

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Савицкая Виктория Юрьевна

**Особенности взаимодействия белков систем эксцизионной репарации
ДНК с G-богатыми фрагментами регуляторных областей генома
эукариот и прокариот**

1.4.9. Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** – *Кубарева Елена Александровна,*
доктор химических наук, профессор
- Официальные оппоненты** – *Кузнецов Никита Александрович,*
доктор химических наук, член-корреспондент РАН,
заведующий лабораторией генетических технологий
Института химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук.
- Варижук Анна Михайловна,*
доктор химических наук, заведующая лабораторией
структуры и функций биополимеров Федерального
научно-клинического центра физико-химической
медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства.
- Костюшев Дмитрий Сергеевич,*
доктор биологических наук, заведующий кафедрой
биотехнологии Института фармации им. А.П.
Нелюбина Первого Московского государственного
медицинского университета имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской
Федерации.

Защита диссертации состоится «21» апреля 2026 г. в 16 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 40, ауд. 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: - <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3847>.

Автореферат разослан «__» марта 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Ю.Ю. Агапкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. GC-богатые участки ДНК характеризуются повышенной частотой мутаций в клетках различных организмов. Это обусловлено как химической лабильностью гуанина и цитозина, так и способностью таких последовательностей формировать неканонические вторичные структуры, в первую очередь G-квадруплексы (G4). Потенциальные G4-образующие последовательности (PQS) широко представлены в регуляторных областях геномов, однако их влияние на функционирование белков систем репарации изучено недостаточно.

У патогена *Neisseria gonorrhoeae* формирование G4 G-богатой регуляторной последовательностью, локализуемой перед промотором гена белка поверхностной мембраны *PilE*, необходимо для инициации антигенной вариации путем гомологичной рекомбинации (Prister L., et al. Biochemistry. 2020). Данный механизм используется патогеном для «ускользания» от иммунного ответа человека. У штаммов *N. gonorrhoeae* с нарушением функций ключевых белков из системы репарации некомплементарных пар нуклеотидов или «мисматчей» (MMR) наблюдается повышенная антигенная вариация *pilE* и, как следствие, более эффективная адгезия к эпителиальным клеткам (Criss A., et al. J. Bacteriol. 2010). Традиционно MMR отвечает за исправление ошибок репликации, приводящих к появлению «мисматчей». Ключевую роль в узнавании повреждений играет белок MutS. Сканируя ДНК, он выявляет структурные искажения, вызванные «мисматчем», и привлекает белок MutL, который вносит одноцепочечный разрыв в дочернюю цепь ДНК, что инициирует удаление поврежденного фрагмента (Монахова М., и др. Биоорганическая химия. 2020). Несмотря на актуальность тематики, механизмы участия белков MMR *N. gonorrhoeae* в регуляции процесса антигенной вариации *pilE* посредством G4, а также влияние GC-богатого состава ДНК на функционирование MutS и MutL, остаются невыясненными.

Одной из наиболее важных PQS-содержащих регуляторных областей генома человека является промотор гена обратной транскриптазы теломеразы (*hTERT*), экспрессия которого обеспечивает поддержание длины теломер в опухолевых клетках. Некодирующая (матричная) цепь промотора *hTERT* содержит 68-звенную G-богатую последовательность, способную *in vitro* формировать тандемную структуру, состоящую из трех параллельных G4 (Pavlova A., et al. Biomedicines. 2022). Соматические мутации в промоторе *hTERT*, представленные заменами G→A в позициях -124, -146 и -138/-139

