

ШИЛКИН ЕВГЕНИЙ СЕРГЕЕВИЧ

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ НА АКТИВНОСТЬ
ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ЙОТА ЧЕЛОВЕКА

Специальность 1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в лаборатории механизмов репликации повреждённой ДНК Федерального государственного бюджетного учреждения Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Макарова Алена Владимировна
заведующая лабораторией механизмов репликации повреждённой ДНК
Федерального государственного бюджетного учреждения
Института молекулярной генетики
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Ходырева Светлана Николаевна
в. н. с. лаборатории биоорганической химии ферментов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук

PhD (Molecular pathology)
Мифтахова Регина Рифкатовна
с. н. с. научно-исследовательской лаборатории
«OpenLab геновые и клеточные технологии»
научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины
Института фундаментальной медицины и биологии
Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Ведущая организация:

Федеральное государственное
автономное образовательное учреждение высшего образования
«Московский физико-технический институт (национальный исследовательский
университет)»

Защита диссертации состоится «13» октября 2022 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного Совета 24.1.081.01 (Д 002.235.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32 и на сайте ИМБ РАН <http://eimb.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук



Анашкина А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Воздействие эндогенных (продукты клеточного метаболизма) и экзогенных (ультрафиолетовое (УФ)- и ионизирующее излучение, препараты химиотерапии) факторов приводит к повреждениям ДНК. Восстановление структуры ДНК осуществляется несколькими системами репарации, но не все повреждения эффективно и своевременно репарируются. Накопление повреждений в ДНК может приводить к остановке репликативной вилки и аресту клеточного цикла, поскольку многие модификации оснований ДНК препятствуют образованию канонических уотсон-криковских пар и ингибируют репликативные ДНК-полимеразы (ДНКП).

Одним из механизмов толерантности к повреждениям ДНК является транслезионный синтез (от англ. «translesion» – «через повреждение») (ТЛС) – это процесс синтеза ДНК на матрице, содержащей модифицированный нуклеотид. Ключевыми ДНКП, осуществляющими ТЛС у человека, являются ДНКП γ -семейства: Pol η , Pol ι , Pol κ и REV1 и ДНКП β -семейства Pol ζ . Особенности строения активного центра позволяют ДНКП γ -семейства эффективно «проходить» широкий спектр повреждений ДНК. Предполагается, что каждая из ДНКП γ -семейства специализируется на определенной группе повреждений, используя уникальные стратегии для их «прохождения». Снижение активности транслезионных ДНКП повышает чувствительность клеток к ДНК-повреждающим агентам.

Толерантные к структуре ДНК-матрицы транслезионные ДНКП γ -семейства обладают сравнительно низкой точностью синтеза на неповрежденной ДНК. Частота ошибок репликативных полимераз Pol δ и Pol ϵ составляет 10^{-6} - 10^{-7} , в то время как транслезионных – 10^{-1} - 10^{-4} в зависимости от сиквенс-контекста. Повышение активности неточных ДНКП опасно для клетки появлением мутаций ДНК. Накопление мутаций в генах-онкосупрессорах и онкогенах может стимулировать события канцерогенеза. Таким образом, каждая клетка нуждается в системе жесткого контроля активности транслезионных ДНКП.

Наиболее неординарным представителем γ -семейства ДНКП человека является Pol ι (кодируется геном *RAD30B* или *POLI*), открытая в 1999 г. как гомолог дрожжевого гена *RAD30* (Tissier *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Описано две изоформы Pol ι : «короткая» и «длинная», которая отличается наличием дополнительного фрагмента длиной 25 остатков на N-конце фермента. Однако только «короткая» форма без 25 остатков обнаружена *in vivo* (Frank *et al.*, 2017). Pol ι является ДНКП с очень низкой точностью синтеза на неповрежденной ДНК и эффективно включает нуклеотиды с разной точностью напротив целого ряда повреждений, вызванных эндогенными и экзогенными факторами: АП-сайтов, урацила и его производных, 7,8-дигидро-8-оксогуанина (8-охо-G), N³-метиладенина (N³-me-A), O⁶-метилгуанина (O⁶-me-G), крупных аддуктов пуриновых оснований, блокирующих образование уотсон-криковских взаимодействий (например, 1,N⁶-этенoadенин и N²-аддукты гуанина) (Makarova

and Kulbachinskiy, 2012; McIntyre, 2020). Включение нуклеотидов напротив повреждений, нарушающих образование уотсон–криковских взаимодействий, возможно благодаря использованию Pol1 хугстиновских взаимодействий (Johnson, Prakash and Prakash, 2005; Makarova *et al.*, 2014). Pol1 обладает также 5'-дезоксирибозофосфатлиазной (5'-дРФ лиазной) активностью и, предположительно, участвует в эксцизионной репарации оснований повреждений, индуцированных активными радикалами кислорода (Prasad *et al.*, 2003; Vebenek *et al.*, 2001; Petta *et al.*, 2008).

Под повреждениями ДНК обычно подразумеваются такие модификации оснований или сахара-фосфатного остова, которые в норме в ДНК не встречаются. Однако известен ряд модификаций, которые целенаправленно вносятся клеткой. Среди таких модификаций особую роль играет метилирование основания цитозина по 5 положению с образованием 5-метилцитозина (mC) в CpG-сайтах, а также продукт его окисления – 5-гидроксиметилцитозин (hmC). Метилирование цитозина играет важную роль в эпигенетической регуляции экспрессии генетической информации, однако несет дополнительные риски для клетки, поскольку метилированные CpG-сайты являются «горячими точками» мутагенеза (Pfeifer, 2006). Основной мутацией в CpG-сайтах являются C>T транзиции (Tomkova and Schuster-Böckler, 2018), которые образуются в результате дезаминирования mC с образованием тимина. В последние годы накапливаются данные о том, что помимо дезаминирования mC>T, в мутагенезе в CpG-сайтах задействованы и другие механизмы, связанные с ошибками при копировании ДНК (Rogozin *et al.*, 2018; Tomkova *et al.*, 2018). Кроме того, показано, что метилирование цитозина приводит к повышению частоты окисления соседнего G с образованием 8-охо-G, что также увеличивает мутагенный потенциал CpG-сайтов (Kawai *et al.*, 2002). Предполагается, что mC не оказывает влияния на репликацию и считывается большинством ДНКП как немодифицированный C, однако исследований точности транслезионных ДНКП напротив mC не проводилось. Потенциально, высокоошибочные ДНКП могут вовлекаться в мутагенез CpG-сайтов при ТЛС напротив 8-охо-G и других повреждений.

Необычная особенность Pol1 – преимущественное включение dGTP напротив тимина, урацила и его производных (Tissier *et al.*, 2000; Vaisman and Woodgate, 2001; Makarova *et al.*, 2011). Это свойство может играть роль в снижении мутагенного потенциала дезаминированных остатков цитозина, его окисленных производных и mC при AID/APOBEC-индуцированном мутагенезе и спонтанном дезаминировании mC CpG-островков (Vaisman and Woodgate, 2001). Одновременно дезаминированные и окисленные остатки цитозина составляют большую часть пиримидиновых повреждений в геномной ДНК, поэтому можно ожидать, что включение dGTP напротив неканонических пиримидинов в ходе ТЛС синтеза будет преимущественно антимуtagenным.

Накопленные на сегодняшний день данные по биохимическим свойствам, регуляции активности и участию Pol1 в различных клеточных процессах не оставляют сомнений в важности этой полимеразы в клетке. Однако, в отличие от

других ДНКП Y-семейства, крайне мало работ посвящено взаимосвязи PolI и канцерогенеза, а имеющиеся данные противоречивы. Действительно, в клетках многих опухолей (таких как глиомы, карциномы пищевода, опухоли кожи, груди, и мочевого пузыря) наблюдается сверхэкспрессия мРНК гена *POLI*, что свидетельствует о вкладе мутагенной активности PolI в предрасположенность к онкологическим заболеваниям (Yang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007, 2010; Zhou *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2016). У пациентов с карциномой пищевода повышенная экспрессия *POLI* ассоциирована с высоким риском метастазирования и негативным прогнозом (Zou *et al.*, 2016; He *et al.*, 2017). В то же время, дефицит PolI у мышей приводит к повышению частоты уретан-индуцированных опухолей легких (Lee and Matsushita, 2005; Iguchi *et al.*, 2014) и УФ-индуцированных опухолей кожи (Dumstorf *et al.*, 2006; Ohkumo *et al.*, 2006).

Однонуклеотидные полиморфизмы и мутации в гене *POLI*, приводящие к несинонимичным аминокислотным заменам, потенциально могут влиять на функционирование фермента. В литературе описаны некоторые полиморфизмы *POLI*. Замена T706A (rs8305) в С-концевом участке белка связана с предрасположенностью к аденокарциномам и сквамозным карциномам лёгких (Sakiyama *et al.*, 2005). Повышенный риск аденомы простаты ассоциирован с С-концевой заменой F507S (rs3218786) (Luedeke *et al.*, 2009). В каталитическом коре белка, в непосредственной близости от каталитических остатков, располагается ряд редких вариантов и полиморфизмов: R71G (rs3218778), P118L (rs554252419), I236M (rs3218784), E251K (rs3218783) и P365R (rs200852409). Предсказано влияние таких аминокислотных замен на активность PolI *in silico* (Ng and Henikoff, 2001; Ramensky, Bork and Sunyaev, 2002; Adzhubei *et al.*, 2010). Моделирование молекулярной динамики фермента предсказывает изменения в поведении каталитического кора при замене I236M (Silvestrov *et al.*, 2018). Однако в настоящее время мало данных об их влиянии на биохимическую активность *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, нет исследований о клинической значимости данных мутаций в известных базах данных, например OMIM, LOVD, dbSNP, ClinVar и HGMD Professional.

В недавних работах с использованием рекомбинантного каталитического кора PolI с делецией С-концевой области, но имеющего на N-конце дополнительные 25 а.о., были частично биохимически охарактеризованы варианты с заменами R71G, I236M и E251K (Kim *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2016). Показано, что форма R71G PolI обладает сниженной ДНК-полимеразной активностью *in vitro* и демонстрирует изменения в спектре включаемых нуклеотидов напротив некоторых повреждений ДНК: 8-охо-G, O⁶-me-G, N²-et-G и АП-сайтов. Однако, влияние аминокислотных замен на свойства полноразмерного фермента и изоформы без дополнительных N-концевых остатков, не изучалось. Исследования полимеразной активности форм PolI напротив других распространенных природных повреждений ДНК и их влияние на 5'-дРФ-лиазную активность в настоящее время не проводились. Влияние замен P118L и P365R на активность PolI человека также не изучено.

Цель и задачи работы

Цель настоящей работы заключается в анализе влияния аминокислотных полиморфизмов и редких миссенс-вариантов на ДНК-полимеразную и 5'-дезоксирибофосфатлиазную активности Pol α человека. В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1 Оценить точность и эффективность синтеза ДНК Pol α дикого типа и полиморфных и редких вариантов фермента на неповрежденных ДНК-субстратах разного сиквенс-контекста, ДНК-субстратах, содержащих распространенные повреждения ДНК, mC и hmC.

2 Оценить влияние полиморфизмов и редких вариантов Pol α на 5'-дРФ-лиазную активность фермента.

3 Оценить влияние полиморфизмов и редких вариантов Pol α на выживаемость клеток человека линии A549 при обработке ДНК-повреждающими агентами.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В работе впервые охарактеризованы ДНК-полимеразная и 5'-дРФ-лиазная активности форм Pol α человека с заменами R71G, P118L, I236M, E251K, P365R, F507S, T706A с использованием рекомбинантного полноразмерного фермента. Показано, что редкий вариант R71G значительно снижает активность фермента и изменяет его точность как на неповрежденной ДНК, так и при синтезе напротив повреждений. Обнаружено влияние замен E251K и P365R на спектр включаемых нуклеотидов Pol α . Идентифицированы варианты, изменяющие 5'-дРФ-лиазную активность Pol α . В работе также впервые показано, что редкий вариант со сниженной каталитической активностью R71G не способен комплементировать функцию *POL1* в культуре клеток млекопитающих.

Полиморфные и мутантные формы Pol α с изменениями в активности фермента потенциально могут являться маркерами повышенного риска развития онкологических заболеваний. Полученные в работе данные определяют круг наиболее значимых с биохимической точки зрения форм Pol α для дальнейших исследований в области онкологии. Полученные результаты также имеют ценность для понимания структурно-функциональных особенностей строения активного центра Pol α , раскрывая роль отдельных аминокислотных остатков в катализе.

