

УЧРЕЖДЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ
им. Г.И. Будкера СО РАН
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН
(ИЯФ СО РАН)

О.И. Лаврик, Н.А. Моор, Б.П. Толочко,
Г.Н. Кулипанов

БЕЛКИ – УЧАСТНИКИ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ ДНК
КАК ВАЖНЕЙШИЕ ОБЪЕКТЫ
ДЛЯ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ИЯФ 2011-17

НОВОСИБИРСК
2011

**Белки – участники процессов репарации ДНК
как важнейшие объекты
для рентгеноструктурных исследований**

О.И. Лаврик^{)}, Н.А. Моор^{*)}, Б.П. Толочко, Г.Н. Кулипанов*

^{*)} Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН

Аннотация

Перспективными объектами для изучения с помощью дифракции рентгеновских лучей являются сложные белковые системы, ответственные за регуляцию и координацию всех процессов жизнедеятельности в клетке. Наша лаборатория биоорганической химии ферментов в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН занимается в течение ряда лет исследованием механизмов репарации поврежденной ДНК [1–10]. Хотелось бы отметить, что ИХБФМ СО РАН занимает ведущее место среди институтов РАН в исследовании репарации ДНК.

© Институт ядерной физики им. Г.И.Будкера СО РАН

Перспективными объектами для изучения с помощью дифракции рентгеновских лучей являются сложные белковые системы, ответственные за регуляцию и координацию всех процессов жизнедеятельности в клетке. Наша лаборатория биоорганической химии ферментов в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН занимается в течение ряда лет исследованием механизмов репарации поврежденной ДНК [1–10]. Хотелось бы отметить, что ИХБФМ СО РАН занимает ведущее место среди институтов РАН в исследовании репарации ДНК.

ДНК является основным носителем генетической информации в клетке. Механизмы, осуществляющие сохранность ДНК, обеспечивают стабильность клеточного генома. ДНК состоит из двух цепей (рис. 1), взаимодействие между которыми обеспечивается комплементарным взаимодействием пар оснований. Последовательность ДНК строго детерминирована. Генетическая информация, заложенная в этой молекуле, передается из поколения в поколение в процессе репликации обеих нитей ДНК. Для того чтобы информация была скопирована точно, ДНК-матрица не должна быть повреждена. В тоже время, жизнь устроена таким образом, что различные агенты из окружающей среды, а также агенты эндогенного происхождения, возникающие в процессах метаболизма, постоянно повреждают ДНК. К повреждающим воздействиям относятся ионизирующее и ультрафиолетовое облучение. Повреждения ДНК могут быть вызваны антропогенными загрязнениями, такими как продукты сгорания бензина и табакокурения. Все эти воздействия вызывают модификации либо оснований ДНК, либо ее сахарофосфатного остова и нарушают целостность структуры.

В процессе эволюции возникло несколько изоэнтальных систем, которые способны исправить большинство изменений в генетических текстах живых клеток. Как правило, эти системы представляют собой ансамбли, состоящие из десятка разных белков, и эти системы специализируются на восстановлении определенного типа повреждений ДНК. Повреждающие воздействия, приводящие к модификации структуры ДНК, и механизмы восстановления (репарации) структуры показаны на рис. 1. Один из механизмов, направленных на устранение повреждений, – это эксцизионная репарация оснований. Другой механизм – репарация нуклеотидов – удаляет объемные повреждения с ДНК, в том числе создаваемые УФ-светом. И, наконец, очень важные процессы репарации в самих разрывах ДНК – это гомологичная и негомологичная рекомбинация. Есть также процесс исправления ошибок, которые вводятся в процессах репликации ДНК. Несмотря на то, что человеческая клетка в день получает миллион повреждений в ДНК, это процесс, в каком-то смысле, естественный, потому что огромное число повреждений создаются в ДНК за счет оксидативного стресса, то есть за счет метаболических процессов, идущих внутри