относительно стартового кодона, широко распространены при различных типах рака и рассматриваются как «драйверные», поскольку приводят к повышению экспрессии *hTERT* (Gandolfi G., *et. al.* European Journal of Endocrinology. 2015). Склонность к окислению PQS-содержащих последовательностей способствует накоплению апурин/апиримидиновых участков (AP-сайтов), образующихся при гидролизе N-гликозидной связи между поврежденным основанием и дезоксирибозой в результате действия специфических ДНК-гликозилаз. За репарацию AP-сайтов отвечает апурин/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APE1) - ключевой фермент системы эксцизионной репарации оснований (BER) человека. Фермент узнает повреждение и вносит разрыв в углеводофосфатный остов с 5'-стороны от AP-сайта, создавая субстрат для последующих этапов репарации (Лаврик О., *et. al.* Биохимия. 2018). Однако остается неясным, может ли G4-структура или GC-богатая последовательность ДНК выступать в качестве фактора, ограничивающего узнавание и удаление AP-сайтов, и тем самым способствовать возникновению «драйверных» мутаций в промоторе *hTERT*.

Цель работы - биохимическая характеристика взаимодействия ключевых белков систем репарации MMR прокариот и BER человека с GC-богатыми последовательностями и образуемыми ими G-квадруплексными структурами *in vitro* на примере регуляторных областей генов *pilE* и *hTERT*.

Для достижения цели сформулированы следующие задачи:

1. установить влияние G-квадруплекса, потенциально формирующегося регуляторной G-богатой последовательностью перед геном *pilE*, на функционирование *in vitro* MutL *Neisseria gonorrhoeae*;
2. охарактеризовать способность белка MutS *Cereibacter sphaeroides* узнавать неканоническую пару нуклеотидов в GC-богатой (82%) последовательности ДНК;
3. выявить эволюционную консервативность G4-мотивов G-богатой области промотора генов обратной транскриптазы теломеразы (*TERT*) млекопитающих;
4. подтвердить формирование G-квадруплексной структуры *in vitro* в 68-звенном G-богатом участке промотора *TERT* человека и установить влияние стабильного аналога AP-сайта - остатка 1,2-дидезоксирибозы (F-сайта) в положениях, соответствующих «драйверным» мутациям, на стабильность G4;
5. охарактеризовать эффективность связывания и гидролиза ферментом APE1 человека модельных одно- и двуцепочечных фрагментов ДНК, содержащих 68-звенную

G-богатую последовательность промотора *hTERT* с одним или двумя аналогами AP-сайта, локализованными в положениях, соответствующих «драйверным» мутациям.

Научная новизна. Впервые показано, что белки из систем MMR и BER менее эффективно узнают и удаляют повреждения ДНК в GC-богатых последовательностях. Продемонстрирована высокая эффективность связывания эндонуклеазы MutL *N. gonorrhoeae* с G4, тогда как катализ гидролиза фосфодиэфирных связей этим ферментом реализуется до и после, но не внутри G-квадруплекса. Выявлено снижение эффективности узнавания «мисматча» в GC-богатом (82% GC-пар) окружении ДНК белком MutS из *C. sphaeroides*. Спектральными методами анализа подтверждено образование *in vitro* G4 параллельной топологии одноцепочечными модельными фрагментами, содержащими 68-звенную G-богатую последовательность промотора *hTERT* (G-цепь). Замены dG на F-сайт/ы в положениях, соответствующих «драйверным» мутациям, снижают термостабильность G4. В случае модельных ДНК-дуплексов F-сайт/ы в положениях -146 и -139/-139C-богатой кодирующей цепи (С-цепь) промотора *hTERT* способствуют частичной диссоциации ДНК-дуплексов с возможным образованием G4 G-цепью. Эндонуклеазная активность APE1 существенно снижается в условиях формирования G4.

Теоретическая значимость работы. Снижение эффективности дискриминации «мисматчей» белком MutS в GC-богатых последовательностях может рассматриваться как один из факторов, способствующих повышенной мутагенности таких участков генома. Изменение эндонуклеазной активности белка MutL (инициатора репарации «мисматчей») в районе G4-мотива при высокой эффективности связывания квадруплекса указывает на возможный механизм регуляции рекомбинационных процессов, лежащих в основе антигенной вариации *pilE*.

