P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 3. The *Escherichia coli* lac repressor-operator interaction: Kinetic measurements and conclusions // *Biochemistry*. – 1981. – V. 20. – No. 24. – P. 6961-6977.

Исследование поддержано государственным заданием МОН РФ (проекты FSUS-2020-0035 и 121031300056-8).

Ферментативные подходы для получения терапевтических конъюгатов антител

Коршун В.А., Сапожникова К.А., Гуляк Е.Л., Алфёрова В.А., Брылев В.А.

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Одной из важнейших задач современной биоорганической химии является получение диагностических и терапевтических конъюгатов антител (ADC; antibody-drug conjugate). Последние приобретают все большую популярность: на 2023 год FDA одобрено 14 терапевтических конъюгатов [1]. Используемые методы пришивки к антителу линкера с фармакофором не позволяют полностью контролировать стехиометрию и получать гомогенные конъюгаты. Многие методы конъюгации могут затрагивать центр связывания антигена и нарушать аффинность, как в случае статистической модификации боковых аминогрупп лизина. Гомогенность и сохранение аффинности – самые трудные задачи при разработке конъюгатов антител [2,3].

Одним из перспективных способов решения этих задач является мечение антител с помощью различных природных ферментов. В настоящее время существуют примеры подобных подходов: это мечение с помощью микробной трансглутаминазы [2,3], грибной тирозиназы [4], ремоделинг гликанов с помощью гликозилтрансфераз [5] и др. (рис. 1). Получаемые конъюгаты демонстрируют высокую гомогенность и сайт-специфичность, и, кроме того, сохраняют аффинность и структуру антитела.



Рис. 1. Стратегии ферментативной модификации антител без применения генной инженерии

Мы применяем комбинацию недавно разработанных линкеров [6] и ферментативных методов для получения ADC с высокой гомогенностью.

1. Dumontet C. et al. Antibody-drug conjugates come of age in oncology // *Nat. Rev. Drug Discov.* **2023**, <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00709-2>
2. Anami Y. et al. Homogeneous antibody–angiopеп 2 conjugates for effective brain targeting // *RSC Adv.* **2022**, *12*, 3359–3364, <https://doi.org/10.1039/D1RA08131D>
3. Anami Y. et al. Homogeneity of antibody-drug conjugates critically impacts the therapeutic efficacy in brain tumors // *Cell Rep.* **2022**, *39*, 110839, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110839>
4. Bruins J.J. et al. Non-genetic generation of antibody conjugates based on chemoenzymatic tyrosine click chemistry // *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 2167–2172, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00351>
5. Qasba P.K. Glycans of antibodies as a specific site for drug conjugation using glycosyltransferases // *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 2170–2175, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00173>
6. Sapozhnikova K.A. et al. Aminoxy click modification of a periodate-oxidized immunoglobulin G: a general approach to antibody–drug conjugates with dye-mediated expeditious stoichiometry control // *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5134, <https://doi.org/10.3390/ijms24065134>

Новые аналоги спермина и спермидина – химические регуляторы клеточных функций и ферментов метаболизма полиаминов

Хомутов М.А., Салихов А.И., Хомутов А.Р.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Биогенные полиамины (ПА) спермин (Spm) и спермидин (Spd) присутствуют в эукариотических клетках в μM – mM концентрациях и жизненно необходимы для их нормального роста. Нарушения метаболизма ПА ассоциированы с развитием многих заболеваний, включая и онкологические, поскольку опухолевые клетки имеют повышенное содержание ПА [1]. Многие клеточные функции Spm и Spd описываются в терминах специфического взаимодействия с отрицательно заряженными макромолекулами, например, поддержание правильной архитектуры РНК и ДНК. Spm и Spd служат природными регуляторами топоизомераз, рестриктаз и ферментов биосинтеза и репарации ДНК.

C-метилированные аналоги ПА являются уникальным инструментом исследования клеточных функций легко взаимопревращающихся и частично взаимозаменяемых Spm и Spd. Среди этих аналогов были найдены метаболически устойчивые функционально-активные миметики Spm и Spd [2,3]. Биохимические свойства этих аналогов Spm и Spd, включая и их взаимодействие с ферментами метаболизма ПА, можно регулировать, перемещая метильную группу по скелету ПА, а на более тонком уровне, изменяя стереоконфигурацию хирального центра. Это привело к аналогу Spm, нормализующему соотношение Spm/Spd при синдроме Шнайдера-Робинсона [4]. Ферменты метаболизма ПА, природные субстраты которых ахиральны, обладают скрытой стереоспецифичностью [3].

Содержание ПА в клетке тонко регулируется небольшим короткоживущим белком антизимом (AZ). Биосинтез полноразмерного AZ происходит лишь при ПА-индуцированном +1 сдвиге рамки считывания мРНК AZ. Оказалось, что эффективность этого сдвига и неизвестную ранее ПА-зависимую димеризацию OAZ1 можно регулировать перемещением метильной группы по скелету Spd и изменяя конфигурации хирального центра [5,6].

1. Casero R.A., Murray Stewart T., Pegg A.E. (2018) Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges, and opportunities. *Nature Rev.Cancer*, 18, 681-95
2. Khomutov M., Hyvönen M.T., et.al. (2019) Unforeseen possibilities to investigate the regulation of polyamine metabolism revealed by novel C-methylated spermine derivatives. *J.Med.Chem.*, 62, 11335-47
3. Хомутов М.А., Михура И.В., и соавт. (2019) C-метилированные аналоги спермина и спермидина: синтез и биологическая активность. *Биоорган.Химия*, 45, 588–614. Обзор
4. Murray Stewart T., Khomutov M., et.al. (2020) R,R-1,12-Dimethylspermine can mitigate abnormal spermidine accumulation in Snyder-Robinson syndrome. *J.Biol.Chem.*, 295, 3247-56
5. Hyvönen M.T., Smirnova O.A., et.al. (2022) Role of polyamine-induced dimerization of antizyme in its cellular functions. *Int.J.Mol.Sci.*, 23, 4614
6. Khomutov M.A., Salikhov A.I., et.al. (2023) C-Methylated spermidine derivatives: Convenient syntheses and antizyme-related effects. *Biomolecules*, 13, 916

Работа поддержана грантом РФФ № 23-64-10018

Рибосомный белок uS3 в жизни клеток – ключевой компонент трансляционного аппарата и участник канцерогенеза

Грайфер Д.М., Очкасова А.С., Арбузов Г.Д.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,
Россия*

Рибосомные белки семейства uS3 имеют гомологов во всех доменах жизни. В малой субчастице рибосомы uS3 расположен между участком входа мРНК и декодирующим центром. Он играет ключевую роль в инициации трансляции и необходим для жизни клетки. Кроме того, uS3 эукариот имеет наиболее широкий среди рибосомных белков спектр неканонических функций, связанных с его взаимодействием с ДНК – он проявляет свойства ферментов эксцизионной репарации ДНК, участвует в регуляции транскрипции определенных генов в качестве субъединицы фактора NF-κB и т.д. Мы установили несколько неизвестных ранее принципиально важных свойств uS3 в рибосоме и вне ее. Оказалось, что в составе рибосомы белок может сшиваться с AP-сайтами в транслируемой мРНК и тем самым выполнять функции контролера качества мРНК [1]. Мы также определили аминокислотные остатки в активном центре uS3 человека, ответственные за его способность расщеплять ДНК по AP-сайтам, и выяснили, насколько зависит AP-лиазная активность белка от нуклеотидного контекста, в котором находится AP-сайт в ДНК [2]. Остается пока неизвестным, каким образом uS3 специфично участвует в процессах канцерогенеза и метастазирования. Одним из возможных путей передачи белка от злокачественных клеток здоровым является их перенос экзосомами: uS3 был обнаружен в качестве «пассажира» экзосом, секретлируемых разными видами клеток, и было показано, что его межклеточный перенос экзосомами приводит к появлению у злокачественных клеток резистентности к противораковому агенту цисплатину [3]. Этим обусловлен интерес к неизученному пока вопросу о путях упаковки uS3 (как и других рибосомных белков) в экзосомы. Согласно полученным нами данным, в этом процессе, скорее всего, участвует белок HGS – ключевой компонент комплекса ESCRT-0 (endosomal sorting complexes required for transport), функция которого состоит в узнавании убиквитинилированного «пассажира» и активации пути упаковки его в экзосому.

1. Ochkasova A.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Graifer, D.M., Karpova G.G. AP sites in various mRNA positions cross-link to the protein uS3 in the translating mammalian ribosome // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2021 – V. 1869. - 140698.
2. Ochkasova A., Arbutov G., Kabilov M., Tupikin A., Karpova G., Graifer D. AP lyase activity of the human ribosomal protein uS3: The DNA cleavage sequence specificity and the location of the enzyme active center // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2023 –V. 1871 - 140880.
3. Sun, M.-Y. et al. Cisplatin-resistant gastric cancer cells promote the chemoresistance of cisplatin-sensitive cells via the exosomal RPS3-mediated PI3K-Akt-Cofilin-1 signaling axis // *Front Cell Dev. Biol.* – 2021. – V. 9. - 618899.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 23-24-00159.