В работе впервые охарактеризована точность и эффективность синтеза ДНК Pol α на ДНК с mC и hmC в сиквенс-контекстах GXG и TXG, встречающихся в ряде опухолей, и изучено влияние статуса метилирования C на транслезионную активность Pol α напротив соседнего 8-охо-G. Эти данные важны для понимания механизмов мутагенеза в CpG-сайтах.

Положения, выносимые на защиту

1. Охарактеризовано влияние редких и полиморфных аллельных вариантов *POL1* на активность транслезионной ДНК-полимеразы человека Pol α . Замены P118L, I236M, F507S и T706A не влияют на активность фермента. Вариант

R71G Pol β обладает сниженными ДНК-полимеразной, транслезионной и 5'-дРФ-лиазной активностями, а также отличается от белка дикого типа по точности синтеза ДНК. Замена R365R приводит к изменению точности фермента напротив матричных пиримидинов, 8-охо-G и АП-сайта, и снижению 5'-дРФ-лиазной активности. Аминокислотная замена E251K повышает 5'-дРФ-лиазную активность фермента.

2. Нокаут гена *POL1* в культуре клеток аденокарциномы легких человека A549 модулирует чувствительность к окислительному стрессу, вызванному перекисью водорода. Вариант R71G не комплементирует недостаток Pol β .
3. Наличие эпигенетических модификаций mC и hmC снижает эффективность включения dCTP и dGTP Pol β , но не повышает частоту включения dATP. Статус метилирования цитозина не влияет на эффективность и точность транслезионного синтеза Pol β напротив соседнего 8-охо-G.

Публикации и апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 5 статей (2 экспериментальные, 3 обзорные), 5 тезисов докладов симпозиумов и конференций.

Основные положения работы были представлены автором в устных и стендовых докладах на III Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2017), симпозиуме «Системная биология процессов репарации ДНК и программируемой гибели клетки» (Новосибирск, Россия, 2018), VIII Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике (Звенигород, Россия, 2018), VII Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, Россия, 2019) и XXXIII Зимней молодёжной научной школе ИБХ (Москва, Россия, 2021).

Личное участие автора в получении научных результатов

Автор самостоятельно планировал и проводил большинство экспериментов, в том числе получение генетических конструкций с мутациями, кодирующими варианты Pol β (R71G, P118L, I236M, E251K, R365R, F507S, T706A), продукцию и очистку рекомбинатных белков, подготовку ДНК-субстратов и тестирование ДНК-полимеразной и 5'-дРФ-лиазной активностей Pol β , получение генетических конструкций для комплементации клеток A549 с нокаутом *POL1*. Автор принимал участие в исследовании чувствительности клеток A549 с нокаутом *POL1* к ДНК-повреждающим агентам, а также в интерпретации результатов экспериментов, анализе данных и написании публикаций.

Структура и объём диссертации

Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложения. Материалы диссертации изложены на 172 страницах машинописного текста, содержат 26 рисунков и 4 таблицы. Список литературы содержит 233 источника.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена с применением классических и современных молекулярно-биологических подходов. Генетические конструкции для экспрессии редких вариантов и полиморфных форм PolI получены методом сайт-направленного мутагенеза. Экспрессию ферментов проводили в клетках *S. cerevisiae*, после чего слитые с GST-тагом белки очищали с помощью аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе.

ДНК-полимеразную и транслезионную активности исследовали на олигонуклеотидных ДНК-субстратах, радиоактивно меченых (^{32}P) по 5'-концу, 5'-дРФ-лиазную активность – радиоактивно (^{32}P) меченых по 3'-концу. Анализ продуктов реакции проводили в денатурирующем ПААГ с последующей визуализацией с помощью цифровой радиоавтографии на Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). О ДНК-полимеразной активности судили по проценту удлиненного праймера, о 5'-дРФ-лиазной активности – по проценту отщепленного дРФ. Расчет кинетических параметров включения индивидуальных dNTP проводили по уравнению Михаэлиса-Ментен $k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} \times [\text{dNTP}] / (K_{\text{M}} + [\text{dNTP}])$, где k_{cat} – константа скорости включения, K_{M} – кажущаяся константа Михаэлиса, и определяли k_{cat} и K_{M} .

Оценку количества жизнеспособных (метаболизующих) клеток проводили с помощью МТТ-теста. Клетки обрабатывали ДНК-повреждающими агентами: цисплатин (меж- и внутрицепочечные сшивки ДНК), блеомицин (индуцирует двухцепочечные разрывы ДНК), метилметансульфонат (ММС – метилирующий агент) и перекись водорода (окисление оснований ДНК).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

PolI человека играет важную роль в защите клеток от повреждений ДНК в ходе ТЛС и, возможно, ЭРО, но демонстрирует низкую точность синтеза ДНК. Нарушения в работе PolI могут приводить к повышенной чувствительности клеток к генотоксическому стрессу и накоплению мутаций, а также повышению частоты событий канцерогенеза. Приводят ли распространённые полиморфизмы и редкие варианты гена *POL1* к изменениям в активности фермента и нарушениям его работы в системах *in vitro*? Ответ на этот вопрос является одной из главных целей данной работы.

1. ДНК-полимеразная активность полиморфных форм и редких вариантов PolI человека на неповрежденной ДНК

На первом этапе работы методом сайт-направленного мутагенеза получали генетические конструкции, несущие мутации для экспрессии полиморфных форм и редких вариантов *POL1* человека, оптимизированные для экспрессии в *S. cerevisiae*. После экспрессии в клетках дрожжей, слитые с GST-тагом ферменты выделяли аффинной хроматографией с сорбентом глутатион-сефароза.

Влияние аминокислотных замен на общую ДНК-полимеразную активность PolI человека оценивали по результатам реакции удлинения

праймера в присутствии четырех dNTP и ионов Mg^{2+} – ключевого кофактора большинства ДНКП. Реакцию останавливали через разные промежутки времени и анализировали продукты в денатурирующем ПААГ (Рис. 1).

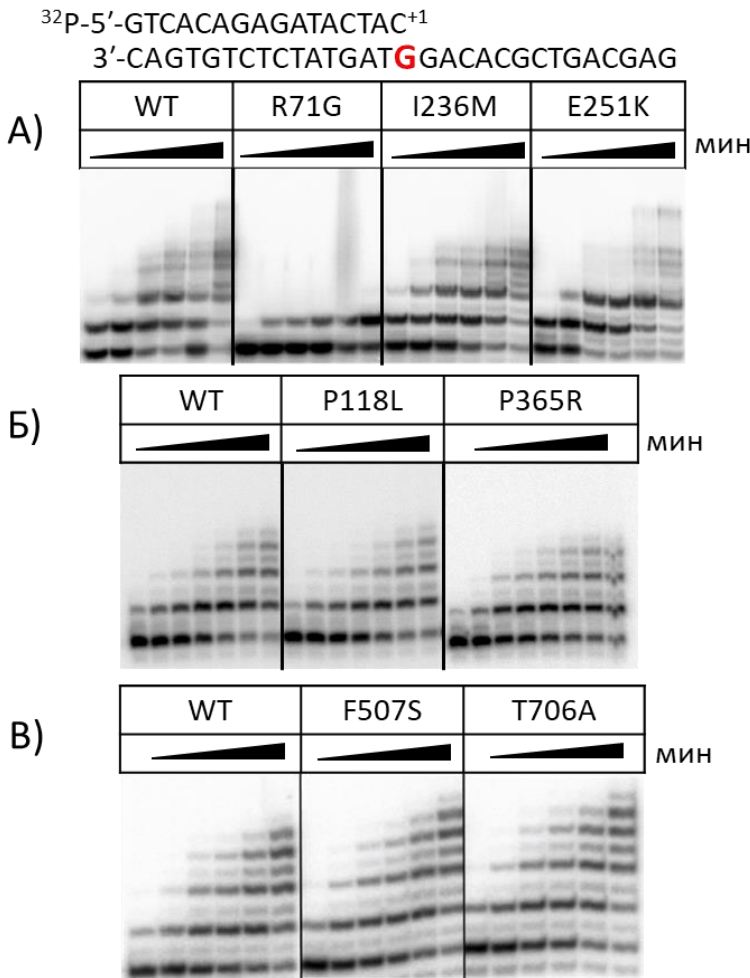


Рис. 1 Электрофореграммы продуктов реакции удлинения праймера различными формами PolI человека. Реакцию проводили в присутствии 1 мМ Mg^{2+} и 50 мкМ dNTP и останавливали через разные промежутки времени: 1 – 30 мин (А), 0,5 – 40 мин (Б), 1 – 40 мин (В). Структура ДНК-субстрата показана в верхней части рисунка.

Варианты PolI с заменами в каталитическом коре I236M, E251K (Рис. 1А), P118L и P365R (Рис. 1Б), а также F507S и T706A в С-концевом домене, ответственным за белок-белковые взаимодействия (Рис. 1В), демонстрировали схожий с белком дикого типа уровень общей ДНК-полимеразной активности. Наиболее значимым для ДНК-полимеразной активности оказался остаток Arg71: его замена на остаток глицина привела к значительному

снижению активности фермента. Кроме того, в отличие от белка дикого типа форма R71G включала только один нуклеотид (Рис. 1А). Эти данные находятся в соответствии с работами (Kim *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2016), в которых тестировали активность каталитического кора PolI с заменой R71G, имеющей дополнительные 25 а.о. на N-конце белка (R96G в нумерации удлиненной формы PolI), и в которых также обнаружили снижение ДНК-полимеразной активности у данного варианта.

Несмотря на незначительное влияние большинства исследованных нами аминокислотных замен PolI человека на общую ДНК-полимеразную активность, такие замены могут изменять точность фермента при синтезе ДНК. Следующий этап работы состоял в исследовании спектра включения индивидуальных нуклеотидов вариантами PolI на неповрежденных ДНК-матрицах. Для этого проводили реакцию удлинения праймера на ДНК-субстратах, содержащих в +1 положении от 3'-конца праймера один из четырех нуклеотидов: А, G, Т или С. Влияние замен R71G и P365R на точность PolI оказалось наиболее значимым (Рис. 2). В частности, замена P365R увеличивала точность напротив матричного С, тогда как фермент с заменой R71G демонстрировал преимущественное

включение dGTP напротив матричных пиримидинов и снижение включения некомплементарных нуклеотидов напротив матричных пуринов. Спектр включения dNTP у вариантов с заменами P118L, F507S, T706A и I236M не отличался от спектра белка дикого типа.

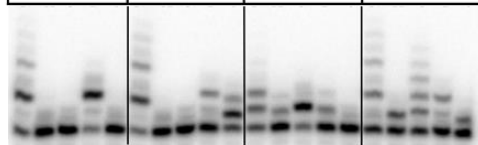
^{32}P -5'-GTCACAGAGATACTAC $^{+1}$

3'-CAGTGTCTCTATGATG**X**ACACGCTGACCAG

X = A/G/T/C

WT

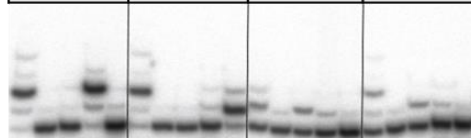
A	G	T	C
NAGTC	NAGTC	NAGTC	NAGTC



■ WT ■ R71G ■ P365R

R71G

A	G	T	C
NAGTC	NAGTC	NAGTC	NAGTC



P365R

A	G	T	C
NAGTC	NAGTC	NAGTC	NAGTC

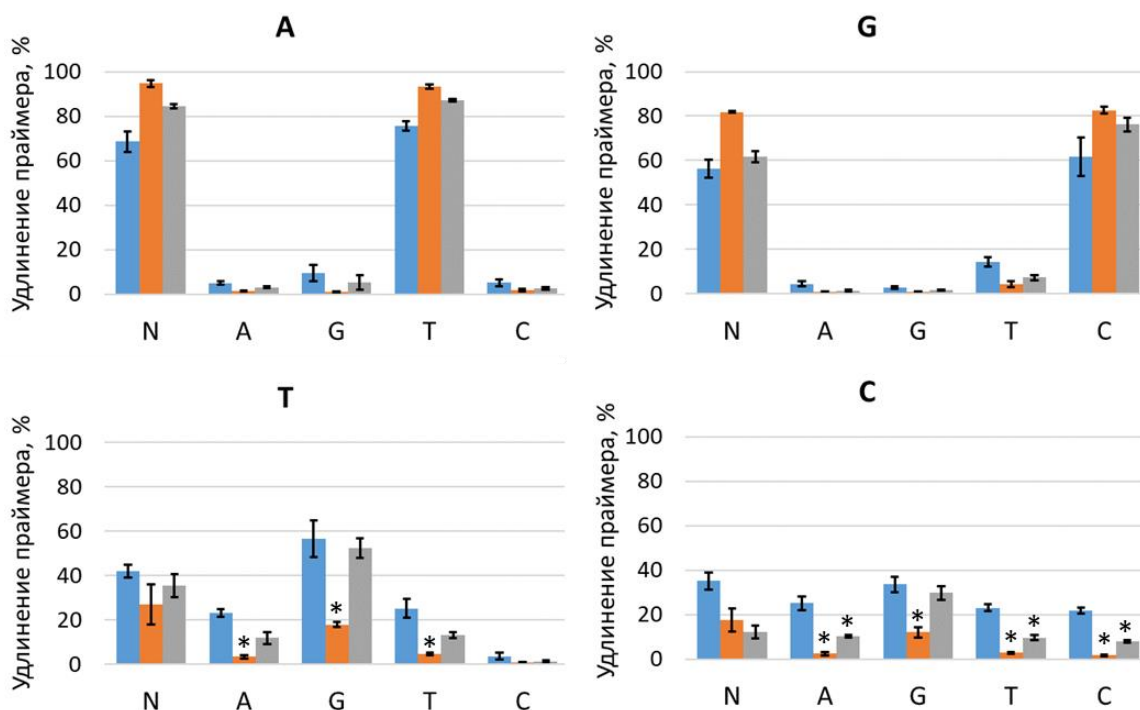
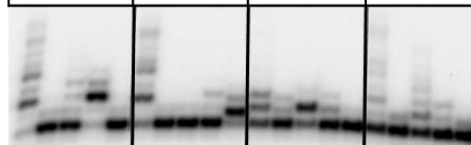