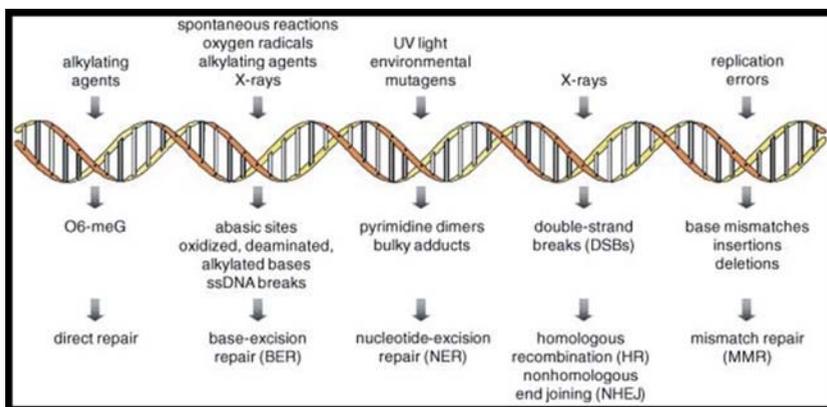


Рис. 1. Наиболее распространенные повреждения ДНК под воздействием разных агентов и механизмы их репарации.

организма. Если системы репарации повреждений в ДНК работают нормально, то ничего плохого не происходит. ДНК после исправления повреждений возвращает свою исходную структуру. Но наличие дефектов в системах репарации приводит к тяжелым болезням человека. К таким болезням, которые зависят непосредственно от интенсивности работы систем репарации, относятся раковые заболевания, современный «бич» человечества.

Говоря о важности исследований систем репарации, нельзя не отметить еще одну сторону этого вопроса. Все комплексные лекарства, которые создаются человечеством для лечения онкологических заболеваний, направлены на повреждение структуры ДНК. Это делается в ходе химиотерапии и радиотерапии с надеждой повредить ДНК в раковых клетках. В этом случае надо, напротив, ингибировать интенсивность работы систем репарации, потому что их эффективная работа восстанавливает дефекты в структуре ДНК даже при больших дозах облучения и химиотерапевтических агентов. В связи с этим создание ингибиторов систем репарации является одной из важнейших областей современной медицинской химии и молекулярной биологии. Эффективная разработка лекарств путем их рационального конструирования невозможна без знания детальной структурной организации систем репарации, и рентгеноструктурный анализ белковых компонентов этих систем и их сложных ансамблей чрезвычайно важен.

Надежная работа систем репарации эффективно исправляет повреждения ДНК, и все в организме сбалансировано. Плохая работа систем репарации, связанная с их дефектами, приводит к серьезным заболеваниям человека (рис. 2). В особенности дефекты систем реализуются в повышенной



Рис. 2. Заболевания человека, вызванные дефектами в системах репарации ДНК.

предрасположенности к онкогенным заболеваниям. Живая клетка имеет различные механизмы сохранения структуры ДНК и сопротивления повреждению, вносимым в эту молекулу организмом и окружающей средой. В том случае, когда повреждений в ДНК много, тормозится клеточный цикл в ожидании, чтобы прошла репарация. Если это не помогает, клетка подвергает себя самоубийству по механизму запрограммированной клеточной смерти. Так уничтожаются больные клетки, которые содержат значительные повреждения в ДНК, исправляемые уже с трудом. В том случае, когда мутация в ДНК закрепляется, это приводит к тяжелым болезням.

Мы занимаемся изучением в основном двух систем эксцизионной (от английского слова excision, выщепление) репарации: репарации оснований и нуклеотидов. Ввиду важности для медицины в изучении этих процессов исследуются системы репарации человека. Механизм эксцизионной репарации оснований (рис. 3) работает так, чтобы исправить повреждения, вносимые эндогенным стрессом, то есть окислительными процессами, происходящими в организмах. При этом повреждаются основания в ДНК, а нередко более интенсивный процесс приводит к разрыву цепей ДНК. Поврежденное основание удаляется специфическими ферментами – ДНК-гликозилазами. Эти ферменты опознают повреждение и выщепляют его. При этом в ДНК формируется сайт, лишенный кодирующего основания – апуриновый/апириимидиновый (AP-) сайт. Затем ДНК «разрезается» с 5'-стороны от AP-сайта специальным ферментом, который называется