Обнаруженное влияние F-сайтов на стабильность G4, образованного модельными одноцепочечными ДНК, содержащими G-богатый фрагмент промотора *hTERT*, позволяет рассматривать AP-сайты как потенциальный фактор эпигенетической регуляции. Возникновение «драйверных» мутаций в последовательности промотора *hTERT* может быть результатом сниженной эндонуклеазной активности APE1 из системы BER в случае: (а) возникновения повреждения в положении -124 от стартового кодона в G-богатой цепи в условиях образования G4, (б) возникновения повреждений в положениях -146 и -138/-139 C-богатой цепи ДНК-дуплекса. Результаты подтверждают вклад

неканонических вторичных структур ДНК в процесс накопления соматических мутаций в регуляторных областях генома.

Практическая значимость работы. Результаты работы существенно расширяют представления о функционировании систем репарации ДНК - MMR и BER - в GC-богатых областях генома и могут быть полезны для поиска новых подходов к терапии различных заболеваний. Наши результаты стимулируют развитие стратегий, направленных на регуляцию активности ферментов из систем репарации ДНК.

Методология диссертационного исследования. Рекомбинантный белок MutL получен с использованием хроматографических методов очистки. АТФазную активность MutL определяли колориметрически. ДНК-связывающую активность белков MutS (включая способность к дискриминации G/T пары) и MutL исследовали методом электрофоретической подвижности в геле (EMSA); APE1 - с помощью интерферометрии биослоя. Эндонуклеазную активность MutL и APE1 анализировали путем электрофоретического разделения продуктов реакций в агарозном или полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. Структуру модельных олигонуклеотидов, соответствующих GC-богатым регуляторным последовательностям перед геном *pilE* и промотора *hTERT*, изучали с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД). Биоинформатический анализ выполняли с использованием баз данных геномов различных организмов.

Положения, выносимые на защиту

1. Белок MutL из системы MMR *Neisseria gonorrhoeae* эффективно связывает G-квадруплекс, но не вносит одноцепочечный разрыв внутри G4-мотива.
2. Белок MutS из системы MMR *Cereibacter sphaeroides* не способен эффективно узнавать неканоническую пару в GC-богатом окружении ДНК-дуплекса.
3. 68-звенный участок G-богатой матричной цепи промотора *hTERT* образует G-квадруплекс параллельной топологии *in vitro*, стабильность которого снижается при наличии одного или двух остатков 1,2-дидезоксирибозы (стабильного аналога AP-сайта) в положениях, соответствующих «драйверным» мутациям.
4. Фермент APE1 эффективно связывается с G-квадруплексной структурой G-богатого фрагмента промотора *hTERT*, содержащей остаток 1,2-дидезоксирибозы, однако эндонуклеазная активность белка снижена в условиях формирования G4.

Апробация работы и публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в российских и международных рецензируемых изданиях. Результаты исследований были представлены на 11 международных и всероссийских конференциях в виде устных и стендовых докладов. Работа была доложена на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ.

Личный вклад автора. Автором составлен план экспериментальной работы, собрана и обработана литература [2]. Лично получены препараты рекомбинантного белка MutL, проведена характеристика его активности. Спроектированы модельные ДНК различной длины с G4-мотивом перед *pilE*, исследованы их структура и взаимодействие с MutL [1,4]. Для оценки влияния GC-богатого окружения на узнавание «мисматча» белком MutS разработан подход к анализу кривых связывания с использованием трех различных моделей. Спроектированы модельные ДНК различной длины, содержащие 68-звенную GC-богатую последовательность промотора *hTERT* с остатками 1,2-дидезоксирибозы, локализованными в положениях, соответствующих «драйверным» мутациям. Спектральными методами анализа установлено влияние аналогов AP-сайта на термостабильность G4 в модельных ДНК. Охарактеризована эффективность связывания и гидролиза ферментом APE1 человека одно- и двуцепочечных фрагментов ДНК с одним или двумя аналогами AP-сайта [3,6]. Проведен биоинформатический анализ баз данных для оценки консервативности G4-мотивов в промоторе *TERT* млекопитающих [5]. Вклад Савицкой В.Ю. в большинстве опубликованных работ является определяющим.