Рис. 2 Включение индивидуальных dNTP R71G и P365R Pol I в реакции удлинения праймера на ДНК-субстратах без повреждений. Последовательность матриц показана в верхней части рисунка. Вверху – электрофореграммы результатов реакции удлинения праймера (10 нМ и 10 мин дикий тип (WT) и P365R Pol I, 100 нМ и 30 мин R71G Pol I), внизу – диаграммы, представляющие процент удлиненного праймера. Звёздочками указаны статистически значимые отличия ($p < 0.05$).

Для более точной количественной оценки точности включения dNTP редким вариантом Pol I с заменой R71G были рассчитаны кинетические

параметры реакции. Для этого реакцию удлинения праймера проводили при разных концентрациях нуклеотида и по полученной зависимости $k_{obs}([dNTP])$, где k_{obs} – число оборотов фермента (мин^{-1}), $[dNTP]$ – концентрация нуклеотида (μM), определяли кажущуюся константу Михаэлиса K_M и константу скорости включения k_{cat} . Были измерены K_M и k_{cat} для фермента дикого типа и формы R71G при включении нуклеотидных субстратов, для которых наблюдали наибольший эффект в реакциях удлинения праймера. Эффективность включения рассчитывали как k_{cat}/K_M , а точность (F_{inc}) – как отношение эффективностей включения (k_{cat}/K_M) некомплементарного нуклеотида к комплементарному

$$F_{inc} = \frac{k_{cat}/K_M(\text{некомпл.})}{k_{cat}/K_M(\text{компл.})}. \text{ Результаты представлены в Таблица 1.}$$

Таблица 1 Кинетические параметры (K_M и k_{cat}) включения dNTP PolI дикого типа и вариантом R71G напротив матричных G, T и C в условиях стационарной кинетики.

Матр. Нукл.	Форма PolI	dNTP	k_{cat} , мин^{-1}	K_M , μM	k_{cat}/K_M , $\text{мин}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$	F_{inc}	k_{cat}/K_M (относит. WT)
G	WT*	dTTP	$0,042 \pm 0,007$	$40,2 \pm 8,8$	$0,0013 \pm 0,00058$	$4,4 \cdot 10^{-2}$	-
		dCTP	$0,256 \pm 0,041$	$10,3 \pm 2,2$	$0,03 \pm 0,01$	1	-
	R71G	dTTP	$0,00061 \pm 0,00012$	$520,4 \pm 68,2$	$0,0000012 \pm 0,00000015$	$5,5 \cdot 10^{-3}$	Падение в 1085 раз
		dCTP	$0,01 \pm 0,00036$	$49,3 \pm 9,7$	$0,00022 \pm 0,00004$	1	Падение в 135 раз
T	WT*	dATP	$0,088 \pm 0,009$	$72,6 \pm 6,7$	$0,0013 \pm 0,0002$	1	-
		dGTP	$0,194 \pm 0,042$	$41,5 \pm 5,4$	$0,0047 \pm 0,0009$	3,7	-
		dTTP	$0,091 \pm 0,012$	$30,7 \pm 10,7$	$0,0029 \pm 0,0014$	2,3	-
	R71G	dATP	$0,00081 \pm 0,00007$	$958,3 \pm 243,6$	$0,000001 \pm 0,0000003$	1	Падение в 1242 раз
		dGTP	$0,00556 \pm 0,00037$	$855,1 \pm 331,9$	$0,000008 \pm 0,000002$	8	Падение в 580 раз
		dTTP	$0,00117 \pm 0,0002$	$702,1 \pm 144,8$	$0,000002 \pm 0,0000005$	1,8	Падение в 2129 раз
C	WT*	dATP	$0,45 \pm 0,23$	$388,9 \pm 233,7$	$0,0013 \pm 0,00017$	$1,3 \cdot 10^{-1}$	-
		dGTP	$0,184 \pm 0,016$	$19,6 \pm 3,5$	$0,0097 \pm 0,0008$	1	-
		dTTP	$0,106 \pm 0,01$	$76,8 \pm 12,3$	$0,0014 \pm 0,0002$	$1,5 \cdot 10^{-1}$	-
		dCTP	$0,162 \pm 0,01$	$103,6 \pm 24,1$	$0,0016 \pm 0,0003$	$1,7 \cdot 10^{-1}$	-
	R71G	dATP	$0,00085 \pm 0,000008$	$774,4 \pm 38,9$	$0,0000011 \pm 0,00000004$	$1,5 \cdot 10^{-1}$	Падение в 1152 раз
		dGTP	$0,00181 \pm 0,0004$	$257,2 \pm 27,4$	$0,0000074 \pm 0,000002$	1	Падение в 1307 раз
		dTTP	$0,00126 \pm 0,00004$	$1248,3 \pm 29,9$	$0,000001 \pm 0,0000001$	$1,4 \cdot 10^{-1}$	Падение в 1419 раз
		dCTP	ND				

*WT – фермент дикого типа

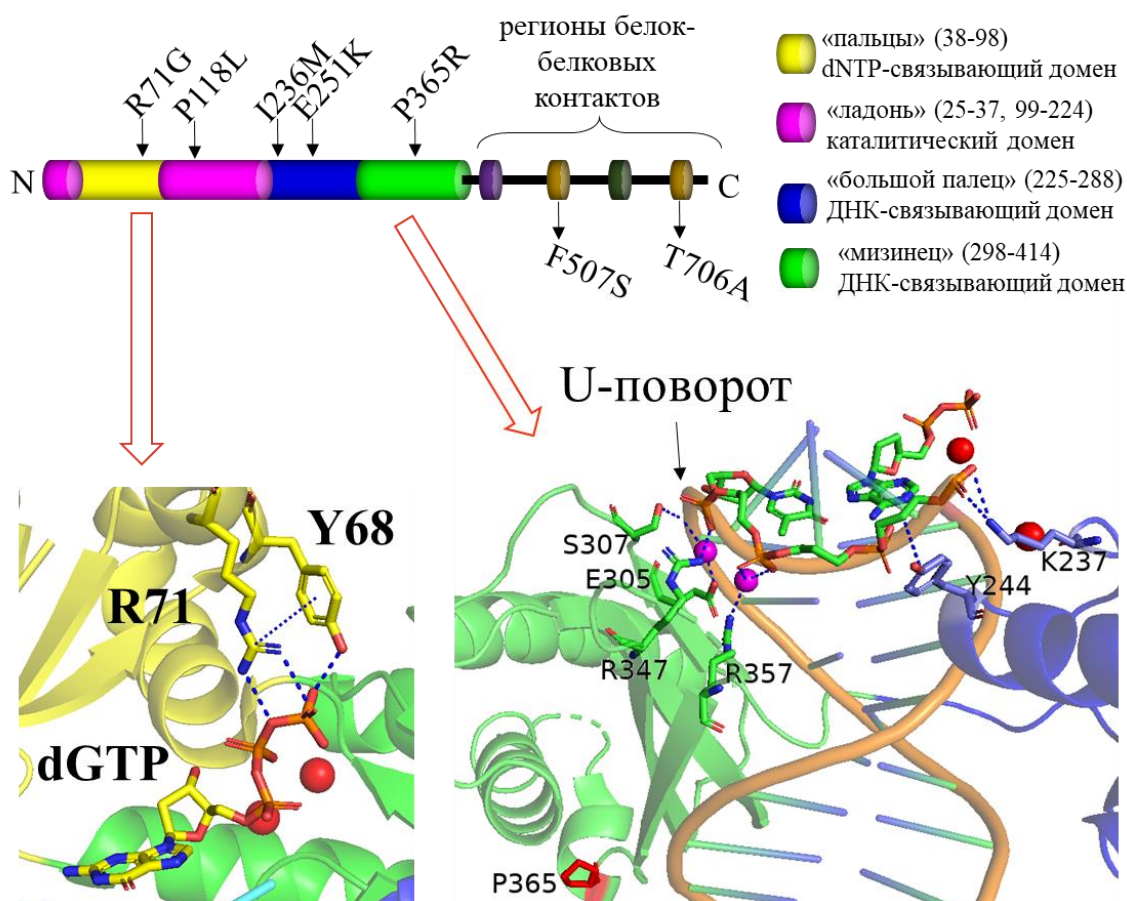


Рис. 3 Расположение исследуемых аминокислотных замен в Pol I человека. Показана доменная организация Pol I человека и структура затрагиваемых районов (на основе PDB ID 3GV8^[40]). Атомы С показаны желтым, N – синим, O – красным, P – оранжевым, красные сферы – ионы магния, сиреневые – молекулы воды. Синие пунктирные линии показывают водородные связи и π -катионную связь между Arg71 и Tyr68. Сахаро-фосфатный остов матричной ДНК после U-поворота показан оранжевыми линиями.

Напротив матричного G полиморфный вариант R71G, действительно, становится более точным, поскольку частота включения некомплементарного dTTP снижается почти в 10 раз по сравнению с Pol I дикого типа. С другой стороны, фермент дикого типа включает некомплементарный dGTP напротив матричного T в 3,7 раз эффективнее комплементарного dATP, тогда как форма с заменой R71G включает dGTP в 8 раз эффективнее, чем dATP. Наконец, напротив матричного C форма с заменой R71G обладает сравнимой с белком дикого типа частотой ошибочного включения нуклеотидов, но эффективность синтеза снижена более чем в 1000 раз.

Остаток Arg71 принимает участие в образовании водородных связей с трифосфатной группой входящего dNTP (Рис. 3) (Nair *et al.*, 2004, 2005; Kirouac and Ling, 2009; Choi *et al.*, 2016) и π -катионном взаимодействии с боковой группой Tyr68. Можно предположить, что замена Arg71 на глицин приводит к потере не только контактов с входящим нуклеотидом, но и к подвижности остатка Tyr68, также контактирующим с трифосфатом dNTP. Таким образом, редкий вариант Pol I с заменой R71G, вероятно, лишается трёх стабилизирующих контактов с входящим нуклеотидом, что ведёт к снижению сродства к dNTP и объясняет значительное снижение ДНК-полимеразной активности. Изменения в

спектре включаемых нуклеотидов формы с заменой R71G, по-видимому, связаны с возрастающей ролью других взаимодействий, в том числе водородных связей между основаниями матричного и входящего нуклеотидов или с аминокислотами белка. Например, известно, что N²-группа входящего dGTP взаимодействует с остатком Gln59 PolI, что объясняет предпочтения ферментом dGTP на ряде субстратов.

Остаток Pro365 располагается в домене «мизинец», который взаимодействует с матричной ДНК и стабилизирует уникальный для PolI структурный элемент – U-поворот (Рис. 3). Матричные пиримидины «выталкиваются» активным центром PolI в сторону большой бороздки. Предположительно, U-поворот играет роль в стабилизации пары при синтезе напротив матричных пиримидинов. Предположительно, замена P365R нарушает функционирование «мизинца» и оказывает влияние на образование U-поворота, что приводит к изменению спектра включения dNTP напротив матричных пиримидинов.