Белок-белковые взаимодействия в функционировании системы эксцизионной репарации оснований ДНК у млекопитающих

Мoor Н.А., Васильева И.А., Анарбаев Р.О., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Система эксцизионной репарации оснований (Base excision repair, BER) устраняет самые частые повреждения ДНК у млекопитающих с помощью многостадийного процесса, катализируемого рядом ферментов. Их согласованное функционирование, от которого зависит эффективность репарации, обеспечивается многочисленными взаимодействиями между ферментами и белковыми факторами. Такие комплексы ключевых ферментов апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 (APE1), ДНК-полимеразы β (Pol β), ДНК-лигазы III α (LigIII α) друг с другом и со вспомогательным ферментом тирозил-ДНК-фосфодиэстеразой 1 (TDP1), с архитектурным белком XRCC1, а также с детекторами ДНК-разрывов поли(АДФ-рибоза)-полимеразами (PARP) 1 и 2, впервые охарактеризованы нами количественными методами [1, 2]. Pol β образует самый стабильный комплекс с XRCC1 и в отсутствие последнего напрямую взаимодействует с LigIII α [1, 3]. Структура комплексов и их стабильность модулируются в различной степени ДНК-интермедиатами BER [1]. Для ДНК-зависимой модуляции взаимодействий с белками и регуляции основной активности APE1 другими белками BER важен неструктурированный N-концевой фрагмент, характерный для фермента эукариот [4]. Впервые показаны взаимодействие APE1 с поли(АДФ-рибозой) и PARP1-катализируемая модификация фермента в комплексе с AP сайт-содержащей ДНК определенной структуры, что позволило предположить новую регуляторную роль мультифункционального белка [5]. Фермент PARP2 функционирует в процессе BER подобно PARP1, образуя более динамичные комплексы с общими белками-партнерами, а его комплекс с PARP1 может обеспечивать XRCC1-независимую репарацию [6]. Важную роль в регуляции активности ферментов и белок-белковых взаимодействиях играют посттрансляционные модификации [7]. Мы изучили влияние окислительной модификации двух остатков цистеина в N-концевом домене белка XRCC1 на функции полноразмерного белка. Снижение сродства XRCC1 к поли(АДФ-рибозе) и акцепторной активности в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования в результате окисления подавляет ингибирующее действие белка на аутомодификацию PARP1 и PARP2, что может регулировать время жизни репаративного комплекса с поврежденной ДНК [8]. Эффективность репаративного синтеза ДНК в реконструированной системе зависит в меньшей степени от окислительно-восстановительного статуса XRCC1 [3].

1. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A, Lavrik O.I. *Nucleic Acids Res.*, 2015, **43**, 6009-6022.
2. Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Moor N.A., Lavrik O.I. *BBA*, 2018, **1867**, 297-305.
3. Васильева И.А., Moor Н.А., Лаврик О.И. *Биохимия*, 2020, **85**, 335-347.
4. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Lavrik O.I. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 3122.
5. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Kuznetsov N.A., Lavrik O.I. *Biochimie*, 2020, **168**, 144-155.
6. Vasil'eva I.A., Moor N.A., Anarbaev R.O., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, **22**, 4679.
7. Moor Н.А., Лаврик О.И. *Биохимия*, 2018, **83**, 564-576.
8. Васильева И.А., Moor Н.А., Лаврик О.И. *Доклады академии наук*, 2019, **489**, 89-94.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект 22-14-00112.

Синтез ДНК *ab initio* как причина неспецифической амплификации нуклеиновых кислот

Гарафутдинов Р.Р., Сахабутдинова А.Р., Газизов Р.Р., Ханова Л.И., Купова О.Ю.,
Чемерис А.В.

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, Россия

Амплификационно-опосредованные методы обнаружения ДНК- и РНК-мишеней остаются наиболее востребованным способом анализа специфических нуклеиновых кислот. Безальтернативным компонентом любой амплификационной системы являются ДНК- или РНК-полимеразы, которые, однако, не всегда способны обеспечить абсолютную точность синтеза полинуклеотидных цепей. Неоднократно была показана способность многих термостабильных ДНК-полимераз осуществлять синтез ДНК *ab initio* [1, 2], а ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью весьма склонны вести мультимеризацию нуклеиновых кислот [3, 4]. Синтез ДНК *ab initio* протекает в отсутствие специфической мишени, а для некоторых полимераз - даже при наличии только дезоксинуклеозидтрифосфатов, и приводит к продуктам со случайной, преимущественно, АТ-богатой нуклеотидной последовательностью [1]. Механизм синтеза ДНК *ab initio* не раскрыт до сих пор. Протекание неспецифической амплификации обуславливает недостаточную достоверность получаемых результатов, что снижает ценность методов молекулярной диагностики.

Нами на модельных олигонуклеотидах с гомополимерной, случайной и вырожденной последовательностями показано влияние первичной структуры ДНК на эффективность синтеза *ab initio* под действием разных типов ДНК-полимераз при различных условиях. Наибольшую скорость накопления продуктов продемонстрировали олигонуклеотиды dT₁₄ и d(CG)₆ и термостабильные ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью (Vent *exo*- и 9°Nm), наименьшую - dC₁₈, олигонуклеотиды со случайной и вырожденной последовательностями. В изотермических условиях синтез *ab initio* протекал для меньшего количества типов олигонуклеотидов, чем при термоциклировании, и приводил к набору ампликонов случайной длины, при термоциклировании - к длинноцепочечным ДНК. На видоспецифичных праймерах с 3'-олиго-dT-мотивами показано однозначное влияние их первичной структуры на специфичность обнаружения НК-мишеней с помощью ПЦР.

1. Ogata N., Miura T. Genetic information 'created' by archaeobacterial DNA polymerase // *Biochem J.* - 1997. - V. 324. - P. 667-671.
2. Ogata N., Miura T. Creation of genetic information by DNA polymerase of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* // *Nucleic Acids. Res.* - 1998. - V. 26. - P. 4657-4661.
3. Hafner G.J., Yang I.C., Wolter L.C., Stafford M.R., Giffard P.M. Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase // *BioTechniques.* - 2001. - V. 30. - P. 852-867.
4. Garafutdinov R.R., Gilvanov A.R., Sakhabutdinova A.R. The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase // *Appl. Biochem. Biotechnol.* - 2020. - V. 190. - P. 758-771.

Исследование было поддержано грантом РНФ № 22-24-00235.

Преимущества отбора аптамеров с использованием нанопорового секвенирования

Сергеев А.В., Грабовенко Ф.И., Субач М.Ф., Родин В.А., Хренова М.Г., Зверева М.Э.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Одним из методов комбинаторной химии для отбора молекул нуклеиновой кислоты (НК), специфически узнающих мишени различной природы, является искусственная эволюция лигандов экспоненциальным обогащением или SELEX (от англ. Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment). Полученные SELEX нуклеиновые кислоты, обычно дополнительно оптимизируют для повышения сродства к мишени. Такие НК называют аптамерами и используют для фундаментальных исследований, в качестве терапевтических средств и синтетических «аналогов антител» для создания биосенсорных систем и др. Ранее на основе предложенного нами подхода, состоящего в использовании пред-структурированных НК библиотек, мы отобрали уникальный аптамер к поверхностному белку коронавируса 2 тяжелого острого респираторного синдрома и определили его с помощью нанопорового секвенирования [1], показали сродство этого аптамера к мишени [2], получили примеры реализации и оптимизации применения в биосенсорике [3]. Полученные данные используются для оптимизации концепции отбора из исходно модифицированных библиотек НК, которая была предложена для неестественных генетически кодируемых полимеров, похожих на нуклеиновые кислоты [4].

В докладе представлено развитие направления эффективного отбора аптамеров за счет объединения SELEX с использованием пред-структурированных библиотек, энзиматического введения модификаций в НК (напр. метилирования), повышающих сродство к мишени, на стадии отбора с определением последовательности НК методом нанопорового секвенирования. На первом этапе, исследована возможность *in vitro* метилирования фрагментов ДНК, пригодных для нанопорового секвенирования и эффективность определения положений модификации этим методом. Получены данные о субстратной специфичности различных C5-ДНК-метилтрансфераз.

1. Khrenova M, et al. In vitro Selection of an Aptamer Targeting SARS-CoV-2 Spike Protein with Nanopore Sequence Identification Reveals Discrimination Between the Authentic Strain and Omicron// ChemRxiv. - 2022. doi:10.26434/chemrxiv-2022-d9gcs.
2. Grabovenko F., et al. Glycosylation of receptor binding domain of sars-cov-2 s-protein influences on binding to immobilized dna aptamers. // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V.23 – P.557.
3. Samodelova M., et al. Model of the sars-cov-2 virus for development of a dna-modified, surface-enhanced raman spectroscopy sensor with a novel hybrid plasmonic platform in sandwich mode. // Biosensors. - 2022. V.12 – P.768.
4. Pinheiro V. B., et al.// Science. – 2012. – V.336 -P.341-344. doi:10.1126/science.1217622

Работа выполнена при поддержке Программы развития МГУ, проект № 23-Ш04-45.

Влияние нарушений синтеза рибосомных белков человека на экспрессию генов

Бабайлова Е.С., Золотёнкова Е.А., Гопаненко А.В., Тянь Ю., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Малыгин А.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Для биосинтеза новых белков клетки нуждаются в большом количестве рибосом, поэтому рибосомные гены являются одними из наиболее активно транскрибируемых генов. Для сборки субчастиц рибосом человека требуется 80 различных рибосомных белков, которые должны синтезироваться примерно в эквимольном количестве. Любое нарушение экспрессии хотя бы одного из генов рибосомных белков приводит к серьёзному дисбалансу клеточного гомеостаза и влияет на протекание клеточных процессов, приводя к заболеваниям и вызывая аномалии в развитии организма. Известно, что наследственная гаплонедостаточность некоторых рибосомных белков является причиной таких болезней, как анемия Даймонда-Блекфена, миелодиспластический синдром, острый миелоидный лейкоз и ряда других, которые объединены под общим названием рибосомопатии. Различные формы рака также ассоциированы с изменениями в генах рибосомных белков. В частности, у 5% пациентов с анемией Даймонда-Блекфена имеются мутации в гене, кодирующим рибосомный белок uL5, а мутации в гене рибосомного белка uS10 связывают с предрасположенностью к колоректальному раку.

Для выявления последствий нарушения синтеза рибосомных белков uL5, uS10 и uL15 на экспрессию генов в клетках человека, мы с помощью RNA-seq изучили состав транскриптома и транслятома клеток НЕК293Т либо дефицитных по белку uL5 [1], либо продуцирующих мутантные формы белка uS10, выявленные у пациентов с наследственной предрасположенностью к колоректальному раку [2], либо продуцирующих мутантную форму белка uL15, не способную к гидроксильрованию [3]. Анализ полученных данных позволил выявить значительную реорганизацию экспрессии большого числа генов на уровнях транскрипции и трансляции и обнаружить эффекты, способные объяснить причины заболеваний, связанных с дисбалансом указанных рибосомных белков.