Структура и объем диссертационной работы. Текст диссертации состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы, который включает 214 источников. Объем диссертации 127 страниц, материал содержит 46 рисунков и 13 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Новые аспекты функционирования системы MMR прокариот. Рекомбинантный белок MutL *N. gonorrhoeae* (ngMutL), содержащий 6 остатков His на N-конце, был экспрессирован в клетках *E. coli* BL21(DE3) с использованием плазмидной конструкции на основе pET15b и выделен методом аффинной хроматографии на Ni-NTA с последующей очисткой методом эксклюзионной хроматографии. Свойства полученного препарата ngMutL охарактеризовали по его АТФазной активности (значение

константы Михаэлиса-Ментен = 377 ± 16 мкМ) [1], ДНК-связывающей активности (кажущаяся константа диссоциации комплексов белка с 76-звенным ДНК-дуплексом = 117 ± 7 нМ) [2] и эндонуклеазной активности, проявляющейся во внесении одноцепочечного разрыва в плазмидную ДНК, что соответствует функции ngMutL как «никующей» эндонуклеазы MMR. Полученные количественные характеристики подтверждают функциональную полноценность препарата и возможность его использования в дальнейших исследованиях.

Гидролиз линейного ДНК-субстрата белком MutL N. gonorrhoeae.

Эндонуклеазная активность MutL реализуется каталитическим центром в С-концевом домене (CTD) белка, удаленным от N-концевой ДНК-связывающей области. Для внесения одноцепочечного разрыва в линейный субстрат необходимо сближение каталитического центра белка с ДНК, что реализуется через взаимодействие CTD-MutL с β -субъединицей ДНК-полимеразы III (β) в ходе пострепликативной MMR. Консервативный мотив QHLLIP в CTD-ngMutL, выявленный нами путем сравнительного анализа аминокислотных последовательностей прокариотических гомологов, предположительно, обеспечивает связывание с ng β (Pillon M., *et. al.* Nucleic Acids Res. 2015). С помощью метода молекулярного докинга и динамики мы смоделировали комплекс CTD-ngMutL с ng β и подтвердили участие QHLLIP в формировании контактов с β -субъединицей (Рис. 1).

(А)

<i>Bacillus subtilis</i>	483	VEP-EVQEMIVPLTF
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	555	VSD-DIQELLVPFVL
<i>Cereibacter sphaeroides</i>	472	TGI-ARQALLIPEIV
<i>Neisseria meningitidis</i>	490	QGHLSQSLLIPTVF
<i>Neisseria lactamica</i>	513	NGRLQSQRLLIPSTF
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	513	NGNLQSQHLLIPVTF

(Б)

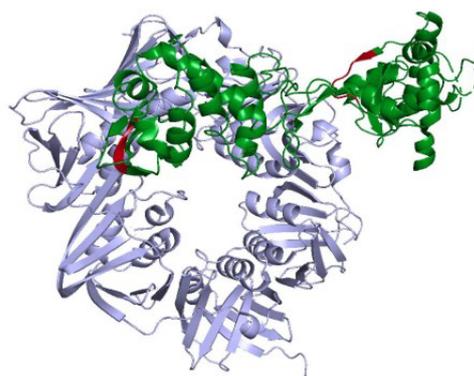


Рисунок 1. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей гомологов MutL из разных организмов (консервативный мотив QXXI/LXP показан красным). (Б) Комплекс CTD-ngMutL с ng β , смоделированный методом молекулярного докинга с помощью пакета программ Schrodinger. В качестве моделей были выбраны *swiss model* ng β (Q5FAJ1, сиреневый) и структура CTD-MutL *N. gonorrhoeae* (PDB: 3NCV, зеленый). Мотив QHLLIP окрашен красным.

Полученные нами данные подтверждены недавно опубликованной кристаллической структурой комплекса CTD-MutL- β (PDB ID 8XLA. Nirwal, *et al.*, 2025). Взаимодействие

CTD-ngMutL с ng β осуществляется по схеме «мономер к мономеру» через консервативный мотив QHLLIP, идентифицированный нами при сравнительном анализе последовательностей.