2. Транслезионная активность редких вариантов PolI человека

Следующим этапом в биохимической характеристике вариантов PolI стало тестирование их транслезионной активности. Из широкого спектра повреждений, которые PolI способна «проходить», для работы были отобраны:

1. АП-сайт – наиболее распространенное повреждение в ДНК, крайне мутагенно вследствие своей неcodирующей природы. Большинство ДНКП включают напротив АП-сайта dATP, тогда как PolI – dGTP.

2. 8-охо-G и тимидингликоль (TG) – наиболее распространенные повреждения ДНК, индуцируемые активными формами кислорода. 8-охо-G в *син*-конформации имитирует основание Т, вследствие чего большинство ДНКП включают напротив повреждения dATP, в то время как PolI – dCTP. TG копируется большинством ДНКП достаточно точно, но в значительной степени блокирует как включение нуклеотидов напротив повреждения, так и дальнейший синтез ДНК.

3. 1,N⁶-этенoadенин (εА) – продукт реакции с винилхлоридом. Кроме того, источником такой модификации могут служить продукты метаболизма при окислении липидов (Bartsch *et al.*, 1994). Нарушает образование уотсон-криковской пары и блокирует известные ДНКП, кроме PolI, использующей хугстиновскую пару при прохождении εА и включающей dTTP.

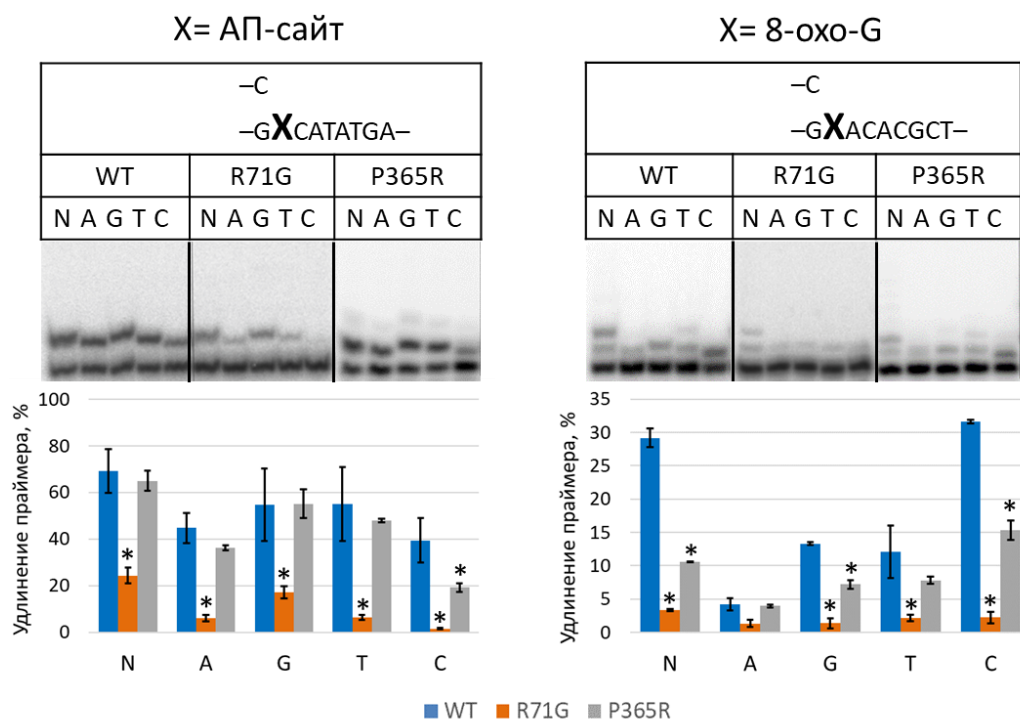
4. O⁶-me-G – образуется под действием ряда алкилирующих агентов.

Основными критериями выбора повреждений были их сравнительно высокая распространённость в природе (биологическая значимость) и эффективность и уникальность спектра включаемых напротив повреждений нуклеотидов PolI.

Аминокислотные замены в каталитическом коре белка (P118L, I236M, E251K) и в С-концевом участке (F507S, T706A), которые не оказывали влияния на ДНК-полимеразную активность PolI на ДНК-субстратах без повреждений, также не влияли на уровень транслезионной активности и спектр включаемых

нуклеотидов напротив всех протестированных повреждений. Таким образом, если замены R118L, I236M, F507S и T706A нарушают функционирование Pol ϵ , то это происходит не на уровне каталитических свойств фермента, а, предположительно, на уровне пост-трансляционных модификаций и белок-белковых взаимодействий.

Замена R365R привела к падению эффективности включения всех нуклеотидов напротив 8-охо-G, хотя и не повлияла на спектр включения dNTP, а также незначительно снизила эффективность включения dCTP напротив АП-сайта (Рис. 4). Следует отметить, что основание (См. диссертацию, Обзор литературы, рис. 3) *син*-8-охо-G в активном центре Pol ϵ «сдвинут» в сторону большой бороздки подобно матричному Т. Можно предположить, что снижение транслезионной активности напротив 8-охо-G у формы с заменой R365R вызвано теми же причинами, что и изменение спектра включаемых нуклеотидов напротив Т и С. Например, с дестабилизацией домена «мизинца» и потерей возможности образовать U-поворот, потенциально стабилизирующий «вывернутые» к



большой бороздке матричные основания.

Рис. 4 Реакция удлинения праймера на ДНК-субстратах с АП-сайтом и 8-охо-G формами R71G и P365R Pol ϵ . В верхней части показаны электрофореграммы продуктов реакции, в нижней – диаграммы, представляющие процент удлиненного праймера. Для дикого типа (WT) и P365R формы время реакции составило 20 мин (10 нМ), для R71G формы – 60 мин (100 нМ), выравнивали по активности на неповрежденной ДНК. Звёздочками указаны статистически значимые отличия ($p < 0.05$).

Наиболее существенное влияние на транслезионную активность Pol ϵ оказала замена R71G. Потеря контактов Arg71 и Tyr68 с трифосфатом входящего dNTP у формы R71G, вероятно, снижает сродство фермента к входящему нуклеотиду и приводит к ингибированию его активности. Действительно, напротив почти всех (кроме ϵ A) протестированных повреждений вариант с

заменой R71G демонстрирует значительное снижение активности по сравнению с Pol α дикого типа (Рис. 4, Рис. 5).

Напротив АП-сайта Pol α дикого типа включает все dNTP с близкой эффективностью с небольшим предпочтением к dGTP, обусловленным дополнительными контактами аминокислот белка с основанием входящего dGTP. Потеря дополнительных контактов с dNTP у формы R71G сильнее сказывается на включении менее стабилизированных нуклеотидов: действительно, предпочтение dGTP по сравнению с другими нуклеотидами выше у варианта с заменой R71G (Рис. 4).

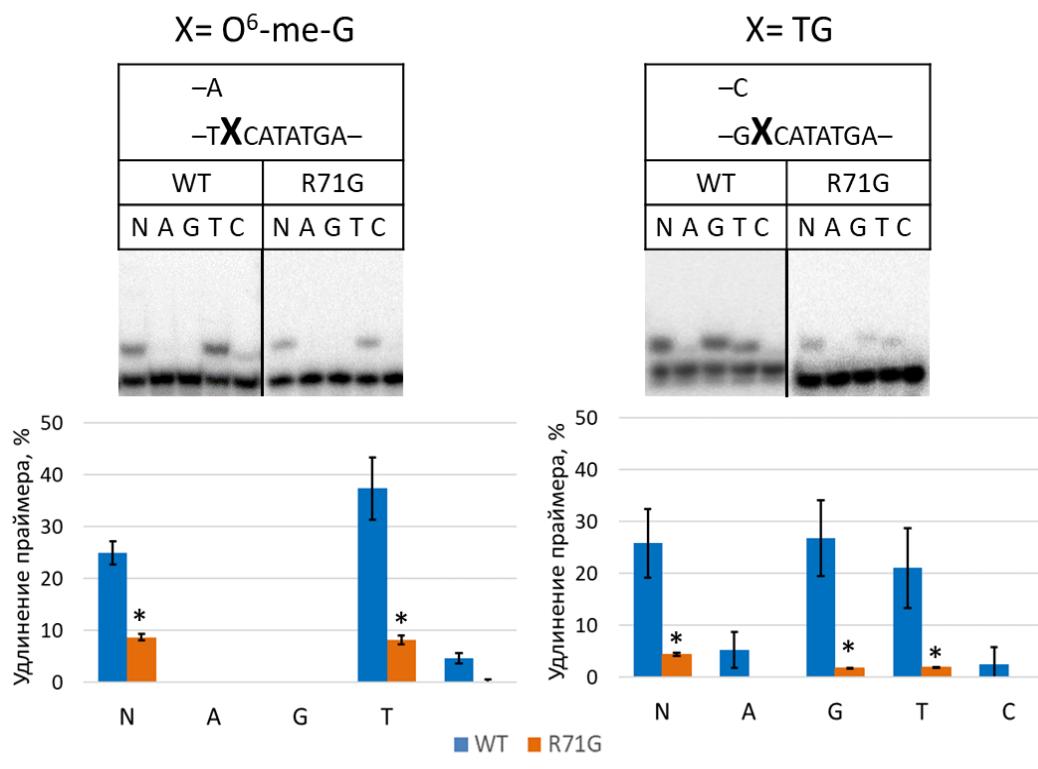


Рис. 5 Реакция удлинения праймера на ДНК-субстратах с O⁶-me-G и TG R71G Pol α . В верхней части рисунка показаны электрофореграммы продуктов реакции, в нижней – диаграммы, представляющие процент удлиненного праймера. Для Pol α дикого типа (WT) время реакции составило 20 мин (10 нМ), для R71G Pol α – 60 мин (100 нМ). Звёздочками указаны статистически значимые отличия ($p < 0.05$).

Уникальный узкий активный центр Pol α способен размещать неканонические хугстиновские пары оснований, что позволяет ферменту «проходить» повреждения, нарушающие или блокирующие образование уотсон-криковских пар. К таким повреждениям, в частности, относится ϵ A. Использование хугстиновских пар позволяет Pol α включать напротив ϵ A dTTP и dCTP с близкой эффективностью. Однако у варианта R71G мы наблюдали снижение включения dCTP, что может быть следствием нарушения хугстиновских взаимодействий (