1. Babaylova E.S., Gopanenko A.V., Tupikin A.E., Kabilov M.R., Malygin A.A., др. всего 6 человек. Deficiency of the ribosomal protein uL5 leads to significant rearrangements of the transcriptional and translational landscapes in mammalian cells. // Int. J. Mol. Sci. - 2021, - V. 22. – P. 13485.
2. Tian Y., Babaylova E.S., Gopanenko A.V., Tupikin A.E., Kabilov M.R., др. всего 7 человек. Changes in the transcriptome caused by mutations in the ribosomal protein uS10 associated with a predisposition to colorectal cancer. // Int. J. Mol. Sci. - 2022, - V. 23. – P. 6174.
3. Zolotenkova E.A., Gopanenko A.V., Tupikin, A.E., Kabilov M.R., Malygin, A.A. Mutation at the site of hydroxylation in the ribosomal protein uL15 (RPL27a) causes specific changes in the repertoire of mRNAs translated in mammalian cells. // Int. J. Mol. Sci. - 2023, - V. 24. – P. 6173.

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-14-00039.

Конформационная пластичность как ключевой элемент контроля субстратной специфичности апуриновых/апиримидиновых эндонуклеаз

Кузнецов Н.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Апуриновые/апиримидиновые (АР) эндонуклеазы играют одну из ключевых ролей в эксцизионной репарации оснований ДНК. Считается, что основной биологической функцией этих ферментов является гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АР-сайтов, в результате которого образуется 5'-дезоксирибофосфат и 3'-ОН группа. Известно также, что эти ферменты могут узнавать в качестве субстратов не только АР-сайты, но и ряд поврежденных нуклеотидов, таких как 2'-дезоксидигидроуридин, альфа-аномер 2'-дезоксиаденозина, 2'-дезоксидеаноаденозин, 2'-дезоксидиуридин и другие (NIR-активность). Кроме того, в число активностей некоторых АР-эндонуклеаз входят 3'-фосфодиэстеразная, 3'-5'-экзонуклеазная, 3'-фосфатазная и РНКазная.

Традиционно АР-эндонуклеазы разделяют на два больших семейства Exo III/Xth и Endo IV/Nfo, представленные экзонуклеазой III (Xth) и эндонуклеазой IV (Nfo) *Escherichia coli*, соответственно. В то время как члены семейства Xth широко представлены во всех доменах жизни, АР-эндонуклеазы семейства Nfo встречаются у низших организмов, но отсутствуют у растений, млекопитающих и других позвоночных.

Несмотря на большой интерес к выяснению механизмов распознавания нуклеотидов-мишеней АР-эндонуклеазами и природы контактов, которые определяют специфичность этих ферментов к широкому спектру различных поврежденных и неповрежденных нуклеотидов, вопрос о том, как конкретный нуклеотид распознается активным центром фермента, до сих пор оставался неясным.

В рамках данной работы проведено систематическое исследование молекулярно-кинетических механизмов узнавания повреждений и их удаления про- и эукариотическими АР-эндонуклеазами. Анализ конформационных перестроек АР-эндонуклеаз и их модельных ДНК-субстратов в процессах узнавания поврежденного нуклеотида, образования каталитического комплекса и катализа позволил предложить обобщенную модель узнавания повреждений, которая обеспечивает высокую субстратную специфичность данных ферментов. Эта модель включает несколько стадий: 1) изгиб и локальное раскручивание двойной спирали, 2) выворачивание поврежденного нуклеотида из ДНК в активный центр и 3) в случае EndoQ дополнительную верификацию поврежденного основания в активном центре путем образования специфических контактов. Таким образом, можно предположить, что способность поврежденного нуклеотида выворачиваться из двойной спирали и располагаться в активном центре фермента в ответ на образование контактов в ДНК-связывающем центре, по-видимому, является ключевым фактором, обеспечивающим субстратную специфичность АР-эндонуклеаз.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-44-00064.

ДНК-полимеразы β и λ : общие свойства и структурные различия

Речкунова Н.И., Мальцева Е.А., Лебедева Н.А., Жданова П.В., Коваль В.В., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

ДНК-полимеразы β (Pol β) и λ (Pol λ) относятся к одному структурному X-семейству. Оба фермента обладают активностями, необходимыми для репаративного синтеза: катализируют синтез ДНК в бреши, в том числе на поврежденных матрицах, обладают 5'-dRP-лиазной активностью, а также способны вести синтез с вытеснением цепи. Pol β признана центральной в процессе заполнения однонуклеотидной бреши, возникающей в процессе эксцизионной репарации оснований (BER), а роль Pol λ в этом процессе так и остается не до конца выясненной. Основное отличие этих ДНК-полимераз заключается в наличии в структуре Pol λ некаталитического N-концевого участка, включающего BRCT-домен и серин/пролин-богатую область. Проведен анализ влияния мультифункциональных белков – поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1) и репликативного белка А (RPA) на активность Pol β , Pol λ и ее усеченной формы (Pol λ ΔN). Показано, что активности ферментов модулируются PARP1 и RPA в зависимости от соотношения концентраций белков. Некаталитические домены Pol λ играют супрессорную роль как по отношению к полимеразной активности фермента, так и во взаимодействии с ДНК и PARP1, что, вероятно, снижает эффективность ее функционирования в процессе BER. Оба фермента способны катализировать синтез ДНК на структурах, содержащих разрыв и объемное повреждение – производное бенз[а]пирена (BPDE-dG) в противоположной цепи. Эффективность и точность репарационного синтеза в брешах, катализируемого Pol β и λ , зависят от конформации BPDE-dG и его положения относительно бреши. Pol λ селективно включает комплементарный dCTP только напротив *cis*-BPDE-dG, тогда как Pol β встраивает как правильный, так и ошибочные нуклеотиды напротив обоих изомеров [1]. N-концевые домены Pol λ не влияют на селективность ДНК-полимеразы в отношении изомеров BP-dG: Pol λ ΔN встраивает комплементарный dC в брешь только напротив *cis*-BP-dG с той же эффективностью, что и полноразмерная Pol λ . Методом молекулярной динамики выявлены структурные особенности комплекса Pol λ с ДНК, содержащей однонуклеотидную брешь напротив *cis*-BPDE-dG, обеспечивающие селективность фермента в отношении этого конформера [2].

1. Starostenko L.V., Rechkunova N.I., Lebedeva N.A., Kolbanovskiy A., Geacintov N.E., Lavrik O.I. Human DNA polymerases catalyze lesion bypass across benzo[a]pyrene-derived DNA adduct clustered with an abasic site // DNA Repair. – 2014. – V. 24. – P. 1–9.
2. Rechkunova N.I., Zhdanova P.V., Lebedeva N.A., Maltseva E.A., Koval V.V., Lavrik O.I. Structural features of DNA polymerases β and λ in complex with benzo[a]pyrene-adducted DNA cause a difference in lesion tolerance // DNA Repair. – 2022. – V. 116. – P. 103353.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект 21-64-00017.

На стыке репарации и репликации: комплекс ХРА-FEN1

Красикова Ю.С., Мальцева Е.А., Ходырева С.Н., Речкунова Н.И., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

За последнее десятилетие вырос объем данных о взаимодействии между белками-участниками различных путей метаболизма ДНК. В частности, накапливаются данные о белок-белковых взаимодействиях между факторами репарации и репликации.

В случае эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) репликационная машина загружается после первого разреза поврежденной цепи с 5'-стороны от повреждения, катализируемого нуклеазой XPF-ERCC1. На сегодняшний день известно 3 варианта компоновки NER-привлекаемой репликационной машины: (ДНК полимеразы δ / PCNA/ RFC1-RFC-p66), (ДНК полимеразы ϵ / STF18/RFC) или (ДНК полимеразы κ / убиквитинилированный PCNA/ XRCC1). Как происходит отбор состава репликационной машины, пока неизвестно.

Необходимым компонентом комплекса репликации также является флэп эндонуклеаза 1 (flap endonuclease 1, FEN1) – высококонсервативная структурно-специфичная нуклеаза, которая катализирует расщепление одноцепочечного выступающего из дуплекса участка ДНК – 5'-флэпа. Внутри репликационной машины FEN1 образует прочный комплекс с PCNA.

ХРА является центральным организующим элементом системы NER, который абсолютно необходим для функционирования этого процесса. Ранее мы показали, что ХРА может оставаться в комплексе NER и после первого разреза поврежденной цепи [1]. Из литературных данных известно, что ХРА напрямую взаимодействует с PCNA, а также показано, что ХРА и PCNA ко-локализуются в очагах повреждения ДНК.

В данной работе мы показали образование тройного комплекса FEN1-ХРА-ДНК на ДНК, моделирующих интермедиат NER после первого разреза. Эти ДНК содержали 31-нуклеотидный 5'-флэп, несущий объемное повреждение, в сочетании с 3-, 10- или 26-нуклеотидной брешью. Образование комплекса FEN1-ХРА зарегистрировано также в отсутствие ДНК. Функциональные исследования показали, что ХРА незначительно ингибирует каталитическую активность FEN1, поэтому биологическая функция образования этого комплекса пока неясна.

1. Krasikova, Y.S., Rechkunova, N.I., Maltseva, E.A., Lavrik, O.I. (2018) RPA and XPA interaction with DNA structures mimicking intermediates of the late stages in nucleotide excision repair. PLoS One, 13(1), e0190782. doi: 10.1371/journal.pone.0190782.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект 19-74-10056

Структурно-динамические аспекты функционирования ДНК-диоксигеназ семейства AlkB

Канажевская Л.Ю.^{1,2}, Лукина М.В.^{1,2}, Горбунов А.А.², Смышляев Д.А.^{1,2}, Коваль В.В.^{1,2}
и Федорова О.С.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

Негемовая диоксигеназа AlkB является частью адаптивного ответа (Ada) *E. coli* и защищает бактериальный геном от алкильных повреждений, благодаря способности удалять алкильные группы с нуклеофильных центров азотистых оснований. Повышенная экспрессия AlkB и других белков SOS-ответа обеспечивает устойчивость бактерий к действию метилирующих агентов. Гомологи Fe(II)/2OG-зависимой диоксигеназы AlkB широко представлены в клетках эукариот, где они катализируют окислительное деалкилирование в процессах репарации и эпигенетической регуляции. Среди субстратов, узнаваемых ферментами семейства AlkB, N1-метиладенин, N3-метилцитозин, N1-метилгуанин, N3-метилтимин, 1,N6-этноаденин, N6-метиладенин и др. Характерной особенностью структуры негемовых диоксигеназ является наличие β -складчатого DSBH-домена, координирующего ион железа и ко-субстрат 2-оксоглутарат. Связывание с субстратом обеспечивается спиральными и петлевыми структурами, которые отличает низкий уровень консервативности. Предполагается, что эти различия лежат в основе широкой субстратной специфичности диоксигеназ. В организме человека было обнаружено девять гомологичных белков ALKBH1-9, обладающих совершенно разными биологическими функциями, которые не ограничиваются репарацией ДНК.