Для оценки эндонуклеазной активности ngMutL использовали линейный 3'-ТАМРА-меченный 76-звенный ДНК-дуплекс. Внесение разрыва в ДНК происходило только в присутствии эквимольного количества ng β , двухвалентных катионов Mg²⁺ и Mn²⁺. Эффективность гидролиза повышалась при добавлении АТФ в диапазоне концентраций до 2 мМ. Стимулирующий эффект АТФ, по-видимому, связан с АТФ-зависимой димеризацией N-концевых доменов ngMutL, что облегчает правильное позиционирование белка в комплексе с ДНК (Ban C., *et. al.* Cell. 1998). Присутствие ионов Ca²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ или Zn²⁺ не активировало эндонуклеазную активность ngMutL (Рис. 2), что согласуется с данными о строгой специфичности каталитического центра CTD к ионам магния и марганца (Dupratla V., *et. al.* Biochemical Journal. 2009). В наиболее оптимальных условиях (0,5 мМ АТФ, 5 мМ MgCl₂, 5 мМ MnCl₂, соотношение белок:ДНК 25:1) наблюдали неспецифичное внесение разрывов в 76-звенный ДНК-дуплекс с эффективностью 50%, что соответствует ожидаемому поведению MutL *in vitro* в отсутствие факторов, обеспечивающих направленный ферментативный гидролиз ДНК [4].

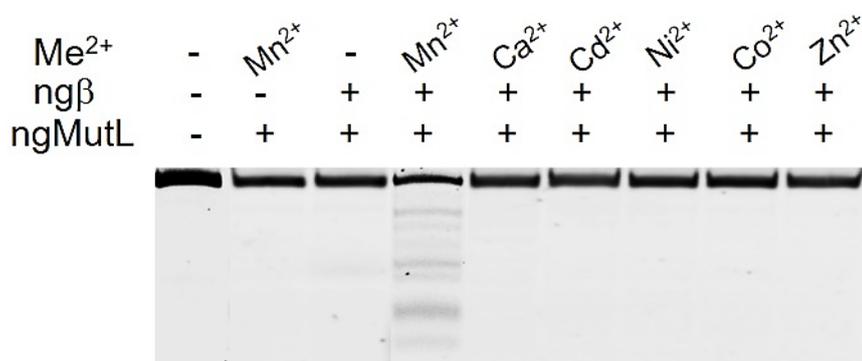


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов расщепления ДНК-дуплекса длиной 76 пар нуклеотидов (п.н., 10 нМ) белком ngMutL (250 нМ) в присутствии ng β (250 нМ) в 20 мМ буфере HEPES (pH 8,0), содержащем 100 мМ KCl, 0,5 мг/мл БСА и 1 мМ ДТТ, 0,5 мМ АТФ и 5 мМ Mg²⁺, а также ионов различных двухвалентных металлов (5 мМ) в течение 90 мин при 37 °С. Продукты реакции анализировали в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях.

Таким образом, впервые показано, что ngMutL способен гидролизовать линейные ДНК-субстраты, но эта активность строго зависит от присутствия β -субъединицы ДНК-полимеразы III и типа иона металла.

Взаимодействие белка MutL *N. gonorrhoeae* с G4-мотивом регуляторной последовательности перед геном *pilE*. Интересующая нас 17-звенная G-богатая одноцепочечная последовательность 5'-AGGGTGGGTGGGTGGGGA-3', способная формировать квадруплекс, локализована примерно на расстоянии 350 п.н. с 3'-конца от гена *pilE N. gonorrhoeae*. G4-мотив представлен четырьмя G-трактами, разделенными короткими вставками Т [2]. На основе этой последовательности были сконструированы и синтезированы модельные олигонуклеотиды длиной 19, 41 и 95 нуклеотидных остатков (н.о.) с флуоресцентной меткой TAMRA на 3'-конце, различающиеся протяженностью фланкирующих областей (Рис. 3 А).