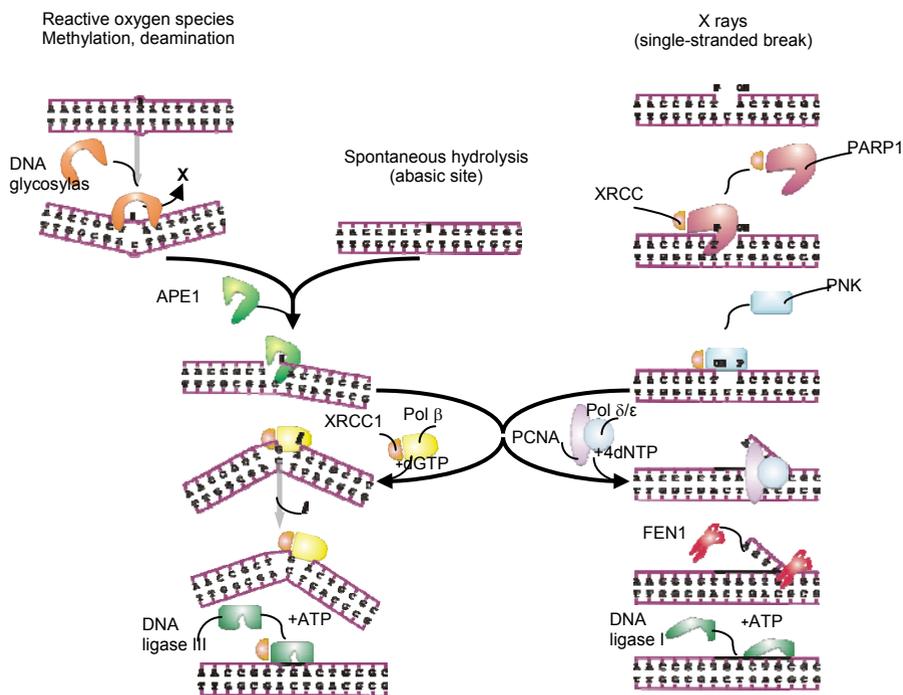


Рис. 3. Основные пути эксцизионной репарации поврежденных оснований ДНК.

апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1), и вместо поврежденного основания в разрыв вводится остаток неповрежденного нуклеотида. За эту функцию отвечает фермент, который называется ДНК-полимераза бета (Pol β). Являясь ключевой ДНК-полимеразой процесса репарации, этот фермент имеет дополнительную и очень важную активность – удаляет остаток дезоксирибозы с 5'-конца разрыва. После удаления дезоксирибозного остатка и последующего введения остатка дезоксинуклеозид-5'-монофосфата разрыв в ДНК «зашивается» с помощью ДНК лигазы III. В этой системе по исправлению повреждения координировано работает несколько белков. Остаток дезоксирибозы на 5'-конце разрыва, лишенный основания, тоже должен быть удален; если этого не происходит, то репарация идет по другому пути. При этом стимулируется достаточно протяженный синтез ДНК вдоль разрыва. Кусок ДНК из противоположной цепи удаляется ферментом флэпэндонуклеазой-1 (FEN1), и разрыв «зашивается». Интересно отметить, что этот механизм осуществляется другим набором белков. В целом, процесс репарации очень динамичный и сложный. Поврежденная ДНК передается от

одного белка к другому белку в процессе исправления повреждения как эстафетная палочка. Несмотря на то, что главная схема этого процесса известна, есть много вопросов, на которые нет ответа на сегодняшний день. Первый и ключевой вопрос – как осуществляется координация этого процесса, а также точность в замене поврежденного основания на новое. ДНК-полимераза бета делает ошибки. И, наконец, процесс, реконструированный в пробирке, не совпадает с природным процессом ни по точности, ни по эффективности. Следовательно, возможен поиск дополнительных факторов репарации, которые обеспечивают эффективность и пластичность работы этих машин на уровне клеток и целого организма. Мы имеем в лаборатории полный комплекс всех известных на настоящее время ферментов и белковых факторов и исследуем систему, реконструированную из отдельных белков. Структура большинства таких белков неизвестна; тем более, неизвестна структура белок-белковых комплексов и комплексов белков с ДНК. Поэтому данные в растворе должны дополняться данными рентгеноструктурного анализа. Это особенно важно для поиска активаторов и ингибиторов таких систем.