AlkB-подобные белки, участвующие в процессах репарации, вызывают большой интерес ввиду высокой вариабельности уровня их экспрессии при онкогенезе. Предпринимаются попытки создания специфических ингибиторов диоксигеназ с целью повышения эффективности химиотерапии. Окисление метильных групп с участием негемового железа представляет собой сложный многоступенчатый процесс, и для его глубокого понимания недостаточно данных о кристаллической структуре ферментов. Для детального понимания динамических аспектов узнавания, связывания и превращения субстратов мы применили комплексный подход, который включает методы быстрой кинетики, флуоресцентной спектроскопии, а также спектроскопии кругового дихроизма. Охарактеризована конформационная динамика фермент-субстратных комплексов бактериальной диоксигеназы AlkB и ее человеческих гомологов. Полученные данные позволили соотнести изменения конформации белка и ДНК-субстратов с конкретными стадиями каталитического цикла и количественно описать эти изменения кинетическими параметрами. Установлено, что стабильность комплексов диоксигеназ с поврежденной ДНК не зависит от присутствия в активном центре ионов металла и ко-субстрата. С использованием сайт-направленного мутагенеза исследовано влияние замен ключевых аминокислотных остатков диоксигеназы ALKBH3 на пространственную структуру и каталитическую активность белка.

Работа была поддержано грантом РФФ № 22-24-00699.

Роль аминокислотных остатков активного центра ДНК-диоксигеназы человека АВН2 в процессе деметилирования ДНК

Давлетгильдеева А.Т.¹, Тюгашев Т.Е.¹, Джао М.², Кузнецов Н.А.¹, Кузнецова А.А.¹

¹ *Институт Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия*

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов является важным путем контроля реализации генетической информации живыми организмами. Сайт-специфическое метилирование ДНК представляет собой один из важнейших путей обеспечения данного процесса. Контроль уровня метилирования за счет удаления метильных групп из ДНК, главным образом, катализируется негемовыми Fe(II)/ α -кетоглутарат-зависимыми ДНК-диоксигеназами. Диоксигеназы семейства AlkB представляют собой ферменты репарации, которые катализируют прямое удаление алкильных групп из оснований ДНК, таких как 3-метилцитидин (m^3C), 1-метиладенозин (m^1A), 1,N⁶-этенoadенозин и другие. Однако ферменты семейства AlkB (включая ферменты человека АВН2 и АВН3) способны окислять такие эпигенетические модуляторы как 5-метилцитидин (m^5C), 5-гидроксиметилцитидин и др. *in vitro*. При этом переключение между анти-конформацией (m^3C) и син-конформацией (m^5C) может иметь ключевое значение для осуществления каталитического окисления метильных групп в активном центре фермента.

В ходе данного исследования проводили ремоделирование активного центра ДНК-диоксигеназы человека АВН2 посредством внесения в него точечных мутаций для получения вариантов, обладающих свойствами, отличными от фермента дикого типа. На основании анализа структурных данных был отобран ряд аминокислотных остатков, предположительно способных формировать водородные связи с метилированными основаниями (в том числе с m^5C) или приводить к стерическим затруднениям в процессе выворачивания модифицированного основания в активный центр фермента. Функциональное картирование кармана, связывающего повреждение, было выполнено путем анализа роли таких аминокислотных остатков как Val99, Arg110, Tyr122, Phe124, Ser125, Ile168, Arg172, Asp173 и Glu175, в механизме распознавания поврежденного основания. Взаимодействие АВН2 дикого типа или его мутантов, содержащих замену одного из перечисленных аминокислотных остатков на аланин, с поврежденной ДНК, содержащей метилированное основание m^1A или m^3C или эпигенетический маркер m^5C , анализировали с помощью моделирования методом молекулярной динамики и анализа кинетики фермент-субстратного взаимодействия. Сравнительный анализ ферментов выявил влияние замен на связывание ДНК и каталитическую активность. В совокупности эти данные проливают свет на молекулярные и кинетические последствия замены остатков активного центра на механизм распознавания субстрата.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-14-00018.

Двойственная роль метилирования GGQ мотива фактора терминации трансляции eRF1 человека

Бизяев Н.С.¹, Шувалов А.В.^{1,2}, Егорова Т.В.^{1,2}, Торопыгин И.Ю.³, Шувалова Е.Ю.^{1,2},
Евменов К.С.¹, Алкалаева Е.З.^{1,2}

¹ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
Москва, Россия

Фактор терминации трансляции 1 класса является основным участником процесса завершения рибосомой синтеза белка. Он распознает стоп кодон и индуцирует гидролиз пептидил-тРНК, что вызывает высвобождение синтезированного белка из рибосомы. GGQ мотив критически важен для гидролиза связи между тРНК и пептидом и консервативен у факторов терминации 1 класса всех живых организмов. Более того, остаток глутамина этого мотива универсально подвергается метилированию. Для прокариотического фактора показано, что метилирование существенно повышает эффективность гидролиза пептидил-тРНК, однако для эукариотического фактора терминации 1 класса (eRF1) его функциональное значение оставалось не изученным. Мы изучили, как метилирование eRF1 человека влияет на его активность в трансляции, используя различные *in vitro* системы трансляции эукариот.

Для получения метилированного eRF1 человека мы разработали *in vivo* систему метилирования рекомбинантного eRF1 в клетках *E. coli*, коэкспрессирующих, помимо eRF1, метилтрансферазу NEMK2 и ряд ко-факторов, необходимых для метилирования. Нам удалось получить полностью метилированный препарат eRF1, что было подтверждено масс-спектрометрией.

Мы обнаружили, что метилирование eRF1 повышает скорость гидролиза пептидил-тРНК, но лишь в условиях подавленной терминации трансляции: в случае синтеза короткого пептида, негативного влияния последнего остатка аминокислоты синтезируемого белка, мутаций аминокислотных остатков eRF1, окружающих GGQ мотив. Это подтверждает роль метилирования eRF1 как стимулятора реакции гидролиза пептидил-тРНК, которая характерна и для бактериальных факторов.

Помимо этого, оказалось, что метилирование eRF1 предотвращает распознавания смысловых кодонов фактором терминации трансляции. Таким образом, вторая роль метилирования eRF1 человека – контроль точности терминации трансляции.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00279.

Отсутствие гидроксилирования His39 в рибосомном белке uL15 вызывает изменения в репертуаре транслируемых мРНК в клетках НЕК293Т

Золотёнова Е.А., Гопаненко А.В., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Малыгин А.А.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,
Россия*

Рибосомный белок uL15 (RPL27A) – один из трёх белков рибосомы млекопитающих, подвергающихся посттрансляционной модификации – гидроксилированию, осуществляемому рибосомными оксигеназами. uL15 гидроксилируется по остатку гистидина 39 (His39), который располагается вблизи ССА конца Е-сайт-связанной тРНК и примыкает к участку связывания циклогексимида – ингибитора трансляции.

Ранее было показано, что белок uL15 с мутацией His39Ala, не способный гидроксилироваться, успешно встраивается в рибосому, однако при этом наблюдается снижение уровня полисом в клетках, продуцирующих такой белок [1].

Для выявления роли гидроксилирования остатка His39 мы трансфицировали клетки НЕК293Т плазмидными конструкциями, кодирующими 3xFLAG-меченую мутантную форму белка uL15 His39Ala, не способную гидроксилироваться, или 3xFLAG-меченый белок дикого типа в качестве контроля. Как и в предыдущем исследовании, в случае образцов с мутантным uL15 количество полисом было меньшим, чем в образцах с uL15 дикого типа. При помощи RNA-seq анализа общеклеточной мРНК и мРНК, ассоциированной с полисомами, мы определили гены, экспрессируемые дифференциально в зависимости от наличия мутации в белке (tDEGs и pDEGs соответственно). Всего было выявлено 229 активируемых и 89 подавляемых pDEGs и 133 активируемых и 122 подавляемых tDEGs [2].

Мы выявили, что в клетках с мутантной формой белка uL15 уровень более распространённых мРНК и мРНК с короткой кодирующей последовательностью повышается, а уровень длинных мРНК и более редких соответственно снижается [2].

Полученные данные показывают важную роль гидроксилирования остатка His39 белка uL15 как для правильного функционирования рибосом, так и для процессов трансляции в клетке.

1. Yanshina, D.D.; Gopanenko, A.V.; Karpova, G.G.; Malygin, A.A. Replacement of hydroxylated His39 in ribosomal protein uL15 with Ala or Thr impairs the translational activity of human ribosomes. // Mol. Biol. - 2020, - V. 54, - P. 449–457.
2. Zolotenkova E.A., Gopanenko A.V., Tupikin, A.E., Kabilov M.R., Malygin, A.A. Mutation at the site of hydroxylation in the ribosomal protein uL15 (RPL27a) causes specific changes in the repertoire of mRNAs translated in mammalian cells. // Int. J. Mol. Sci. - 2023, - V. 24. – P. 6173.

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-14-00039.