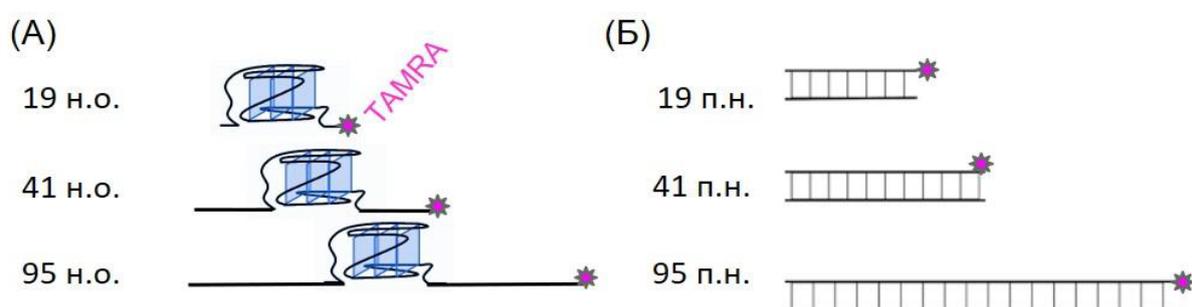


Рисунок 3. Структура и обозначения модельных ДНК, содержащих G4-мотив регуляторного участка *pilE*. (А) Одноцепочечные ДНК. (Б) Двухцепочечные ДНК.

Контрольные образцы представляли собой двухцепочечные аналоги тех же последовательностей, образованные при добавлении комплементарной цепи ДНК соответствующей длины, а также ДНК различной длины без G4-мотива (Рис. 3 Б).

Структурные особенности модельных ДНК охарактеризованы методом КД. Для всех G4-содержащих последовательностей в присутствии ионов K^+ наблюдался характерный спектр с положительным максимумом в области 260–265 нм и отрицательным - в области 240–245 нм, что соответствует параллельной топологии G4. Для контрольных дуплексных ДНК спектры имели вид, характерный для В-формы (положительный максимум ~275 нм, отрицательный ~245 нм).

Комплексообразование *ngMutL* с модельными олигонуклеотидами, содержащими и несодержащими G4. Установлено, что *ngMutL* в 3-5 раз более эффективно образует комплексы с G4-содержащими субстратами по сравнению с ДНК-дуплексами (Рис. 4), причем эффект сохраняется при увеличении фланкирующих областей. Для 19-звенного G4-содержащего олигонуклеотида при 25-кратном избытке *ngMutL* наблюдалось образование комплекса (~30%), но достоверно K_d^{app} рассчитать не

удалось. Комплексообразование ngMutL с 19-звенным дуплексом отсутствовало. Это свидетельствует о том, что G4-структура сама по себе является более предпочтительной мишенью для связывания ngMutL.