^{32}P -5'-AATGACCAGGCC⁺¹

3'-TTACCGGTCCGGXCTTATGAACTCGACGGG

X = A/εA

 ^{32}P -5'-GTCACAGAGATACTAC⁺¹

3'-CAGTGTCTCTATGATGXACACGCTGACCAG

X = A/7-deA

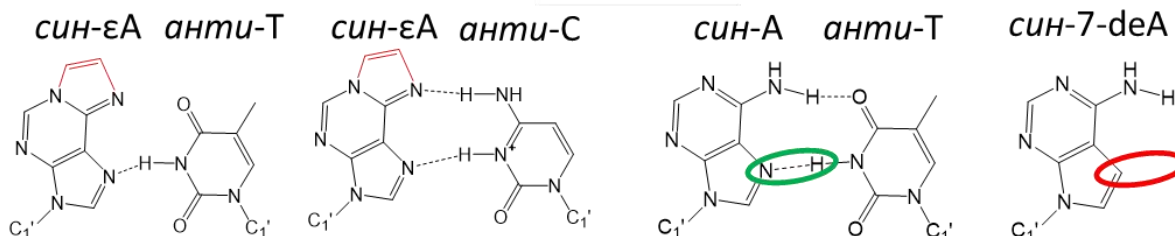
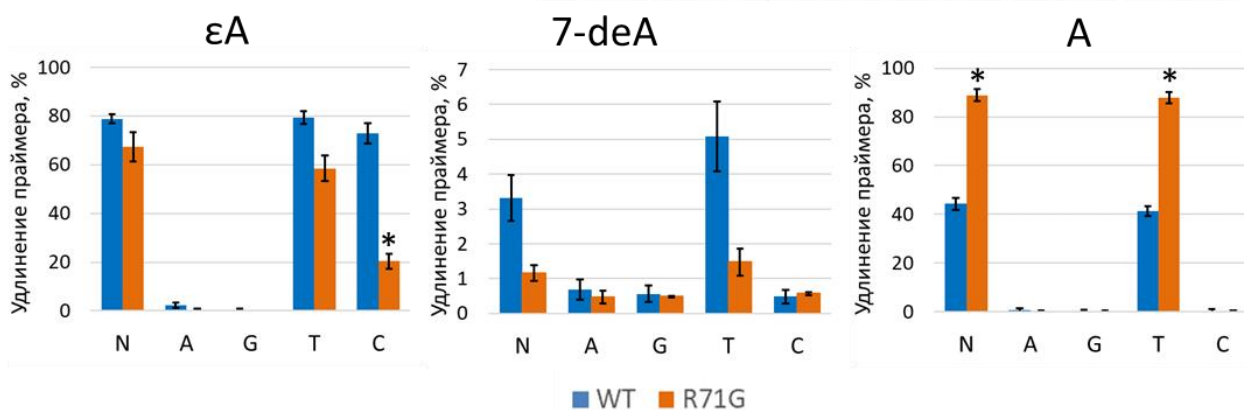
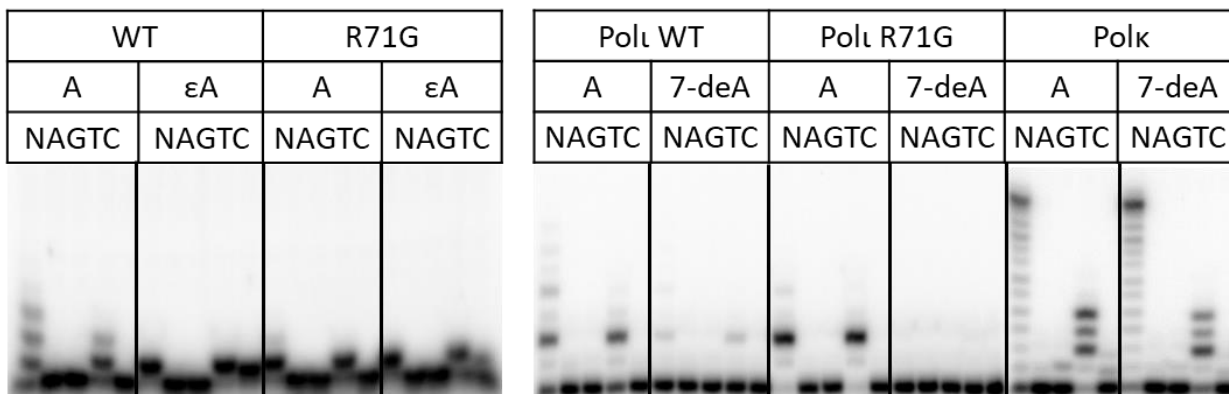


Рис. 6).

Чтобы проверить, поддерживает ли вариант PolI с заменой R71G хугстиновские взаимодействия, было проведено тестирование активности на ДНК-субстрате с 7-деза-аденином (7-deAe). Данная модификация нарушает образование хугстиновских пар и приводит к ингибированию PolI, но не ДНКП, использующих канонические уотсон-криковские пары, например, Polk. Эксперимент показал, что вариант PolI с заменой R71G, как и белок дикого типа, ингибируется на ДНК с 7-deA, что свидетельствует о способности ферментов поддерживать хугстиновские взаимодействия.

^{32}P -5'-AATGACCAGGCC⁺¹

3'-TTACCGGTCCGGXCTTATGAACTCGACGGG

X = A/εA

 ^{32}P -5'-GTCACAGAGATACTAC⁺¹

3'-CAGTGTCTCTATGATGXACACGCTGACCAG

X = A/7-deA

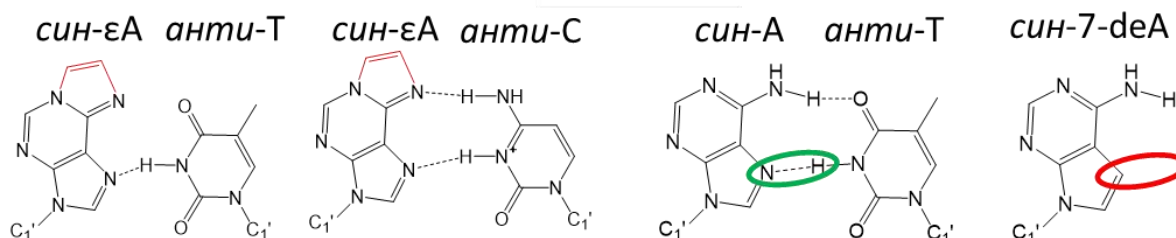
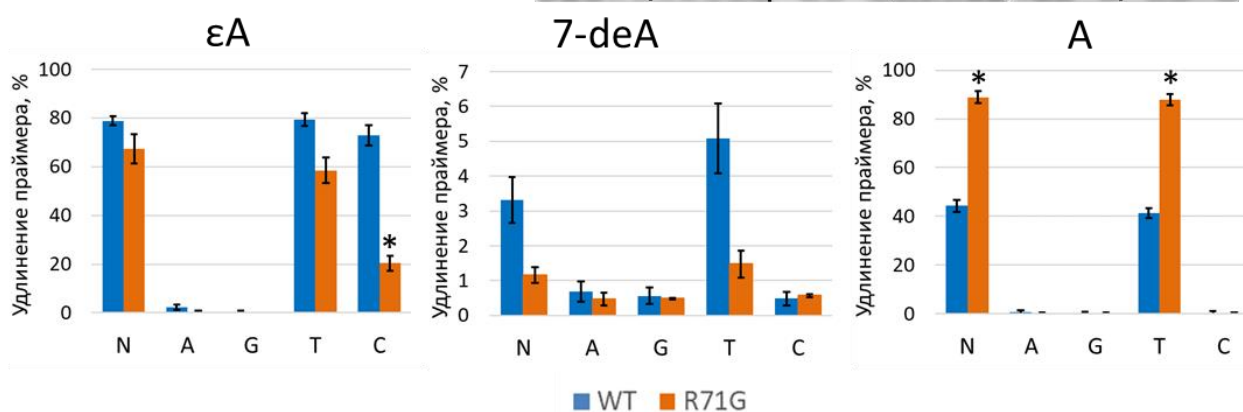
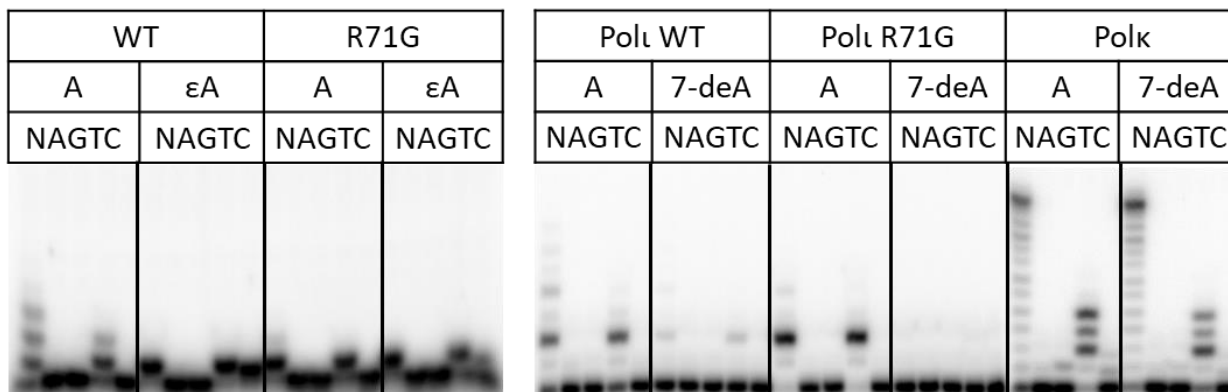


Рис. 6 Реакция удлинения праймера *PolI* дикого типа (WT), варианта с заменой R71G и *Polk* человека напротив εA и 7-deA. Последовательности используемых ДНК-субстратов показаны в верхней части рисунка. Показаны электрофореграммы продуктов реакции и диаграммы, представляющие процент удлинённого праймера. Звёздочками указаны статистически значимые отличия ($p < 0.05$). В нижней части рисунка показаны структуры хугстиновских пар, образующихся с εA и A. Выделена водородная связь (зеленым), образование которой блокируется при наличии 7-deA (красным).

Для количественной оценки эффективности включения нуклеотидов напротив ряда повреждений, были измерены кинетические параметры K_M и k_{cat} для белка дикого типа и формы с заменой R71G (Таблица 2). Полученные данные в целом подтверждают выводы, сделанные из анализа реакций удлинения праймера. Напротив АП-сайта форма R71G с большим предпочтением включала dGTP, чем фермент дикого типа, что, вероятно, обусловлено большим вкладом контактов dGTP с аминокислотными остатками белка. Напротив εA *PolI* включала преимущественно dTTP, что было незаметно в реакциях удлинения праймера. Кроме того, точность *PolI* практически не изменялась при замене остатка Arg71. Сохранение точности у формы R71G напротив εA служит дополнительным подтверждением отсутствия влияния данной мутации на тип

пар оснований, формируемых в активном центре Pol α . Напротив TG Pol α более эффективно включала dTTP, чем dGTP, в отличие от матричного T (для которого наблюдалось предпочтение dGTP>dTTP). Предположительно, непланарная структура TG вызывает стерические затруднения при размещении входящих крупных пуринов в активном центре Pol α .

Таблица 2 Кинетические параметры (K_M и k_{cat}) включения dNTP Pol α дикого типа и вариантом с заменой R71G напротив AP-сайта, ϵA и TG в условиях стационарной кинетики.

Повр. ДНК	Форма Pol α	dNTP	k_{cat} , мин $^{-1}$	K_M , μM	k_{cat}/K_M , мин $^{-1}\mu M^{-1}$	*F $_{inc}$	k_{cat}/K_M (относит. WT)
АП-сайт	WT**	dATP	0,0556 \pm 0,0048	41,8 \pm 0,5	0,00143 \pm 0,0002	1	-
		dGTP	0,0632 \pm 0,0027	17 \pm 1,2	0,0037 \pm 0,0003	2,6	-
		dTTP	0,0569 \pm 0,0076	19,6 \pm 5	0,0033 \pm 0,0008	2,3	-
		dCTP	0,0312 \pm 0,0044	75,3 \pm 17,7	0,0004 \pm 0,00004	3*10 $^{-1}$	-
	R71G	dATP	0,0033 \pm 0,0003	535,6 \pm 74,6	0,0000063 \pm 0,0000004	1	Падение в 226 раз
		dGTP	0,005 \pm 0,0004	248,2 \pm 48	0,000022 \pm 0,000002	3,4	Падение в 174 раз
		dTTP	0,0052 \pm 0,0003	911,6 \pm 185,1	0,0000062 \pm 0,0000009	9,7*10 $^{-1}$	Падение в 535 раз
		dCTP	0,0037 \pm 0,0003	2770,7 \pm 246	0,0000014 \pm 0,0000002	2,2*10 $^{-1}$	Падение в 307 раз
ϵA	WT**	dTTP	0,1348 \pm 0,0174	9,66 \pm 0,12	0,014 \pm 0,0017	1	-
		dCTP	0,2045 \pm 0,0104	143,1 \pm 33	0,0016 \pm 0,0003	1,1*10 $^{-1}$	-
	R71G	dTTP	0,0121 \pm 0,0006	149,2 \pm 16,8	0,000085 \pm 0,000011	1	Падение в 165 раз
		dCTP	0,01 \pm 0,0019	744,7 \pm 269,8	0,000014 \pm 0,000003	1,7*10 $^{-1}$	Падение в 108 раз
TG	WT**	dGTP	0,0462 \pm 0,003	84,5 \pm 13,6	0,00057 \pm 0,00007	-	-
		dTTP	0,0207 \pm 0,0012	15,4 \pm 4,1	0,0015 \pm 0,0003	-	-
	R71G	dGTP	0,0017 \pm 0,00017	1051,4 \pm 94,5	0,0000016 \pm 0,0000018	-	Падение в 346 раз
		dTTP	0,001 \pm 0,0002	412,9 \pm 114,5	0,0000028 \pm 0,0000004	-	Падение в 531 раз
*F $_{inc}$ включения dATP напротив AP-сайта принят за 1,							
** Дикий тип.							

3. 5'-дРФ-лиазная активность редких вариантов Pol α человека

Pol α рассматривается в качестве вспомогательной ДНКП в ходе ЭРО. Pol α обладает активностью по отщеплению 5'-дРФ группы, остающейся в ДНК после

действия APE1 и частично комплементирует функцию Pol β в культуре клеток и экстрактах клеток *in vitro* (Bebenek, 2001; Prasad *et al.*, 2003; Petta *et al.*, 2008).