PARP1/2/3 в компактизации нуклеосом

Украинцев А.А., Кутузов М.М., Белоусова Е.А., Лаврик О.И.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск,
Россия*

Одной из быстроразвивающихся научных тематик является исследование механизмов репарации ДНК. Эксцизионная репарация оснований (BER) является одним из ключевых механизмов поддержания стабильности генома. Установлено, что ДНК-зависимые белки семейства ARTD: PARP1, PARP2 и PARP3, участвуют в регуляции процесса BER. Они катализируют реакцию переноса остатка ADP-рибозы на белки-мишени. Эта посттрансляционная модификация регулирует многие метаболические процессы клетки. Исследование механизма BER ведётся уже долгое время, и большинство результатов получены с использованием свободных ДНК-субстратов. Однако в клетке ДНК компактизована в белок-нуклеиновый комплекс – хроматин, базовым звеном которого является нуклеосома.

Для изучения функционирования BER на нуклеосомных субстратах, требуется исследовать природу взаимодействия белков PARP с нуклеосомой в контексте процесса BER. Было измерено сродство белков к нуклеосомам, содержащим нативную ДНК, ДНК с АП-сайтом или однонуклеотидной брешью (Gap). Изучена топология комплексов нуклеосома-PARP1/PARP2/PARP3 с использованием метода футпринтинга. Используя атомно-силовую микроскопию, было исследовано взаимодействие ДНК-зависимых PARP с модельной нуклеосомой и изучены геометрические параметры модельной нуклеосомы и нуклеосомы в комплексе с PARP. Результаты показали, что PARP1 и PARP2 не оказывают значительного влияния на нуклеосому, а PARP3 стабилизирует и уплотняет нуклеосомный комплекс.

Таким образом, исследования показывают важность ДНК-зависимых белков семейства PARP в процессе репарации ДНК, их взаимодействие с нуклеосомой и влияние на структуру хроматина. Это расширяет наши знания о механизмах репарации ДНК и функционировании клеточных процессов.

1. Ukraintsev, A. A., Belousova, E. A., Kutuzov, M. M., & Lavrik, O. I. (2022). Study of Interaction of the PARP Family DNA-Dependent Proteins with Nucleosomes Containing DNA Intermediates of the Initial Stages of BER Process. *Biochemistry. Biokhimiia*, 87(4), 331–345. <https://doi.org/10.1134/S0006297922040034>
2. Ukraintsev, A., Kutuzov, M., Belousova, E., Joyeau, M., Golyshev, V., Lomzov, A., & Lavrik, O. (2023). PARP3 Affects Nucleosome Compaction Regulation. *International journal of molecular sciences*, 24(10), 9042. <https://doi.org/10.3390/ijms24109042>

*Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории структурной биологии ИХБФМ СО РАН: Ломзову А.А. и Гольшеву В.М., за помощь в освоении АСМ.
Работа выполнена при поддержке РФФ № 22-74-10059.*

Влияние фактора модификации гистонов HPF1 на активность поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 при взаимодействии с нуклеосомами

Кургина Т.А., Моор Н.А., Кутузов М.М., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Поли(АДФ-рибоза) (ПАР) - отрицательно заряженный полимер, состоящий из повторов АДФ-рибозы. Синтез данного полимера осуществляют ферменты поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP). Наиболее изученный член семейства PARP, PARP1, является широко распространенным ядерным белком, участвующим во многих клеточных процессах, в том числе в регуляции репарации ДНК. PARP1 служит сенсором повреждений ДНК, обычно вызванных ионизирующим облучением и окислительным стрессом. PARP2 также является ферментом, катализирующим синтез ПАР. PARP1 и PARP2 имеют значительную гомологию структуры каталитических доменов, но их ДНК-связывающие домены существенно отличаются. Это накладывает отпечаток как на взаимодействие ферментов с ДНК, так и на катализ. PARP1 и PARP2 являются ДНК-зависимыми поли(АДФ-рибоза)полимеразами, связывание поврежденной ДНК необходимо для их каталитической активации. Субстратом для PARP служит NAD⁺. Ферменты катализируют перенос остатков АДФ-рибозы, модифицируя аминокислотные остатки белков-мишеней, в том числе самого себя. Поли(АДФ-рибозил)ирование (ПАРилирование), катализируемое PARP, является одним из немедленных клеточных ответов на повреждение ДНК. Недавно был открыт новый фактор ПАРилирования гистонов (HPF1), который модулирует активность PARP1/2. HPF1 образует совместный активный центр с PARP1/2, что позволяет ферментам модифицировать гистоны [1]. Общая картина взаимодействия HPF1 с PARP только начинает проясняться. В представленном исследовании мы впервые демонстрируем, что HPF1 может стимулировать аутоПАРилирование PARP1/2 и гетероПАРилирование гистонов в контексте нуклеосом. HPF1 более эффективно стимулирует PARP2 по сравнению с PARP1, и эффект стимуляции зависит от структуры повреждения ДНК. Мы приводим доказательства того, что HPF1 может вызывать противоположные эффекты на разных стадиях реакции, катализируемой PARP1/2: он стимулирует ранние стадии и ингибирует удлинение путем экранирования аминокислотных остатков, важных для удлинения цепи ПАР [2].

1. Suskiewicz M.J., Zobel F., Ogden T.E.H., Fontana P., Ariza A., Yang J.C., Zhu K., Bracken L., Hawthorne W.J., Ahel D., Neuhaus D., Ahel I. HPF1 completes the PARP active site for DNA damage-induced ADP-ribosylation // Nature. – 2020. – V. 579. – No. 7800. – P.598.4.

2. Kurgina T.A., Moor N.A., Kutuzov M.M., Naumenko K.N., Ukraintsev A.A., Lavrik O.I. Dual function of HPF1 in the modulation of PARP1 and PARP2 activities // Communications Biology. Nature Research. – 2021. – V. 4. – No. 1.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 22-74-10059

Общие механизмы развития аутоиммунных заболеваний и роль каталитически активных антител-абзимов в патогенезе этих патологий

Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Точные в деталях механизмы развития большого числа аутоиммунных заболеваний (АИЗ) пока не установлены. В работе [Ikehara et al., 1990], было сделано предположение, что АИЗ могут быть вызваны дефектами гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Позже в работах нашей лаборатории было доказано, что спонтанное и индуцированное разными антигенами развитие АИЗ происходит за счет специфической перестройки иммунной системы, связанной с нарушением профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга (СККМ; для обзора смотри главы в книгах: Nevinsky et al., 2005, 2010, 2011, 2017, 2023). Эти нарушения ведут к появлению лимфоцитов, продуцирующих абзимы с разными каталитическими активностями. Было показано, что обнаружение различных антител-абзимов является наиболее статистически значимым и самым ранним маркером начала многих АИЗ. Каталитическую активность антител легко выявлять даже на самых ранних стадиях развития АИЗ до однозначного выявления типичных медицинских маркеров различных АИЗ.

Было показано, что IgG из сыворотки контрольных неаутоиммунных мышей СВА и BALB/c в возрасте 2-10 месяцев и склонных к спонтанному развитию СКВ мышей MRL-lpr/lpr в возрасте 2-3 месяцев (условно здоровые мыши) каталитически неактивны. При спонтанном развитии глубокой СКВ патологии специфическая первичная перестройка иммунной системы этих мышей привела к наработке IgG, гидролизующих ДНК, АТФ и полисахариды с низкой активностью (условно пред-болезненные мыши). Очень сильное возрастание этих активностей, наблюдалось на втором этапе изменения профиля дифференцировки СККМ, повышением уровня пролиферации лимфоцитов в различных органах и переходом мышей к глубокой патологии. Ускорение развития СКВ и максимальное увеличение активности всех абзимов обнаружено у мышей, иммунизированных комплексом ДНК с белком, которые по сравнению с пред-больными и спонтанно заболевшими мышами характеризовались другим профилем дифференцировки СККМ.

Для анализа возможных механизма развития рассеянного склероза (РС) были использованы мыши трех линий C57BL/6, Th и 2D2, склонных к спонтанному развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ), отражающего особенности РС у людей. У всех трех линий ЭАЭ и СКВ мышей были обнаружены в некоторой мере сходные изменения профилей дифференцировки СККМ и роста уровня пролиферации лимфоцитов в разных органах в процессе спонтанного развития этих АИЗ и после иммунизации мышей с помощью МОГ (миелин-олигодендроцитарный гликопротеин) и комплекса ДНК с гистонами.

Проведен анализ причин исключительного многообразия абзимов с самыми разными активностями у больных АИЗ. С помощью фагового дисплея показано, что абзимы с протеолитической активностью могут быть серин-, тиол- и металлопротеазами, белковые последовательности активных центров которых близки к таковым для соответствующих канонических протеаз, а с ДНКазной активностью для классических ДНКаз. Обнаружены моноклональные абзимы с протеазной и ДНКазной активностями, активные центры которых содержат структурные элементы как ДНКаз, так и протеаз.

Работа поддержана грантом РФФ - 22-15-00103.

Каталитические антитела у мышей 2D2 и Th с трансгенными рецепторами T- и В-лимфоцитов при инициации экспериментального энцефаломиелита с помощью иммунизации

Аулова К.С., Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

При различных аутоиммунных заболеваниях в крови пациентов появляются антитела, способные катализировать различные реакции – гидролиз нуклеиновых кислот, белков, олигосахаридов, а также окисление различных субстратов. IgG с такими активностями в крови и спинно-мозговой жидкости обнаруживают в том числе при рассеянном склерозе. Ранее было показано, что после инициации иммунизацией экспериментального энцефаломиелита (ЭАЭ), моделирующего процессы при рассеянном склерозе человека, в крови мышей C57BL/6 обнаруживают антитела с протеолитической, ДНКазной, оксидоредуктазной и пероксидазной активностями. Наличие каталитических антител показано и у мышей линий 2D2 и Th, склонных к спонтанному развитию заболевания за счет трансгенных рецепторов лимфоцитов, специфичных к миелинолигодендрогликовому гликопротеину (МОГ) – T-клеточного рецептора у особей 2D2 и В-клеточного рецептора у особей Th.