Рентгеноструктурный анализ осуществлен для ряда ДНК-гликозилаз, узнающих повреждения определенного типа, а также их комплексов с модельными структурами ДНК, содержащими повреждения (рис. 4). Один из главных установленных фактов состоит в том, что поврежденное основание выворачивается из структуры ДНК в процессе взаимодействия с такими ферментами и затем удаляется с помощью активности фермента.

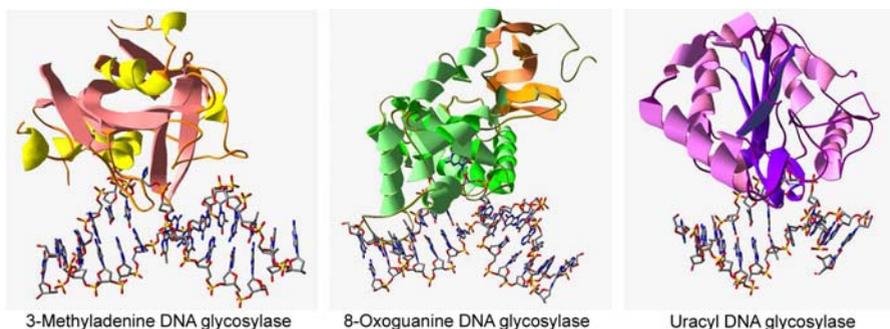


Рис. 4. Общий вид трехмерных структур комплексов ДНК-гликозилаз с модельными ДНК-субстратами по данным РСА [11–13].

Кристаллическая структура получена для следующего фермента в схеме путей эксцизионной репарации ДНК – АР-эндонуклеазы 1 (рис. 5). Этот фермент работает с чрезвычайно высокой каталитической эффективностью, поэтому закристаллизовать его комплекс с субстратом очень сложно. Расшифрована структура комплекса фермента только с продуктом реакции. Тем не менее, эта структура дает детальное представление о расположении и строении активного центра фермента.

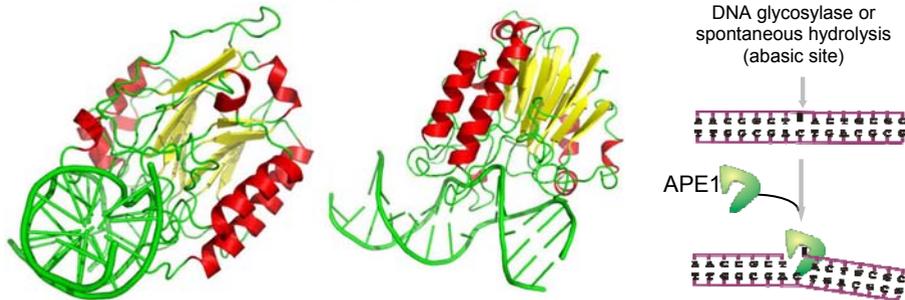


Рис. 5. Трехмерная структура комплекса АРЕ1 человека с продуктом катализируемой этим ферментом реакции. Показаны две проекции модели по данным работы [14]; справа – фрагмент схемы репарации ДНК с участием АРЕ1.

Наиболее детально с помощью РСА изучен механизм работы ДНК-полимеразы бета человека: установлена структура комплексов фермента с разными фрагментами ДНК в отсутствие и в присутствии низкомолекулярных субстратов – дезоксиинуклеозид-5'-трифосфатов. Структура одного из таких комплексов показана на рис. 6.

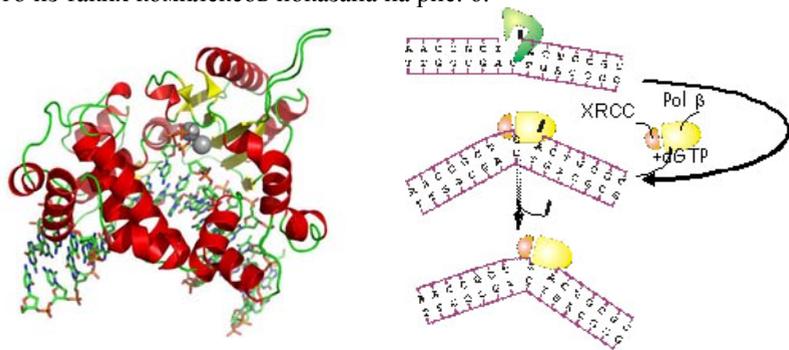


Рис. 6. Трехмерная структура по данным работы [15] комплекса ДНК-полимеразы бета человека с субстратами: дезоксицитидин-5'-трифосфатом и двуцепочечной ДНК, содержащей в одной из цепей однонуклеотидную брешь. Справа показан фрагмент схемы репарации ДНК с участием этого фермента (Pol β).