Следующий этап работы заключался в анализе влияния аминокислотных замен Pol ι , располагающиеся в каталитическом коре фермента, на его 5'-дРФ-лиазную активность. Для тестирования активности использовали 3'-меченый (^{32}P) олигонуклеотидный дуплекс, одна из цепей которого содержала dU. После последовательной обработки субстрата UDG-гликозилазой и APE1-эндонуклеазой в дуплексе образовывалась однонуклеотидная брешь с 5'-дРФ группой (Рис. 7). Поскольку 5'-дРФ-группа лабильна и склонна к спонтанному гидролизу, в контрольном эксперименте без Pol ι следили за фоновым отщеплением 5'-дРФ. Остановку реакции проводили добавлением борогидрида натрия, восстанавливающего 5'-дРФ-группу, с целью стабилизации непрореагировавшего субстрата и исключения его из реакции.

Остатки Ile236 и Glu251 располагаются в мотиве HhH домена «большой палец», который гомологичен HhH мотиву дРФ-лиазного активного центра Pol β . Мы наблюдали небольшое, но статистически значимое увеличение отщепления 5'-дРФ-группы формой E251K, в то время как замена I236M не оказала влияния на 5'-дРФ-лиазную активность Pol ι (Рис. 7). Влияние замены E251K на 5'-дРФ-лиазную функцию фермента, предположительно, может быть следствием образования положительно заряженным Lys251 дополнительных контактов с ДНК и повышения аффинности к ДНК субстрату. Прямое участие остатка Lys251 в катализе сомнительно, поскольку ранее было показано, что замена E251A не изменяет 5'-дРФ-лиазную функцию фермента (Miropolskaya *et al.*, 2017).

В настоящее время нет структурных данных, описывающих комплексы Pol ι с ДНК в процессе связывания и отщепления 5'-дРФ. Тем не менее, ранее в нашей лаборатории было показано, что для отщепления 5'-дРФ нужны остатки домена «пальцы» Gln59 и Lys60 фермента. Можно предположить, что близкий к ним остаток домена «пальцы» Arg71 участвует в расположении ДНК-субстрата для осуществления реакции, поэтому его замена приводит к снижению эффективности отщепления дРФ-группы Pol ι . Падение 5'-дРФ-лиазной активности у формы R365R может быть также связано с дестабилизацией домена «мизинец» и потерей U-поворота, который может быть необходим для корректного позиционирования ДНК-субстрата при реакции. Для проверки гипотез необходимы рентгеноструктурные исследования.

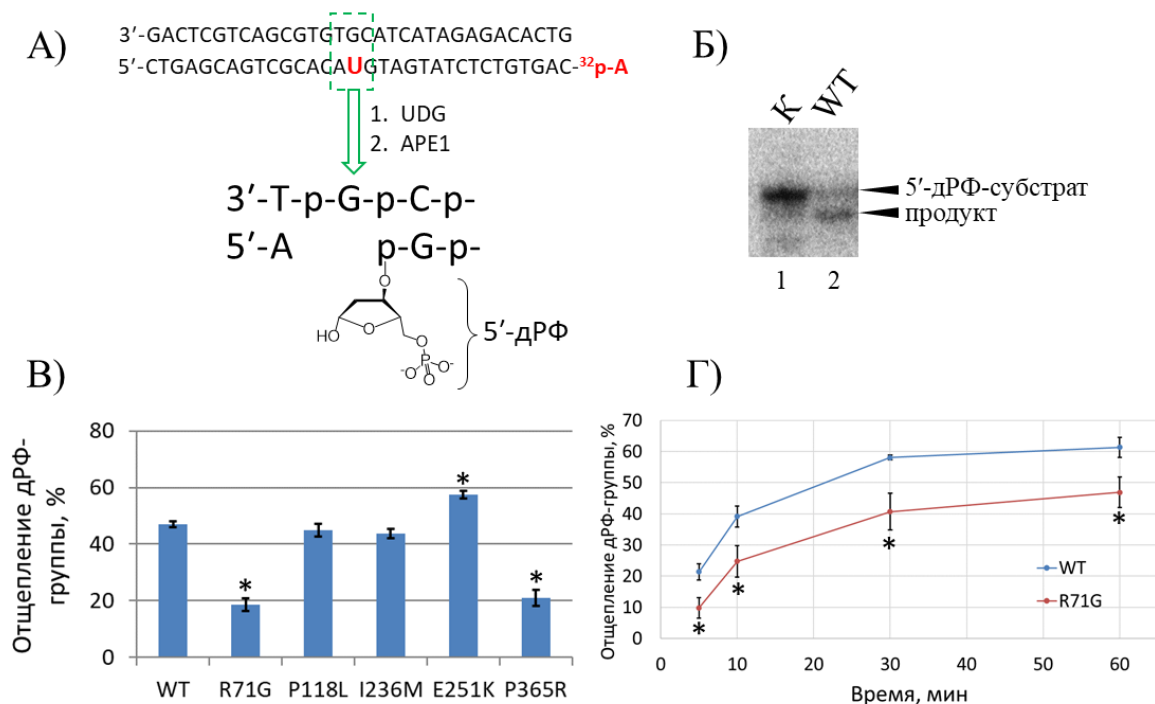


Рис. 7 5'-дРФ-лиазная активность форм с заменами R71G, I236M, E251K, P118L и P365R Polι человека. А) Схема получения субстрата для тестирования 5'-дРФ-лиазной активности. Олигонуклеотидный дуплекс, содержащий меченую по 3'-концу цепь обрабатывали UDG и APE1 Б) Пример электрофореграммы продуктов реакции отщепления 5'-дРФ-группы Polι В) Диаграмма, показывающая процент отщепленной 5'-дРФ-группы различными формами Polι Г) Кинетические кривые 5'-дРФ-лиазной активности для Polι дикого типа (WT) и с заменой R71G.

4. Стабильность формы R71G Polι

Важно отметить, что наблюдаемое снижение активности формы Polι с заменой R71G *in vitro* могло быть связано с низкой стабильностью фермента и быстрой потерей активности при инкубации в реакционной смеси. Мы сравнили способность формы с заменой R71G и Polι дикого типа сохранять ДНК-полимеразную активность в течение длительного времени при 37°C или при разных температурах (см. Результаты и обсуждение, стр. 129, Рис.22). В течение 60 мин инкубации при 37°C потери ДНК-полимеразной активности у формы R71G Polι не происходило, что говорит об относительной стабильности фермента при постановке реакции. Активность формы с заменой R71G также сохранялась при 30-минутной инкубации в диапазоне температур 24-40°C и снижалась по сравнению с диким типом только при 42°C. Полученные данные свидетельствуют о сниженной температурной стабильности формы с заменой R71G, но это, вероятно, не оказало влияния на активность фермента в условиях постановки реакций в настоящей работе.

5. Влияние замены R71G Polι на выживаемость клеток человека линии A549 при окислительном стрессе

Polι демонстрирует эффективную транслезионную активность напротив многих типов повреждений *in vitro*. В экспериментах на культурах клеток млекопитающих показана защитная функция Polι при обработке УФ-излучением

(Gueranger *et al.*, 2008; Petta *et al.*, 2008), метилирующими (Akagi *et al.*, 2018) и окислительными (Petta *et al.*, 2008; Temviriyankul *et al.*, 2012; Akagi *et al.*, 2018) агентами.

Следующий этап работы состоял в оценке влияния вариантов *Poli* с нарушенной активностью на выживаемость клеток при обработке распространенными ДНК-повреждающими агентами: метилметансульфонатом (ММС, метилирующий агент), цисплатином (образует внутри- и межцепочечные сшивки ДНК), блеомицином (вызывает двухцепочечные разрывы в ДНК) и перекисью водорода (окислительный агент). В экспериментах использовали клетки человека A549 линии карциномы легкого, в которых с использованием технологии CRISPR/Cas9 в нашей лаборатории был получен нокаут гена *POLI*.

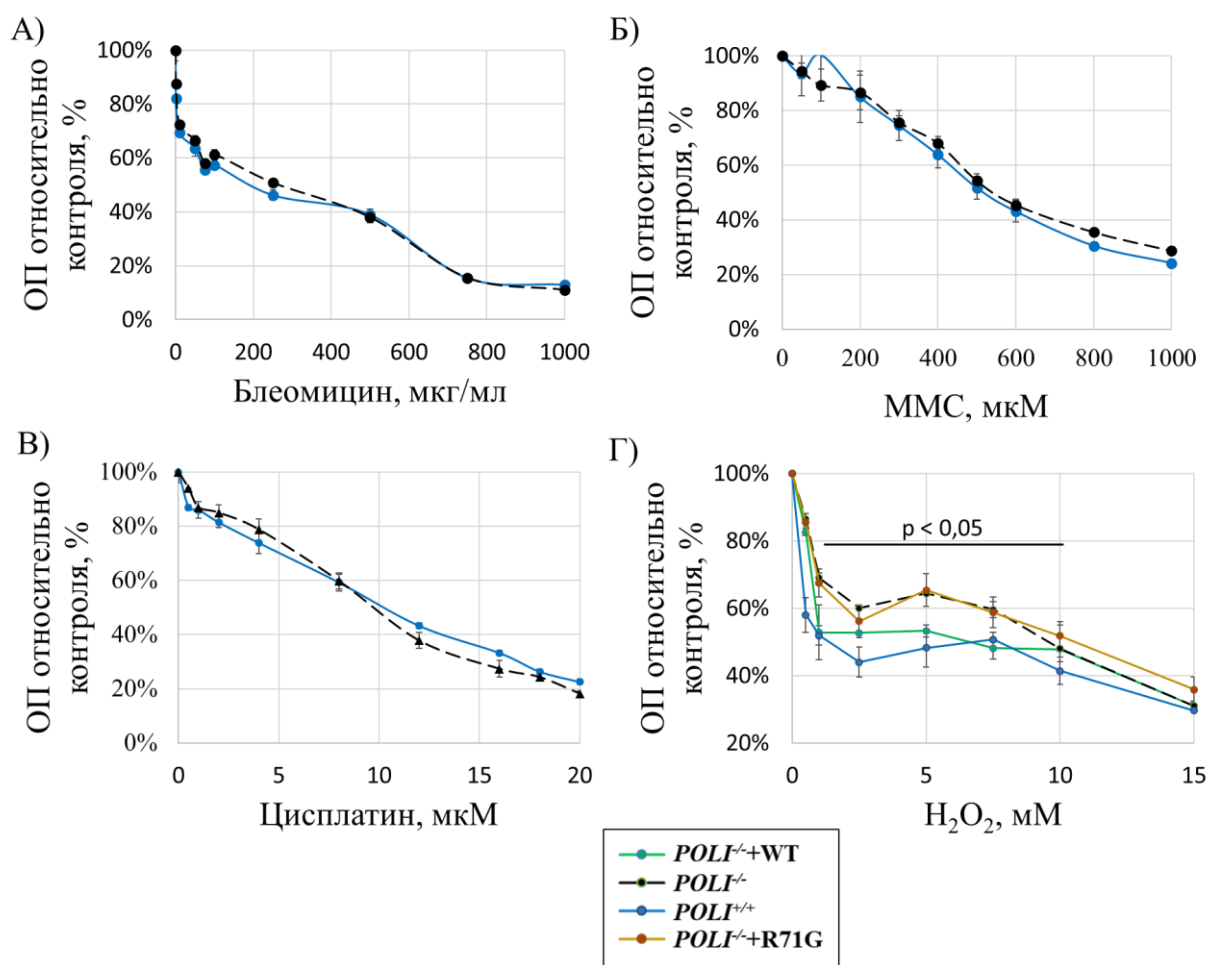


Рис. 8 Анализ метаболической активности клеток линии A549 дикого типа (*POLI*^{+/+}) и с нокаутом по гену *POLI* (*POLI*^{-/-}) МТТ-тестом при обработке различными ДНК-повреждающими агентами. Клетки комплементировали плазмидой с геном *POLI* дикого типа (*POLI*^{-/+}WT) или геном, кодирующим замену R71G (*POLI*^{-/+}+R71G). Графики демонстрируют оптическую плотность (ОП) относительно контроля в зависимости от концентрации повреждающего агента. Диапазон точек, в которых ОП *POLI*^{-/-} и *POLI*^{-/+}+R71G клеток статистически значимо отличалась от *POLI*^{+/+} клеток, указан на диаграмме Г).

О выживаемости клеток при обработке ДНК-повреждающими агентами судили по их метаболической активности, измеренной МТТ-тестом, в основе которого лежит способность НАДФ-Н клеточных оксидоредуктаз восстанавливать жёлтый тетразоловый краситель МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-

ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) до нерастворимого в воде пурпурного формазана. В предварительных экспериментах подбирали оптимальную концентрацию и время обработки для каждого ДНК-повреждающего агента.