В данной работе сравнивали изменения активностей IgG в гидролизе ДНК, гистонов, основного белка миелина и пептида МОГ₃₅₋₅₅ из крови самцов и самок мышей линий 2D2 и Th после иммунизации с помощью МОГ₃₅₋₅₅. Значительное повышение ДНКазной активности IgG у мышей 2D2 (более чем в 50 раз) наблюдали на 7 день, до увеличения титров антител крови к ДНК в острой фазе ЭАЭ (14-20 день). Эти показатели соотносятся с данными о повышении активности антител в гидролизе ДНК на начальных стадиях аутоиммунных заболеваний. И у самцов, и у самок линии Th постепенно повышалась активность IgG в гидролизе МОГ₃₅₋₅₅ при снижающемся уровне антител к пептиду. Активность IgG в гидролизе другого компонента миелина, а именно основного белка миелина, достигала пиковых значений у особей обеих линий к 43-57 дню после иммунизации. Антитела 2D2 и Th также способны гидролизовать гистоны – профили изменения активностей IgG в гидролизе каждого из пяти гистонов различались у самцов и самок обеих линий.

Наблюдаемые параметры сопровождались изменениями в профилях дифференцировки миелоидных стволовых клеток костного мозга в колониеобразующие единицы – ранее было показано, что подобные нарушения могут приводить к наработке каталитических антител при аутоиммунных процессах. Также наблюдаемые изменения доли CD4⁺ T клеток и CD19⁺ В клеток в крови и иммунных органах обеих линий предполагают возможное включение в патогенез ЭАЭ не только клеток со специфичными к МОГ трансгенными рецепторами, но и лимфоцитов из эндогенного репертуара. Наличие активностей антител в гидролизе белков миелина, ДНК и гистонов может отражать распространение эпитопов преобладающих антигенов при ЭАЭ и образование каталитических антител к компонентам нуклеосом, высвобождающихся при апоптозе клеток в ходе аутоиммунных заболеваний.

Исследование было поддержано грантом 22-15-00103.

Антитела крови аутоиммунных мышей при спонтанном и антиген-индуцированном развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита

Урусов А.Е., Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Известно, что развитие аутоиммунных заболеваний в результате изменения профиля дифференцировки стволовых клеток костного мозга сопровождается образованием антител, проявляющих разнообразные каталитические активности – абзимов. Появление каталитических антител может достоверно свидетельствовать о начале аутоиммунного заболевания, а повышение их активности связано с развитием патологии и является индикатором интенсивности патологического процесса. Важной частью исследований аутоиммунных заболеваний является изучение активности антител в биологических жидкостях на разных этапах развития патологии.

Целью работы было изучение изменения активности антител плазмы крови мышей линии C57BL/6, склонных к развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЭАЭ), являющегося моделью рассеянного склероза человека, в процессе спонтанного развития ЭАЭ и после иммунизации мышей МОГ (миелинолигодендроцитарного гликопротеина) и комплексом ДНК с пятью гистонами.

С помощью аффинной хроматографии были выделены гомогенные препараты антител из крови мышей линии C57BL/6, не иммунизированных и иммунизированных с помощью МОГ и комплекса ДНК с гистонами. Было показано, что уровень каталазной, амилазной, РНКазной, фосфатазной и протеолитической активностей данных антител существенно увеличивается при спонтанном развитии ЭАЭ, а иммунизация мышей указанными антигенами приводит к ещё более сильному возрастанию активностей абзимов.

Особое внимание было уделено анализу относительной активности и субстратной специфичности антител против пяти индивидуальных гистонов (H1, H2A, H2B, H3 и H4) и основного белка миелина (ОБМ) в гидролизе этих гистонов и ОБМ. Было показано, что, в отличие от абзимов к другим белкам, такие абзимы обладают полиреактивностью в комплексообразовании и перекрестной каталитической активностью. Антитела против каждого из индивидуальных гистонов эффективно гидролизуют каждый из этих гистонов и ОБМ и наоборот – антитела против ОБМ расщепляют каждый из гистонов.

С помощью MALDI-спектрометрии были получены данные о специфических сайтах гидролиза пяти гистонов антителами против ОБМ и каждого из гистонов. Было впервые показано, что репертуар и количество сайтов гидролиза каждого из гистонов антителами против гистонов и ОБМ очень сильно зависит от использованного антигена (МОГ или комплекс ДНК-гистоны) и стадии развития ЭАЭ: начало (7-8 дней), острая фаза (18-20 дней) и ремиссия (более 25-30 дней). Иммунизация мышей МОГ и комплексом ДНК с гистонами приводит к появлению в крови антител, гидролизующих гистоны по сайтам, набор и число которых сильно отличается от таковых при спонтанном развитии ЭАЭ.

Исследование было поддержано грантом РФФ 22-15-00103.

Оксидоредуктазные активности иммуноглобулинов класса G

Толмачева А.С.¹, Ермаков Е.А.^{1,2}, Аулова К.С.¹, Тимофеева А.М.¹,
Невинский Г.А.^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

В настоящее время актуальной задачей является исследование поликлональных IgG, обладающих оксидоредуктазными активностями как в норме, так и при различных аутоиммунных, нейроиммунных и вирусных заболеваниях.

Показано, что IgG крови здоровых крыс линии Wistar проявляют супероксиддисмутазную, каталазную, а также пероксидазную и пероксид-независимую оксидоредуктазную активности, окисляя различные соединения как в присутствии пероксида водорода, так и в его отсутствие. При аутоиммунных патологиях наблюдается значительное увеличение оксидоредуктазных активностей. Например, у мышей линии C57BL/6, а также трансгенных мышей линий Th и 2D2, используемых в качестве моделей рассеянного склероза человека, при спонтанном и индуцированном развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита происходит увеличение пероксидазной и каталазной активностей IgG в период начала и острой фазы заболевания.

Установлено, что и антитела человека обладают оксидоредуктазными активностями. IgG здоровых доноров, а также больных СКВ и больных РС могут окислять различные соединения. При окислении таких субстратов, как 3,3'-диаминобензидин, 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислота), гомованилиновая кислота, офенилендиамин, α -нафтол, 3-амино-9-этилкарбазол и 5-аминосалициловая кислота, субстратная специфичность IgG с пероксидазной активностью является более широкой по сравнению с их пероксид-независимой оксидоредуктазной специфичностью. Показано, что при системной красной волчанке и рассеянном склерозе уровень активности антител выше по отношению к большинству исследуемых субстратов. В крови здоровых доноров, больных шизофренией, ВИЧ-инфекцией, пациентов, переболевших COVID-19 и/или вакцинированных Sputnik V, обнаружены IgG с каталазной активностью. Абзимы с каталазной активностью найдены также и при аутоиммунных заболеваниях: системной красной волчанке (СКВ) и рассеянном склерозе (РС). Значения кажущихся k_{cat} (мин^{-1}), характеризующие активность разложения антителами пероксида водорода, убывают в следующем порядке (мин^{-1}): СКВ ($5,99 \pm 1,76 \times 10^3$) > шизофрения ($4,25 \pm 5,76 \times 10^3$) > COVID-19 ($2,4 \pm 1,81 \times 10^3$) > ВИЧ-инфекция ($1,4 \pm 0,92 \times 10^3$) > здоровые доноры ($0,53 \pm 0,36 \times 10^3$).

На основании полученных данных можно предположить, что полный репертуар поликлональных абзимов с различными оксидоредуктазными активностями является дополнительной системой детоксикации активированных кислородных метаболитов, а также различных токсичных, канцерогенных и мутагенных соединений как в норме, так и при патологии.

Исследование поддержано грантом РНФ № 22-15-00103.

Антитела с каталитическими свойствами при шизофрении

Ермаков Е.А.¹, Иванова С.А.², Смирнова Л.П.², Камаева Д.А.², Невинский Г.А.¹,
Бунева В.Н.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

² *НИИ психического здоровья Томского НИМЦ, Томск, Россия*

Шизофрения – это тяжелое психическое расстройство, патогенетические механизмы которого еще плохо изучены. Все большее число исследований указывает на связь дисрегуляции иммунной системы с патогенезом заболевания. Иммунные нарушения могут быть связаны с образованием аутоантител с каталитическими свойствами. В данной работе суммированы результаты исследований антител, проявляющих гидролитические активности, при шизофрении.

Первым примером каталитических антител при шизофрении стали ДНК-гидролизующие IgG. Показано, что 80% IgG пациентов обладали ДНКазной активностью, причем активность была выше у больных с продуктивной симптоматикой. Кроме того, выявлено, что IgG пациентов гидролизуют РНК, в том числе нейроспецифические микроРНК. РНКазной активностью обладали 100% препаратов IgG. Анализ продуктов гидролиза показал, что антитела действуют как экзонуклеазы, так и эндонуклеазы. Уровни ДНК- и РНК-гидролизующих активностей IgG пациентов оказались в 4–8 раз выше ($p < 0,01$), чем IgG здоровых доноров. Обнаружена корреляция уровня микроРНК-гидролизующей активности с длительностью заболевания, а также с баллами по шкале PANSS.

Помимо гидролиза нуклеиновых кислот, показано, что препараты IgG больных шизофренией эффективно гидролизуют гистоны (H1, H2a, H2b, H3 и H4) и основной белок миелина (ОБМ). Уровень протеолитической активности IgG пациентов в гидролизе гистонов оказался в 6–20,1 раз выше (в зависимости от гистона, $p < 0,05$), а ОБМ – в 10 раз выше ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой. При этом антитела не гидролизуют другие протестированные белки. Интересно, что антитела пациентов с негативной симптоматикой гидролизуют ОБМ эффективнее, чем IgG пациентов с продуктивной симптоматикой.

Таким образом, показано, что препараты IgG больных шизофренией эффективно гидролизуют как нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), так и белки (гистоны и ОБМ). ДНК, РНК и гистоны выделяются из гибнущих клеток и относятся к аларминам – молекулам, сигнализирующим об опасности и запускающим воспалительные процессы. Можно предположить, что образование антител с гидролитическими активностями может быть следствием увеличения концентрации аларминов в кровотоке. Каталитические антитела при шизофрении с одной стороны могут играть защитную роль, поскольку гидролиз и удаление аларминов из кровотока снижает активацию иммунного ответа. С другой стороны, антитела могут гидролизовать нейроспецифические белки (ОБМ), тем самым участвуя в прогрессировании заболевания. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить механизмы образования и эффекты каталитических антител *in vivo* при шизофрении.