Механизм репарации ДНК осуществляется ансамблем белков, и действие отдельных белков по исправлению повреждений в ДНК строго координировано. Координация осуществляется за счет образования не слишком устойчивых временных комплексов на ДНК. Надо заметить, что эти комплексы очень специфические и формируются за счет белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий. Например, с центральным интермедиатом репарации возможно взаимодействие четырех белков (см. рис. 4). Среди них очень интересный белок, который считается одним из ключевых регуляторов репарации ДНК. Это поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1). Белок чувствует разрывы в ДНК и связывается с ними. Белок модифицирует активность ферментов репарации. Сам белок также является ферментом, который может катализировать реакцию синтеза отрицательно заряженного полимера – поли(АДФ-рибозы). Считается, что это помогает белку диссоциировать из комплекса с ДНК. PARP1 является центральной мишенью для разработки ингибиторов систем репарации в терапевтических целях. Дело в том, что ингибирование этого белка приводит к ингибированию некоторых механизмов репарации. Установлена с помощью РСА структура каталитического домена этого белка (рис. 9), и эти данные активно используются в работах по конструированию ингибиторов PARP1. Полноразмерный белок закристаллизовать пока не удалось.

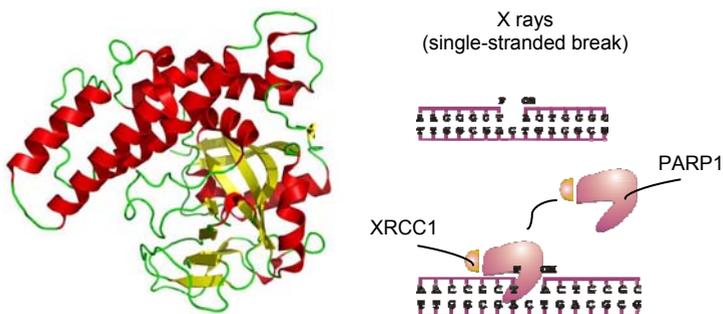


Рис. 9. Трехмерная структура каталитического домена PARP1 по данным РСА [18]. Справа показан фрагмент схемы репарации ДНК с участием этого фермента.

Сравнительно недавно был открыт дополнительный фактор репарации – белок XRCC1. Этот белок не обладает никакой каталитической активностью, но образует комплексы с ДНК-полимеразой бета и ДНК-лигазой III и является важным фактором репарации оснований и одностратчатых разрывов в ДНК. При открытии белка XRCC1 было обнаружено, что он защищает клетки от воздействия ионизирующей радиации. Было установлено, что этот белок улучшает комплексообразование ДНК-полимеразы бета с ДНК. На современном этапе изучения системы эксцизионной репарации оснований

представляет большой интерес исследовать временные комплексы белков репарации, которые формируются на повреждениях, то есть совокупные кристаллы нескольких белков-участников репарации на поврежденной ДНК. Эти комплексы должны быть высоко специфичными. Именно такие комплексы были исследованы с помощью РСА в работе, опубликованной недавно в высокорейтинговом журнале [19]. На основании этих данных достигнута некоторая ясность в том, как регулируется взаимодействие белка XRCC1 с ДНК-полимеразой бета. Закристаллизованы две формы концевой фрагмента XRCC1 в комплексе с каталитическим доменом ДНК-полимеразы бета, которые различаются наличием в одной из форм дисульфидного мостика между остатками цистеина (рис. 10). Оказалось, что образование дисульфидной связи приводит к значительным изменениям не только во вторичной и третичной структуре XRCC1, но и в распределении электростатического потенциала на поверхности белка. Такие изменения оказывают сильное влияние на формирование контактов XRCC1 как с ДНК-полимеразой бета, так и с ДНК. Это очень интересное открытие, которое может оказаться ключевым в понимании механизмов регуляции активности белков, ответственных за репарацию повреждений в ДНК, создаваемых окислительным стрессом.