Согласно полученным данным, нокаут *POL1*^{-/-} не сенсibilизировал клетки линии A549 при обработке цисплатином и блеомицином (Рис. 8А,Б), что говорит о том, что Pol1 не является ключевым ферментом репарации двухцепочечных разрывов ДНК и ТЛС сшивок ДНК, индуцированных цисплатином.

Также в настоящей работе не наблюдалось снижения выживаемости *POL1*^{-/-}-клеток при обработке ММС по сравнению с линией клеток с геном *POL1* дикого типа (Рис. 8В). Эти данные согласуются с литературными данными по отсутствию влияния нокаута *POL1* при обработке клеточной линии фибробластов человека MRC5 этилметансульфонатом (Petta *et al.*, 2008). Следует отметить, что на шаттл-векторах в фибробластах человека была показана вовлеченность Pol1 в безошибочную репликацию напротив 3-me-A – ключевого продукта действия ММС (Yoon *et al.*, 2017). Однако в ТЛС напротив 3-me-A также вовлечены другие ДНКП (Polk, REV1, Polζ и Polθ) (Yoon *et al.*, 2017), и можно предположить, что Pol1 играет вспомогательную роль при ТЛС напротив данного повреждения. Отличия в полученных результатах также могут быть связаны с дизайном эксперимента: разными линиями клеток, концентрациями ММС и временем регистрации выживаемости клеток.

Неожиданным, на первый взгляд, результатом исследования стало небольшое, но статистически значимое (1-7,5 мМ H₂O₂, p < 0,05) повышение метаболической активности клеток A549 с нокаутом *POL1* в условиях окислительного стресса (Рис. 8Г). Повышение метаболической активности при обработке клеток перекисью водорода может быть связано с нарушением клеточного цикла в *POL1*^{-/-} клетках (замедлением перехода G1/S). Предположительно, клетки, которые не находились в состоянии пролиферации, могли дольше сохранять метаболическую активность, в то время как клетки дикого типа в тех же условиях погибали быстрее. Повышение выживаемости клеток в ответ на УФ (Bianchi *et al.*, 2013) и окислительный стресс (данные нашей лаборатории) было описано ранее для клеток с нокаутом *PRIMPOL*.

На следующем этапе проверяли, восстанавливает ли экспрессия *POL1* дикого типа и с заменой R71G фенотип клеток линии A549 при обработке перекисью водорода. *POL1*^{-/-}-клетки трансфицировали плазмидой, несущей ген *POL1* или его вариант, проводили селекцию на антибиотике G418, обрабатывали перекисью водорода и измеряли метаболическую активность. Как и ожидалось, трансфекция плазмидой с геном *POL1* дикого типа частично восстановила устойчивость нокаутной линии к обработке перекисью, тогда как клетки, трансфицированные плазмидой с геном, кодирующим вариант с заменой R71G, демонстрировали одинаковый с *POL1*^{-/-} клетками уровень метаболической активности. Полученные данные согласуются с полученными биохимическими результатами о падении активности полиморфной формы Pol1 R71G *in vitro*. Можно предположить, что данный вариант Pol1 менее активен в клетках человека.

6. ДНК-полимеразная активность Pol α человека и формы R71G напротив mC и hmC

Основной путь мутагенеза в CpG сайтах связан с дезаминированием mC с образованием Т. Предполагается, что низкая точность синтеза ДНК в CpG сайтах, содержащих mC, в ходе репликации, репарации и ТЛС может служить дополнительным источником мутагенеза. Следующая часть работы заключалась в тестировании ДНК-полимеразной активности Pol α напротив матриц, содержащих mC или hmC в двух наиболее распространенных в опухолях сиквенс-контекстах (GCG и TCG), а также оценке влияния замены R71G на эту активность.

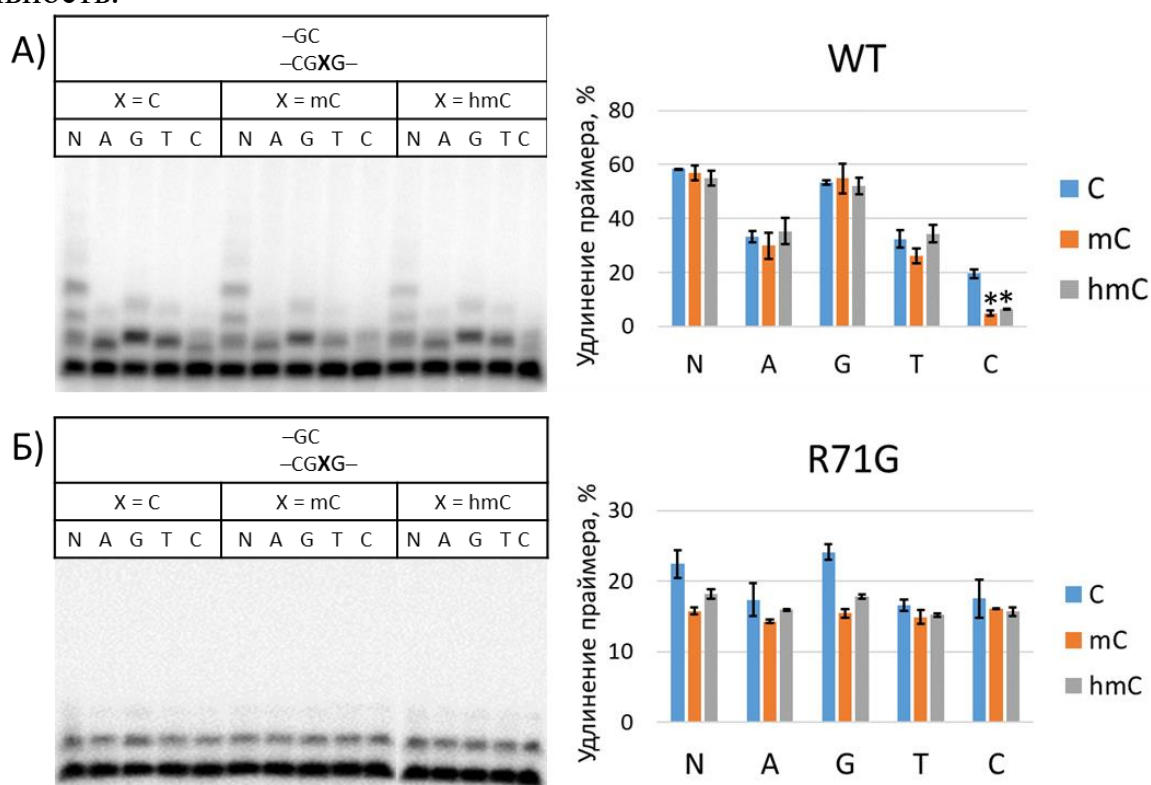


Рис. 9 Реакция удлинения праймера на матрицах с C, mC или hmC Pol α дикого типа (WT) (A) и вариантом с заменой R71G (Б). Слева показаны электрофореграммы продуктов реакции, справа – диаграммы, представляющие процент удлиненного праймера. Для Pol α дикого типа время реакции – 10 мин, концентрация фермента – 10 нМ, для формы Pol α R71G – 30 мин и 100 нМ фермента.

Наиболее распространенным типом мутаций в CpG-островках являются транзиции C>T. Можно ожидать, что если бы ДНКП играла существенную роль в мутагенезе CpG-сайтов, то метилирование основания C приводило бы к снижению точности ДНКП и более эффективному включению dATP напротив mC по сравнению с C. Полученные данные, однако, свидетельствуют лишь о незначительном влиянии модификации C на точность Pol α : фермент включал dGTP, dATP и dTTP со сравнимой эффективностью напротив C-, mC- и hmC-содержащих матриц в GCG-контексте. Интересно отметить, что модификации приводили к незначительному снижению эффективности включения dCTP Pol α в реакциях удлинения праймера (Рис. 9А). Точное измерение параметров K_M и k_{cat} ферментативной кинетики (Таблица 3) показало, что модификации цитозина

снижают эффективность включения не только dCTP, но также и комплементарного dGTP: метилирование С снижает эффективность включения dGTP в 5 раз, dCTP – в 6,5 раз; гидроксиметилирование С – снижает эффективность включения dGTP в 3 раза, dCTP – в 4 раза. В случае входящего dGTP снижение эффективности синтеза обусловлено преимущественно ростом K_M , тогда как при включении dCTP наблюдали как рост K_M , так и снижение k_{cat} , что косвенно указывает на разное влияние модификации С на включение этих нуклеотидов.

Таблица 3 Кинетические параметры включения (K_M и k_{cat}) dGTP и dCTP напротив С, mC или hmC PolI в *сиквенс-контексте* GXG (X=C, mC, hmC) в условиях стационарной кинетики.

Входящий dNTP	Матричный нуклеотид	k_{cat} , мин ⁻¹	K_M , мкМ	$k_{cat}/K_M \times 10^3$	F_i^*
dGTP	С	0,199 ± 0,035	20,4 ± 2	9,7	1,00
	mC	0,188 ± 0,026	95 ± 12,8	2,0	0,20
	hmC	0,163 ± 0,027	54,6 ± 6,6	3,1	0,32
dCTP	С	0,135 ± 0,027	164,6 ± 0,4	0,82	1,00
	mC	0,035 ± 0,0001	315 ± 58,3	0,11	0,14
	hmC	0,043 ± 0,011	214,6 ± 74,6	0,21	0,25

* F_i представляет собой эффективность включения относительно матричного С

В настоящее время нет данных о структуре комплексов PolI с матричным С, однако, известные биохимические данные согласуются с предположением, что матричный С располагается аналогично Т при включении пуриновых dNTP (Choi *et al.*, 2009). В этом случае, наличие выступающей метильной группы у mC, предположительно, дестабилизирует U-поворот матрицы, что приводит к снижению эффективности синтеза. Для проверки гипотезы необходимы данные рентгеноструктурного анализа.

Гидроксиметилирование также приводит к снижению эффективности включения dCTP и dGTP, но в меньшей степени.

Потеря контактов между фосфатной группой входящего нуклеотида и остатком Arg71 PolI потенциально увеличивает роль взаимодействий между основаниями нуклеотидов при селекции входящего нуклеотида. Статус метилирования может оказать существенное влияние на эффективность включения dNTP вариантом PolI с заменой R71G. Однако в реакциях удлинения праймера включение dATP, dTTP и dCTP практически не зависело от модификации матричного С. Наблюдалось небольшое снижение эффективности включения dGTP напротив mC и hmC (Рис. 9Б). Таким образом, влияние замены R71G на точность и эффективность синтеза ДНК PolI напротив mC и hmC оказалось ограниченным.