Полиреактивность природных антител к вирусу SARS-CoV-2: гидролиз вирусных белков и олигопептидов, являющихся эпитопами S-белка

Тимофеева А.М., Седых С.Е., Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Антитела при ряде заболеваний способны не только связывать субстраты, но и гидролизовать их. Каталитически активные антитела (абзимы) могут гидролизовать функционально важные белки и влиять на патогенез заболеваний. Представлялось интересным изучить, обладают ли антитела, образующиеся после перенесенного COVID-19 и/или вакцинации индивидов (Sputnik V), протеолитической активностью по отношению к вирусным белкам и олигопептидам, являющихся эпитопами S-белка.

Впервые показано, что IgG обладающие сродством к S- и N-белкам вируса SARS-CoV-2 способны гидролизовать только эти, но не другие белки. При этом, антитела доноров, не болевших и не вакцинированных лиц не активны в гидролизе исследованных белков.

При аутоиммунных патологиях и ВИЧ-инфекции образуется множество различных антител, узнающих аутоантигены человека. Нельзя исключать, что среди этих аутоантигенов есть белки, гомологичные белкам вируса SARS-CoV-2. В данной работе показано, что антитела пациентов с некоторыми аутоиммунными заболеваниями и ВИЧ-инфекции активны в гидролизе RBD и N-белка. Обнаруженный феномен является доказательством явления молекулярной мимикрии между белками вируса SARS-CoV-2 и белков человека, предсказанной методами биоинформационного анализа.

В данной работе протестирована способность антител, переболевших COVID-19 и доноров, вакцинированных Sputnik V, гидролизовать девять олигопептидов, являющихся эпитопами S-белка. Показано, что фракции антител, обладающих сродством к S-белку вируса SARS-CoV-2, способны гидролизовать шесть из девяти протестированных олигопептидов, причем наибольшей активностью обладают антитела переболевших COVID-19.

Тот факт, что антитела, образующиеся у переболевших и/или вакцинированных пациентов, не способны гидролизовать три из девяти олигопептидов можно объяснить тем, что не все использованные в работе олигопептиды имеют сайты, по которым абзимы могли бы их гидролизовать. Сайты гидролиза олигопептидов антителами проанализированы с помощью метода MALDI-TOF спектрометрии. Выявлены сайты гидролиза, характерные только антителам, а не известным каноническим протеазам. Для антитело-зависимого гидролиза характерен гидролиз пептидных связей, образованных треонином, глицином и пролином.

Таким образом, впервые показано, что вирус COVID-19 стимулирует образование антител, способных гидролизовать белки этого вируса. Кроме того, представлен еще один экспериментальный подход, доказывающий принадлежность каталитической активности антителам, а не потенциальным совыделяющимся примесям классических ферментов.

Исследование поддержано грантом РФФ № 21-75-10105 (рук. Тимофеева А.М.)

Регуляция процесса эксцизионной репарации оснований ДНК в составе нуклеосомы с помощью PARP 1 и PARP2

Белоусова Е.А., Кутузов М.М., Кургина Т.А., Украинцев А.А., Васильева И.А., Ходырева С.Н., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Сохранение целостности генома зависит как от типа репарационного процесса, так и от его регуляции. Большое количество повреждений ДНК эукариотической клетки репарируется с привлечением процесса эксцизионной репарации оснований (BER), важным регуляторным элементом которого является АДФ-рибозилирование. В данном случае перенос молекул АДФ-рибозы на молекулу мишени осуществляется белками семейства поли(АДФ-рибоза)полимераз (PARP) PARP1 и PARP2. Несмотря на многочисленные исследования в этой области, вопросы, касающиеся деталей механизма регуляции BER с помощью (АДФ-рибозил)ирования, а также распределение ролей между PARP1 и PARP2 в процессе BER, остаются актуальными.

Следует отметить, что геномная ДНК эукариот упакована в хроматин, минимальной структурной единицей которого является нуклеосома – нуклеопротеидный комплекс, состоящий из восьми коровых гистонов и ДНК. Степень компактизации нуклеосомной частицы варьирует в зависимости от потребностей клетки в доступе к текущему контексту ДНК и оказывает значительное влияние на доступность для различных белков, в том числе белков репарации, к конкретному участку генома.

В нашей работе мы исследовали влияние PARP1, PARP2 и катализируемого ими процесса поли(АДФ-рибозил)ирования на активность основных ферментов BER, таких как APE1, ДНК-полимераза β (Pol β) и ДНК-лигаза III α (Lig III α), при репарации ДНК в составе нуклеосомы. В ходе работы были реконструированы модельные нуклеосомы (NCP), содержащие специфичное для процесса BER повреждение в заданном положении ДНК.

Полученные в ходе работы результаты свидетельствуют о том, что присутствие PARP1 в большинстве случаев приводит к подавлению активности ферментов APE1 и Pol β , однако в меньшей степени влияет на активность фермента финальной стадии процесса - Lig III α . Синтез АДФ-рибозы, катализируемый PARP1, в той или иной степени нивелирует действие PARP1 в зависимости от типа ферментативной реакции. Присутствие самой PARP2 оказывало существенное влияние преимущественно на последнюю стадию BER – лигирование разрыва ДНК, в то время как реакция синтеза АДФ-рибозы в данном случае приводила к подавлению активности Pol β и значительной стимуляции активности Lig III α NAD⁺-зависимым образом. На основе полученных и литературных данных мы предполагаем, что вклад в регуляцию BER посредством поли(АДФ-рибозил)ирования на начальных стадиях преимущественно определяется PARP1, а на заключительных стадиях - увеличивается вклад PARP2 в этот процесс.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 22-74-10059.

Получение рекомбинантного аналога белка Sam68 и исследование его роли в регуляции репарации ДНК

Бережнев Е.А., Науменко К.Н., Лаврик О.И.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

ДНК организма человека постоянно находится под воздействием повреждающих экзогенных и эндогенных агентов. Сохранение целостности генетической информации обеспечивается системами репарации ДНК. Ключевым регулятором процессов репарации в настоящее время рассматривается поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1). Активируясь на повреждениях ДНК, PARP1 катализирует синтез полимера АДФ-рибозы, который может присоединяться как к самой полимеразе, так и к другим белкам-акцепторам, что способствует регуляции процесса репарации. Регуляторная функция, выполняемая PAR, в ответе клетки на повреждение ДНК, очень многогранна, поэтому идентификация и изучение белков, влияющих на активность PARP1 и синтез PAR в ответ на генотоксический стресс является важной задачей. С использованием методов масс-спектрометрического анализа для идентификации белков, ассоциированных с поли(АДФ-рибозой), было обнаружено, что многие РНК-связывающие белки могут быть поли(АДФ-рибозил)ированы или взаимодействовать с поли(АДФ-рибозой) в условиях генотоксического стресса. Одним из потенциальных кандидатов на роль белка, локализующегося в месте повреждения ДНК PAR-зависимым путем или белка-регулятора активности PARP1 в условиях генотоксического стресса является Sam68. Установлено, что Sam68 является важным белком для регуляции реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Sam68 стимулирует аутомодификацию PARP1, выступает мишенью для поли(АДФ-рибозил)ирования, увеличивает начальную скорость реакции. В этой работе в качестве модельной системы были использованы культуры клеток и детальный механизм влияния Sam68 установлен не был.

В лаборатории биоорганической химии ферментов ведется активный поиск новых мишеней поли(АДФ-рибозил)ирования, катализируемого белками семейства PARP, среди ферментов, участвующих в различных путях репарации ДНК и ее репликации. Кроме того проводится оценка влияния поли(АДФ-рибозил)ирования на функции модифицированных белков. Предполагается, что механизм влияния Sam68 на активность PARP1 может реализовываться и в случае других РНК-связывающих белков.

Для выполнения работы кодирующая последовательность гена белка Sam68 клонирована в экспрессионные векторы для наработки рекомбинантного белка в прокариотической системе экспрессии. С использованием полученных векторов был проведен подбор условий для наработки Sam68 в клетках E.coli Rosetta(DE3)pLysS. Была проведена очистка целевого белка методом колоночной хроматографии с последующей верификацией масс-спектрометрией. С использованием полученного белка планируется исследовать влияние Sam68 на каталитическую активность фермента PARP1, ключевого регулятора репарации одноцепочечных разрывов ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 22-74-10059).

Кинетические особенности влияния природных однонуклеотидных мутаций на эффективность удаления повреждений ДНК-полимеразой β человека

Кладова О.А., Тюгашев Т.Е., Микушина Е.С., Кузнецов Н.А., Кузнецова А.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Для поддержания целостности генома существует набор ферментативных систем, одной из которых является эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER), включающая последовательное действие различных ферментов. Одним из ферментов BER является ДНК-полимераза β (Pol β), функция которой заключается в заполнении брешей в ДНК комплементарными dNMP, а также удаление 2'-дезоксирибозофосфатного остатка на 5'-конце разрыва. Однонуклеотидные полиморфизмы широко распространены в генах, кодирующих ферменты репарации ДНК. Для Pol β известно множество природных полиморфных вариантов, обладающих сниженной активностью, по сравнению с ферментом дикого типа. Более того, было показано, что до 30% проанализированных опухолей человека экспрессируют мутантные варианты Pol β . Используя программное обеспечение в режиме онлайн в работе, был проведен анализ известных полиморфизмов Pol β , для части из них было проверено влияние на основные этапы ферментативного процесса.

Исследованные полиморфные варианты Pol β приводили к снижению заполнения брешей в ДНК за счет влияния на разные стадии функционирования фермента. Показано, что некоторые полиморфные варианты обладали сниженной аффинностью к ДНК и dNTP, а также более низкой способностью катализировать ферментативную реакцию. При этом, эффект оказывали и такие замены аминокислотных остатков, которые располагались в отдалении от активного центра фермента и не образовывали связей с субстратами. Полученные данные подтверждают связь природных полиморфизмов данных ферментов с общим понижением репарационной активности организма. Таким образом, можно заключить, что данные SNP могут выступать в качестве маркера повышенного риска развития заболеваний, ассоциированных с накоплением мутаций в ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект 21-74-10103.