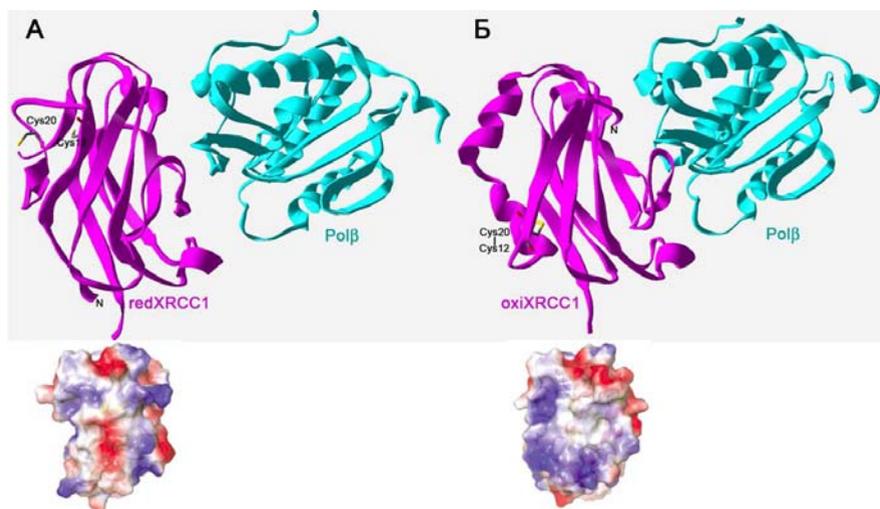


Рис. 10. Структура комплексов восстановленной (А) и окисленной (Б) форм фрагмента XRCC1 с ДНК-полимеразой β. Показаны остатки цистеина, ответственные за структурные перестройки разных форм XRCC1, и электростатический потенциал на поверхности соответствующих форм белка.

Не исключено, что система репарации оснований ДНК может оказаться не слишком доступной для рентгеноструктурных исследований белок-белковых комплексов в силу динамичности рассматриваемого процесса. Но у

нас в руках есть и другая система репарации, которая собирается в единый комплекс на ДНК вокруг повреждения. Это система репарации нуклеотидов, представленная схематично на рис. 11. В этом случае на ДНК собирается несколько белков в комплексы, структура которых изменяется по ходу процесса, но все-таки они какое-то время задерживаются на ДНК. Такие комплексы нужны, чтобы удалить объемное повреждение из ДНК, создаваемое УФ-светом или в результате воздействия экзогенного стресса (например, при присоединении окисленных остатков бензпирена). Не исключено, что эта система окажется более подходящей для решения структуры надмолекулярного комплекса репарации.

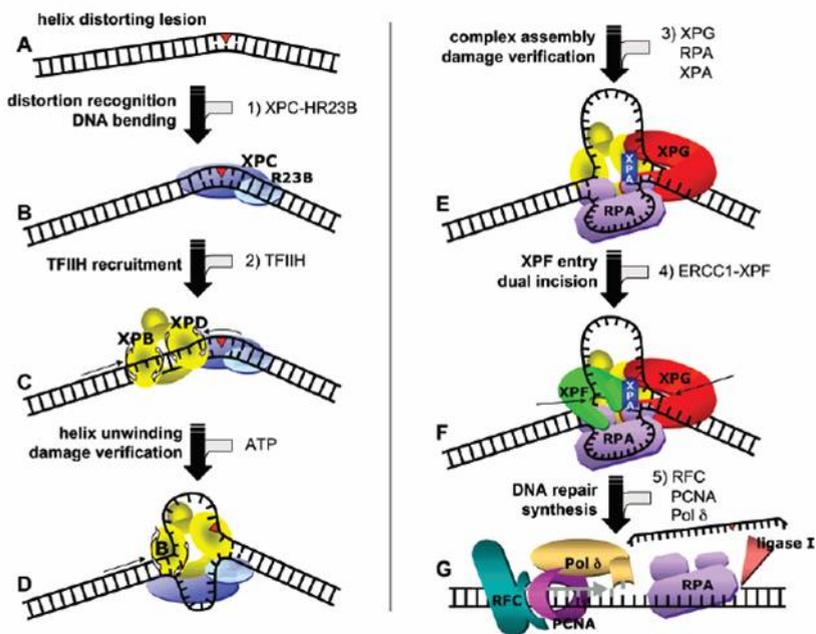


Рис. 11. Схема репарации поврежденных нуклеотидов ДНК [20]. Показаны основные стадии процесса и их белки-участники.