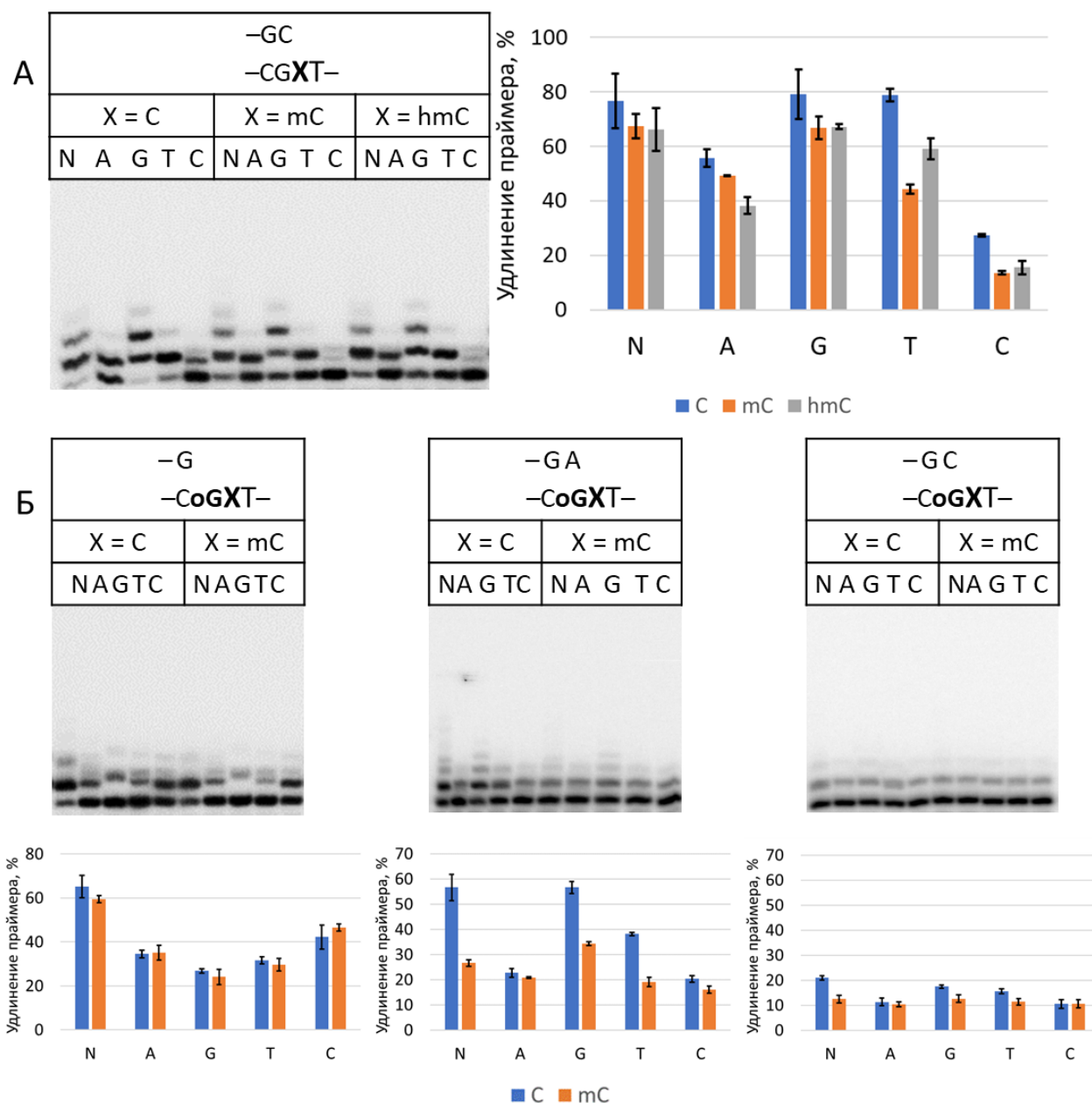


Рис. 10 Реакция удлинения праймера на матрицах, содержащих C, mC или hmC белком WT PolI в сиквнс-контексте матрицы TXY (X=C, mC, hmC, Y=G, 8-охо-G). А) Электрофореграмма и диаграмма, представляющая процент удлиненного праймера в TCG-контексте. Время реакции 10 мин, концентрация фермента 10 нМ. Б) В верхней части показаны электрофореграммы продуктов реакции, в нижней – диаграммы, представляющие долю удлиненного праймера при ТЛС напротив 8-охо-G в контексте TCG. Время реакции – 10 мин, концентрация фермента – 10 нМ

Известно, что mC повышает способность соседнего основания G к окислению, что потенциально увеличивает мутагенность CpG-сайтов. В клетке такая ситуация может возникать при репликации на ДНК с 8-охо-G в контексте CpG с привлечением транслезионных ДНКП (Maga *et al.*, 2007). Оценки встречаемости динуклеотида CpG (Jabbari and Bernardi, 2004; Stevens *et al.*, 2013) и частоты 8-охо-G в геноме человека (ESCODD, 2002) позволяют утверждать, что каждая клетка содержит около 100 Cp(8-охо-G)-сайтов. Был проведен анализ влияния метилирования C на ТЛС напротив 8-охо-G в сиквнс-контексте TCG, для которого характерна повышенная частота мутаций в нескольких типах опухолей. Однако статус метилирования/гидроксиметилирования цитозина в

ТСG-контексте не оказал значительного влияния на спектр включаемых PolI нуклеотидов напротив С (Рис. 10 А), а также эффективность и точность ТЛС напротив 8-охо-G (Рис. 10 Б). Следует, отметить, что включение нуклеотида напротив С/мС было немного снижено при наличии метильной группы, что согласуется с ранее полученными данными.

Было проведено также тестирование способности PolI удлинять пары А/8-охо-G и С/8-охо-G, поскольку известно, что большинство ДНКП активно включают напротив окисленного G dATP и dCTP. Было показано, что PolI удлиняет такие пары менее эффективно, чем неповрежденные. Удлинение «мисматча» А/8-охо-G происходило эффективнее, чем пары С/8-охо-G. Наконец, метилирование С не оказало существенного влияния на точность синтеза PolI, хотя и немного снизило эффективность. (Рис. 10 Б)

В мутационном спектре динуклеотидов CpG доминируют транзиции CG>TA (Alexandrov *et al.*, 2013). PolI включала напротив мС и hmС некомплементарный dATP, что может быть причиной таких мутаций. Однако поскольку включение некомплементарных нуклеотидов PolI оказалось сопоставимым для С, мС и hmС, данное промутагенное действие должно быть независимым от статуса метилирования ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как потеря, так и сверхэкспрессия гена *POL1* могут предрасполагать к развитию онкологических заболеваний (Ohkumo *et al.*, 2006; Iguchi *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015; He *et al.*, 2017). Изменения в экспрессии и активности PolI, вызванные полиморфизмами и мутациями, могут привести к увеличению частоты соматических мутаций и предрасположенности к онкогенезу после воздействия генотоксических агентов.

В настоящей работе впервые охарактеризованы ДНК-полимеразная и 5'-дРФ-лиазная активности полиморфных форм и редких вариантов PolI человека с заменами R71G, P118L, I236M, E251K, P365R, F507S, T706A с использованием рекомбинантного полноразмерного фермента. Идентифицирован набор полиморфизмов, оказывающих влияние на активность PolI. В работе также впервые показано, что полиморфизм со сниженной каталитической активностью R71G не способен комплементировать функцию WT PolI в культуре клеток млекопитающих. Важно отметить, что роль изменяющих активность PolI замен (R71G, E251K, P365R) в развитии онкологических заболеваний в настоящий момент не установлена.

Поиск форм PolI с заменами R71G, E251K и P365R в нескольких базах данных (ClinVar, COSMIC, OMIM, LOVD и HGMD Professional), не обнаружил связи этих полиморфизмов с заболеваниями человека, что может быть следствием их низкой распространенностью в популяции. В то же время замена E251V обнаружена в опухоли яичника (Catalog of Somatic Mutations in Cancer). Соматические мутации, вызывающие замены P365L, P365H и P365S, обнаружены при плоскоклеточном раке глотки, аденокарциноме легкого и метастатической меланоме, соответственно (COSMIC). Тем не менее, остается

неизвестным, «драйверные» ли это мутации, или мутации-«пассажиры». В единственной работе, посвященной замене R71G, сообщалось, что вариант R71G способствует повышению риска развития рака молочной железы у европеоидов (Ellsworth *et al.*, 2007). Таким образом, требуются дальнейшие исследования по генотипированию онкологических пациентов, в том числе исследования, направленные на изучение роли варианта R71G в защите клеток от повреждений ДНК и роли в предрасположенности к онкологическим заболеваниям у человека.

Данные о влиянии замен отдельных аминокислотных остатков Pol ι , полученные в настоящей работе, также важны для понимания структурно-функциональной организации активного центра и расширяют наши представления о механизме синтеза Pol ι на неповрежденной и поврежденной ДНК. В работе впервые охарактеризована точность и эффективность синтеза ДНК Pol ι на ДНК с mC и hmC в сиквенс-контекстах GXG и TXG, встречающихся в ряде опухолей, и изучено влияние статуса метилирования C на транслезионную активность Pol ι напротив соседнего 8-охо-G. Эти данные важны для понимания механизмов мутагенеза в CpG-сайтах.

ВЫВОДЫ

1. Аминокислотные замены полиморфных и редких вариантов P118L, I236M, F507S и T706A не оказывают влияния на точность и эффективность синтеза ДНК Pol ι на неповрежденных и поврежденных ДНК-субстратах.
2. Варианты с заменами E251K и P365R демонстрируют схожую с Pol ι дикого типа эффективность синтеза ДНК на неповрежденной ДНК, однако приводят к незначительным изменениям в точности фермента. Замена E251K незначительно повышает, а замена P365R снижает 5'-дРФ-лиазную активность Pol ι .
3. Редкий вариант R71G Pol ι обладает сниженной ДНК-полимеразной и 5'-дРФ-лиазной активностями, а также демонстрирует повышенную точность синтеза ДНК напротив матричного G по сравнению с белком дикого типа.
4. Вариант R71G Pol ι с низкой эффективностью синтезирует ДНК напротив распространенных повреждений ДНК и отличается от белка дикого типа по спектру включаемых нуклеотидов напротив повреждений. Замена R71G не нарушает хугстиновские взаимодействия в активном центре фермента.
5. Нокаут гена *POL1* в культуре клеток A549 модулирует чувствительность к окислительному стрессу, вызванному перекисью водорода. Вариант Pol ι с заменой R71G не способен компенсировать недостаток Pol ι .
6. Впервые охарактеризована активность Pol ι на ДНК-субстратах, содержащих mC и hmC. Наличие модификаций в некоторой степени снижает эффективность синтеза Pol ι . Статус метилирования цитозина не влияет на эффективность и точность транслезионного синтеза напротив соседнего 8-охо-G Pol ι .

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **E.S. Shilkin**, A.S. Gromova, M.P. Smal, A.V. Makarova. DNA Polymerase and dRP-lyase activities of polymorphic variants of human Pol ι // *Biochemical Journal*, 2021, 478(7):1399-1412. IF=3.857
2. **Шилкин Е.С.**, Петрова Д.В., Полтораченко В.А., Болдинова Е.О., Жарков Д.О., Макарова А.В. Матричные свойства 5-метил-2'-дезоксцитидина и 5-гидроксиметил-2'-дезоксцитидина в реакциях с транслезионными и репаративными ДНК-полимеразами человека // *Молекулярная биология*, 2021, 2(55), 305-311, IF=1.374
3. **Е.С. Шилкин**, Е.О. Болдинова, А.Д. Столяренко, Р.И. Гончарова, Р.Н. Чупров-Неточин, М.П. Смаль, А.В. Макарова. (2020) Транслезионный синтез и ре-инициация синтеза ДНК в формировании устойчивости к химиотерапии. *Биохимия*, 85 (8), 869-882. IF= 2.487
4. **Е.С. Шилкин**, Е.О. Болдинова, А.Д. Столяренко, Р.И. Гончарова, Р.Н. Чупров-Неточин, Р.Ф. Хайруллин, М.П. Смаль, А.В. Макарова. (2020) Транслезионный синтез ДНК и канцерогенез. *Биохимия*, том 85, (4), 494 – 506. IF= 2.487
5. Yudkina A.V.*, **Shilkin E.S.***, Endutkin A.V., Makarova A.V., Zharkov D.O. Reading and misreading 8-oxoguanine, a paradigmatic ambiguous nucleobase // *Crystals*, 2019, 9(5): 269, IF=2.404. *first authors

Тезисы докладов:

1. **Шилкин Е.С.**, Макарова А.В. 5'-дезоксирибофосфат-лиазная активность полиморфных вариантов Pol ι человека. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. (Тезисы VIII Международной школы молодых учёных по молекулярной генетике)*. Звенигород. 19-23 ноября 2018. Сборник тезисов конференции. Стр.124. постер.
2. **Шилкин Е.С.**, Полтораченко В.А, Жарков Д.О., Макарова А. В. Активность ДНК-полимераз человека на метилированных ДНК-матрицах и их производных // *Сборник тезисов Международного Конгресса «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (18-22 июня 2019 г., Санкт-Петербург, Россия)*. Стр. 460
3. **Шилкин Е.С.**, Макарова А.В. ДНК-полимеразная активность полиморфных вариантов ДНК-полимеразы йота человека // *Материалы III Всероссийской конференции по молекулярной онкологии 6–8 декабря 2017 г., Москва. Успехи молекулярной онкологии. 2017;4(4):1-143. С. 31-32.(перевод) Editorial A. Materials of the 3rd All-Russian Conference on Molecular Oncology Moscow, 6–8 December 2017. Advances in molecular oncology. 2017;4(4):1-143. (In Russ.)*
4. **ES Shilkin**, AV Makarova. Translesion DNA synthesis by DNA polymerase ι and its variants // *System Biology of DNA Repair Processes and*

Programmed Cell Death (SbPCD-2018): Symposium (22 Aug. 2018, Novosibirsk, Russia), Abstracts / Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences; Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. – 31pp. – ISBN 978-5-91291-038-8.

5. **Шилкин Е.С**, Бондаренко К.А, Болдинова Е.О., Макарова Анна В., Макарова Алена В. Роль специализированных ДНК- полимераз человека в защите клеток от повреждений ДНК и мутагенезе // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2018, № 1, С 55. (Тезисы XXVI ежегодной научной конференции «Перспективные направления молекулярной генетики». 5–6 февраля 2018 г., Москва). РИНЦ 0.481