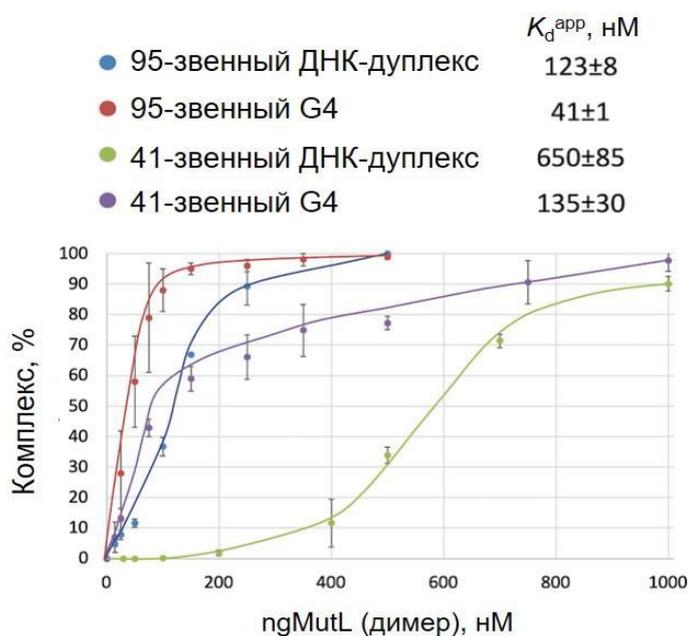


Рисунок 4. Зависимость эффективности образования комплекса ngMutL с модельными одно- и двуцепочечными ДНК (20 нМ) от концентрации белка. Реакционные смеси инкубировали в 20 мМ буфере HEPES (pH 8,0), содержащем 100 мМ KCl, 0,5 мг/мл БСА и 1 мМ ДТТ, в течение 10 мин при +4 °С. Погрешности соответствуют 95%-ным доверительным интервалам (n = 3). Сверху представлены значения кажущихся констант диссоциации (K_d^{app}) комплексов ngMutL с ДНК.

Гидролиз эндонуклеазой ngMutL ДНК-фрагментов, содержащих G4-мотив.

Далее была оценена способность ngMutL расщеплять модельную дуплексную ДНК, содержащую одиночный G4-мотив d(GGGT)₄ (Рис. 5, конструкция 95G4/76M), стабилизированный за счет отсутствия комплементарного G4-мотиву участка в противоположной цепи. Для сравнения использовался 76-звенный дуплекс с произвольной последовательностью (76R/76M). Гидролиз оценивался по накоплению укороченных 3'-TAMRA-меченных продуктов, разделенных в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Результаты показали, что дуплекс 76R/76M гидролизуется эффективно и неспецифично, что выразилось в появлении набора фрагментов различной длины (дорожка 2, рис. 5). Степень расщепления 95G4/76M со стабилизированным G-квадруплексом была существенно ниже. При этом расщепление происходило только до и после участка, содержащего G4, но не внутри него (дорожка 4, рис. 5). Даже при высоких концентрациях фермента и в присутствии всех необходимых кофакторов, ngMutL не расщепляет G4-структуру [4].

Таким образом, мы показали, что ngMutL обладает высоким сродством к G4, однако не проявляет способности к их гидролизу. Можно предположить, что взаимодействие MutL *N. gonorrhoeae* с G4-мотивом выполняет регуляторную функцию, потенциально

блокируя доступ других белков, участвующих в инициации рекомбинации *pilE/pilS*, лежащей в основе уклонения патогена от иммунного ответа человека.

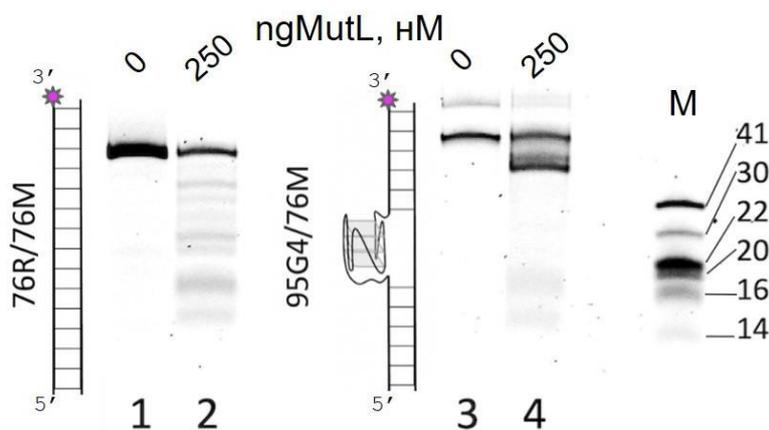


Рисунок 5. Электрофореграммы продуктов расщепления модельных ДНК (10 нМ) белком ngMutL (250 нМ) в присутствии ngβ (250 нМ), 0,5 мМ АТФ, 5 мМ Mn^{2+} и 5 мМ Mg^{2+} в течение 90 мин при 37 °С. Дорожки 1–2 – результат гидролиза 76R/76M, дорожки 3–4 – 95G4/76M. Длины ДНК-маркеров М (в н. о.) указаны справа.