Наша лаборатория имеет опыт кристаллографических исследований других белков, состоящих из нескольких полипептидов. Такой пример – фенилаланил-тРНК-синтетаза, самый сложный белок из многочисленного семейства ключевых ферментов биосинтеза белка, обеспечивающих точность трансляции. Структура этого белка и его комплексов с тРНК и другими участниками реакции аминокислотирования (рис. 12) была решена в серии работ с участием нашей лаборатории в кооперации с Институтом Вейцмана [21–24].

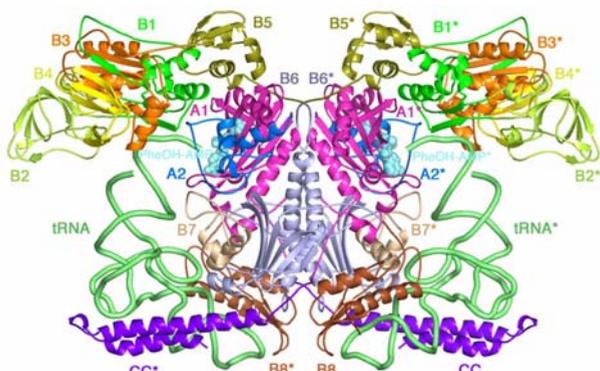


Рис. 12. Общий вид трехмерной структура комплекса фенилаланил-тРНК-синтетазы с тРНК и устойчивым аналогом первой стадии реакции аминокислотирования. Фермент состоит из четырех полипептидов, формирующих 22 структурных домена.

Поэтому не страшно усложнить научные задачи и сделать их современными и устремленными в будущее. В то же время следует заметить, что задача решения структуры динамического комплекса репарации гораздо более сложная, чем разрешение структуры рибосомы. Рибосома представляет собой изначально высокоорганизованный достаточно стабильный комплекс, сформированный большим набором молекул белков и РНК (рис. 13). В тоже время решение подобных задач демонстрирует современные возможности кристаллографии. Интересно заметить, что именно за решение структуры рибосомы получена Нобелевская премия по химии 2009 года.

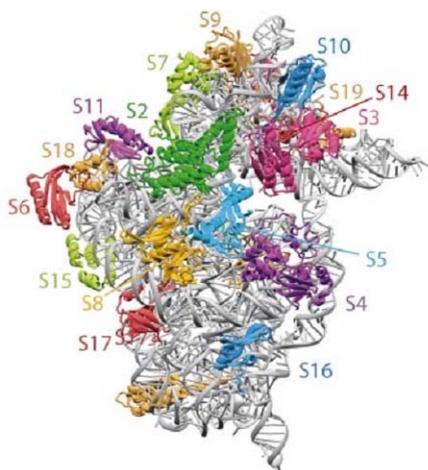


Рис. 13. Строение малой субчастицы рибосомы по данным РСА [25]. Полипептидные цепи рибосомных белков выделены разными цветами, полинуклеотидные цепи рРНК показаны серым цветом.