Исследование противоопухолевых и гемопротекторных свойств ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 в монорегиме и в комбинации с топотеканом (ингибитором топоизомеразы 1) на модели опухолей *in vivo*

Корниенко Т.Е.¹, Захаренко А.Л.¹, Николин В.П.², Попова Н.А.², Филимонов А.С.³, Лузина О.А.³, Салахутдинов Н.Ф.³, Лаврик О.И.¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

³ *Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск*

Поиск и разработка ингибиторов путей репарации ДНК является одним из основных приоритетов медицинской химии, так как препараты-ингибиторы репарации ДНК могут обеспечить более эффективное лечение онкологических заболеваний по сравнению с традиционной терапией. Топотекан – эффективный клинически одобренный ингибитор топоизомеразы 1 (Top1). Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) – фермент репарации, удаляющий аддукты с 3'-конца ДНК, образующихся в числе прочего под действием противоопухолевых препаратов, таких как топотекан. Tdp1 препятствует действию ингибиторов Top1, снижая их терапевтическую эффективность, поэтому подавление активности Tdp1 может усилить эффект топотекана. Ранее мы установили, что производное усниновой кислоты AF-185 является эффективным ингибитором Tdp1. Мы изучили действие как топотекана, так и его комбинации с AF-185 на асцитную опухоль мышей Кребс-2 и карициному легкого Льюис.

В данной работе нами было показано, что в отношении моделей опухолей Кребс-2 и Льюис комбинированное введение топотекана и ингибитора Tdp1 AF-185 внутрибрюшинно оказалось более эффективным по сравнению с комбинацией топотекана и AF-185 внутривентрикулярно и индивидуальным введением препаратов. Также данная комбинация являлась нетоксичной и приводила к нормализации гемопоеза.

Таким образом, производное усниновой кислоты AF-185 может являться перспективным дополнением к основной терапии противоопухолевыми препаратами, т.к. нетоксично, обладает выраженной противоопухолевой, антиметастатической и гемопротекторной активностью.

Исследование поддержано грантом РФФ № 21-14-00105

Физико-химические и субстратные свойства фосфорамидных азольных олигодезоксирибонуклеотидов

Барановская Е.Е., Васильева С.В., Чубаров А.С., Оскорбин И.П., Пышный Д.В.,
Ломзов А.А.

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Разработка новых производных нуклеиновых кислот, обладающих улучшенными функциональными свойствами, является актуальной задачей. Нами разработаны фосфорамидные азольные олигонуклеотиды несущих на атоме фосфора остаток бензимидазольную, бензотиазольную, бензоксазольную или 1,3-диметил-бензимидазольную группу. Изучены их базовые физико-химические свойства. Показано, что зарядовое состояние модификации зависит от рН раствора и типа модификации. При рН 4.5 азольные группы становятся протонированными, а при повышении рН депротонируются с различной эффективностью. Исследование гибридационных свойств показало, что такие модификации в составе олигодезоксирибонуклеотидов снижают термостабильность дуплексов с ДНК и РНК в различной степени, зависящей от нуклеотидного контекста и числа модифицированных остатков.

Модифицированные азольные олигонуклеотиды могут выступать праймерами в ПЦР. Установлены основные положения в составе олигонуклеотидов, введение в которые выбранных модификаций снижает, но полностью не блокирует удлинение модифицированного праймера с помощью *Taq* ДНК полимеразы. Более того, наличие модификаций в матричной цепи не значительно влияет на эффективность удлинения праймера. В качестве демонстрации применения таких праймеров показана более высокая специфичность выявления мутаций с помощью аллель-специфической ПЦР в при этом сохраняется высокая ее эффективность. Использование фосфорамидных бензольных олигонуклеотидов в качестве праймеров оказываются более предпочтительными для выявления точечных мутаций методом аллель-специфической ПЦР, чем фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов.

Таким образом, созданные нами фосфорамидные азольные олигонуклеотиды являются перспективными аналогами нуклеиновых кислот для применения в области физико-химической энзимологии и для решения задач биомедицины.

1. Vasilyeva S. V. et al. Synthesis of Oligonucleotides Carrying Inter-nucleotide N-(Benzoazole)-phosphoramidate Moieties //ACS omega. – 2022. – Т. 8. – №. 1. – С. 1556-1566.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 23-14-00358.

Получение терапевтических конъюгатов антител с помощью различных природных ферментов

Сапожникова К.А.¹, Гуляк Е.Л.¹, Гольденберг Е.А.^{1,2}, Смолина А.А.², Коршун В.А.¹

¹ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Московский государственный университет им М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Конъюгат антитело-препарат (antibody-drug conjugate, ADC) представляет собой моноклональное антитело, ковалентно связанное с низкомолекулярным терапевтическим (практически всегда противоопухолевым) агентом с помощью линкера. Принцип действия конъюгатов состоит в следующем: после избирательного связывания антительной части конструкции с некоторым антигеном на поверхности опухолевой клетки происходит распад конъюгата (в лизосомах после интернализации либо во внеклеточном матриксе) с высвобождением цитотоксического препарата, приводящим к гибели клетки.

Современными тенденциями в конструировании конъюгатов антитело-препарат являются сайт-специфичность конъюгации антитела и линкер-препарата, гомогенность конъюгата, а также высокая токсичность терапевтического агента. При этом классические подходы к модификации антител, используемые для синтеза всех одобренных к настоящему моменту ADC, а именно модификация по лизинам и цистеинам, не приводят к сайт-специфическим конъюгатам. В нашей работе для сайт-специфической конъюгации мы используем двухэтапный ферментативный подход, заключающийся в удалении гликанов Fc фрагмента антител и последующем лигировании молекулы целевой нагрузки с помощью природных ферментов (Рис.1) [1,2].

В качестве цитотоксической нагрузки мы используем монометилауристин Е (ММАЕ), сконъюгированный с антителом при помощи линкеров на основе цианиновых красителей и расщепляемых олигопептидных фрагментов. Синтез конъюгатов ведется на основе терапевтического антитела трастузумаба к опухолевому антигену HER2.

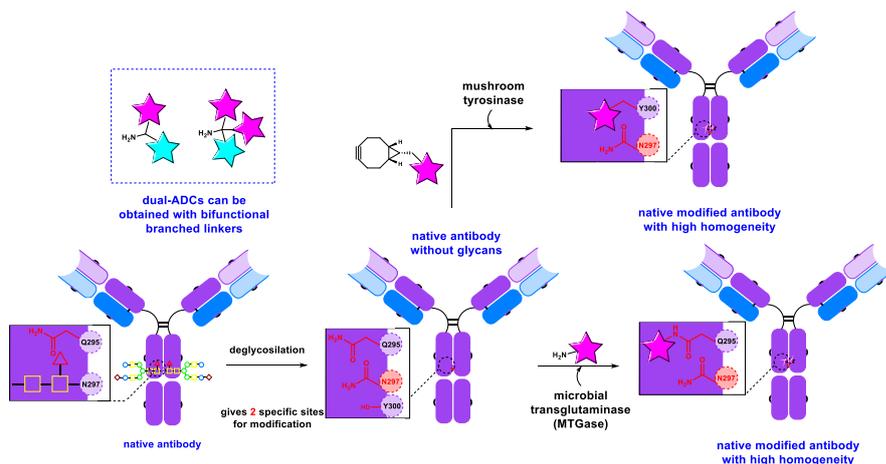


Рис.1. Ферментативные подходы к мечению антител

1. Bruins J.J. et al. Non-genetic generation of antibody conjugates based on chemoenzymatic tyrosine click chemistry // *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 2167–2172, <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00351>

2. Anami Y. et al. Homogeneity of antibody-drug conjugates critically impacts the therapeutic efficacy in brain tumors // *Cell Rep.* **2022**, *39*, 110839, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110839>

Изучение роли С-концевого фрагмента 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы 1 человека (OGG1) в связывании и расщеплении специфических субстратов

Яковлев А.О.^{1,2}, Жарков Д.О.^{1,2}

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия

Активные формы кислорода (АФК) представляют большую опасность для молекул ДНК. АФК образуются под действием различных факторов: в процессе аэробного дыхания, в результате влияния ионизирующего излучения и индуцированных переходов кислорода из триплетного состояния в синглетное. Следствием воздействия АФК на ДНК могут быть повреждения разного типа, к которым относятся, в частности, окисленные азотистые основания. Наиболее распространённое повреждение данного типа — 8-оксогуанин (8-охоGua) [1].

Репарация окисленных азотистых оснований осуществляется по пути эксцизионной репарации оснований (ЭРО). Процесс ЭРО начинается с катализируемого ДНК-*N*-гликозилазами гидролиза *N*-гликозидной связи между поврежденным азотистым основанием и сахарофосфатным остовом. Выщепление окисленных оснований пуринового ряда, в особенности 8-охоGua, в эукариотических клетках осуществляет 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1 (OGG1) [2].

С помощью рентгеноструктурного анализа была определена структура каталитического фрагмента белка OGG1 человека, который не содержит С-концевого участка (а. к. о. 324–345). Как следствие, его роль в связывании и расщеплении субстратов не была установлена.

Цель работы заключается в изучении роли С-концевого фрагмента OGG1 в связывании и расщеплении ДНК-субстратов. Были выделены варианты полноразмерного OGG1 и его делеционного мутанта (OGG1 Δ 20) с инактивирующей мутацией K249Q. Было показано, что С-концевой фрагмент оказывает стабилизирующее действие на комплекс OGG1 и специфического субстрата, содержащего 8-охоGua, а также комплекса OGG1 с ДНК-продуктом реакции. Также была охарактеризована зависимость активности белков OGG1 и OGG1 Δ 20 от ионной силы, pH и наличия ионов Mg²⁺.

1. von Sonntag C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective. Berlin -Heidelberg: Springer, 2006. – 523 pp.
2. Zharkov D. O. Base excision DNA repair // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – V. 65. – No. 10. – P. 1544–1565.