В заключение хотелось отметить, что действующая на базе ИЯФ станция для белковой кристаллографии, соответствующая международному уровню, безусловно, очень нужна. Есть много интересных и важных проектов, и есть условия и специалисты высокого класса для проведения кристаллографических исследований белков. Подготовкой таких специалистов мы занимаемся совместно с научно-образовательным центром НГУ по Молекулярному дизайну. Развитие структурных работ поддерживается Междисциплинарным интеграционным проектом СО РАН. Безусловно, для таких задач требуются иные масштабы финансовой и другой поддержки, но мы надеемся на такую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Lavrik O.I., Prasad R., Sobol R.W., Horton J.K., Ackerman E.J., Wilson S.H. // *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:25541–25548.
- [2] Pestryakov P.E., Weisshart K., Schlott B., Khodyreva S.N., Kremmer E., Grosse F., Lavrik O.I., Nasheuer H.P. // *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:17515–17524.
- [3] Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. // *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33:1222–1229.
- [4] Khodyreva S.N., Lavrik O.I. // *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12:641–655.
- [5] Nazarkina Z.K., Khodyreva S.N., Marsin S., Lavrik O.I., Radicella J.P. // *DNA Repair*, 2007, 6:254–264.
- [6] Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. // *DNA Repair*, 2007, 6:615–625.
- [7] Dickson A.M., Krasikova Y., Pestryakov P., Lavrik O., Wold M.S. // *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37:2313–2326.
- [8] Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. // *Mutat Res.*, 2010, 685:80–89. .
- [9] Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Petruseva I.O., Lavrik O.I. // *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38:8083–8094.
- [10] Khodyreva S.N., Prasad R., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107:22090–22095.
- [11] Lau A.Y., Scharer O.D., Samson L., Verdine G.L., Ellenberger T. // *Cell*, 1998, 95:249–258.
- [12] Bruner S.D., Norman D.P., Verdine G.L. // *Nature*, 2000, 403:859–866.
- [13] Parker J.B., Bianchet M.A., Krosky D.J., Friedman J.I., Amzel L.M., Stivers J.T. // *Nature*, 2007, 449:433–437.
- [14] Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. // *Nature*, 2000, 403:451–456.

- [15] Sawaya M.R., Prasad R., Wilson S.H., Kraut J., Pelletier H. // *Biochemistry*, 1997, 36:11205–11215.
- [16] Chapados B.R., Hosfield D.J., Han S., Qiu J., Yelent B., Shen B., Tainer J.A. // *Cell*, 2004, 116:39–50.
- [17] Pascal J.M., O'Brien P.J., Tomkinson A.E., Ellenberger T. // *Nature*, 2004, 432:473–478.
- [18] Iwashita A., Hattori K., Yamamoto H., Ishida J., Kido Y., Kamijo K., Murano K., Miyake H., Kinoshita T., Warizaya M., Ohkubo M., Matsuoka N., Mutoh S. // *FEBS Lett.*, 2005, 579:1389–1393.
- [19] Cuneo M.J., London R.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107:6805–6810.
- [20] Gillet L.C., Schärer O.D. // *Chem Rev.*, 2006, 106:253–276.
- [21] Goldgur Y., Mosyak L., Reshetnikova L., Ankilova V., Lavrik O., Khodyreva S., Safro M. // *Structure*, 1997, 5:59–68.
- [22] Fishman R., Ankilova V., Moor N., Safro M. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2001, 57:1534–1544.
- [23] Kotik-Kogan O., Moor N., Tworowski D., Safro M. // *Structure*, 2005, 13:1799–1807.
- [24] Moor N., Kotik-Kogan O., Tworowski D., Sukhanova M., Safro M. // *Biochemistry*, 2006, 45:10572–10583.
- [25] Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T.N., Cate J.H., Noller H.F. // *Science*, 2001, 292:883–896.

О.И. Лаврик, Н.А. Моор, Б.П. Толочко, Г.Н. Кулипанов

**Белки – участники процессов репарации ДНК
как важнейшие объекты
для рентгеноструктурных исследований**

O.I. Lavric, N.A. Moor, B.P.Tolochko, G.N. Kulipanov

**Proteins involved in DNA repair
as the most essential subjects of X-ray studies**

ИЯФ 2011-17

Ответственный за выпуск А.В. Васильев
Работа поступила 27.06. 2011 г.

Сдано в набор 29.06. 2011 г.

Подписано в печать 30.06. 2011 г.

Формат 60х90 1/16 Объем 1,0 печ.л., 0.8уч.-изд.л.

Тираж 90 экз. Бесплатно. Заказ № 17

Обработано на РС и отпечатано
на ротапинтере «ИЯФ им. Г.И. Будкера» СО РАН,
Новосибирск, 630090, пр. Академика Лаврентьева, 11