Эффективность узнавания неканонической пары внутри GC-богатой последовательности при репарации «мисматчей» у прокариот. Несмотря на регуляторные функции G4 эта структура может существовать в клетке ограниченное время в процессах, связанных с расхождением цепей ДНК. В остальном G4-мотивы входят в двуцепочечную ДНК и представляют собой G-богатые участки, которые обладают высоким мутагенным потенциалом. В ходе спонтанного дезаминирования цитозина и 5-метилцитозина образуются некомплементарные пары U/G и T/G, за узнавание которых отвечает белок MutS в ходе MMR. В отсутствие репарации они могут приводить к появлению мутаций в следующем раунде репликации. Влияние GC-богатого состава ДНК-дуплекса на способность белка MutS узнавать «мисматч» ранее не изучалось.

В качестве объекта исследования был выбран гомолог MutS из *C. sphaeroides* (штамм 2.4.1, csMutS). Данный организм характеризуется высоким содержанием GC-пар генома (~69%), что делает его ДНК-узнающие белки эволюционно адаптированными к функционированию в GC-богатом окружении. Препарат рекомбинантного белка csMutS был предоставлен к.х.н. Монаховой М.В. (НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ). В эксперименте использовали 96-звенные ДНК-дуплексы с GC-составом 53% и 82%, соответственно, содержащие или не содержащие в центральной позиции «мисматч» G/T. Выбор длины дуплекса обусловлен тем, что такая протяжённость достаточна для формирования полноценного комплекса MutS с ДНК (Jayaraj A., *et. al.* Biophysical Journal. 2023).

Комплексообразование csMutS с модельными ДНК-дуплексами разного GC-состава изучали в присутствии 5 мМ MgCl₂ и 100 мМ KCl в течение 15 мин при 37 °С. В реакции использовали 1 мМ негидролизующий аналог АТФ (аденозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат, АТФγS) для предотвращения изменения конформации белка и, как следствие, его диссоциации с ДНК после связывания. Формирование ДНК-белковых комплексов детектировали методом EMSA в 6%-ном ПААГ. Анализ зависимости комплексообразования от концентрации csMutS проводили тремя моделями, позволяющими охарактеризовать взаимодействие K_d^{app} (табл. 1), Выбор наиболее адекватной модели осуществляли по коэффициенту детерминации ($R^2 > 0,99$).

Таблица 1. Значения кажущихся констант диссоциации комплексов csMutS с модельными ДНК.

Содержание GC-пар в ДНК-дуплексе	Наличие «мисматча»	K_d^{app} , нМ	Модель связывания белок-лиганд
53%	+	39±5 118±14	Связывание с двумя участками в ДНК
	-	349±46	Связывание с одним участком в ДНК
82%	+	72±9	Связывание по Хиллу (n=1,88±0,27)
	-	88±11	Связывание по Хиллу (n=1,76±0,14)

Полученные результаты демонстрируют, что характер взаимодействия csMutS с ДНК определяется не только наличием «мисматча», но и нуклеотидным окружением. При содержании GC-пар 53% реализуется классический механизм функционирования csMutS: белок эффективно дискриминирует ДНК с «мисматчем» ($K_d^{app} \sim 39$ нМ), тогда как каноническая ДНК связывается белком существенно хуже ($K_d^{app} \sim 350$ нМ). При содержании GC-пар 82% значения K_d^{app} для ДНК с «мисматчем» и без него статистически не различаются (72±9 и 88±11 нМ, соответственно). Это указывает на то, что высокий GC-состав снижает эффективность узнавания «мисматча» белком csMutS. Полученные результаты согласуются с современной моделью непрямого узнавания, согласно которой MutS сканирует ДНК, проверяя ее способность к изгибу в районе некоплементарной пары на протяжении двух витков спирали (Jayaraj A., *et. al.* Biophysical Journal. 2023). По-видимому, высокая «жесткость» GC-богатой ДНК не позволяет MutS дискриминировать «мисматч».

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что G4-структуры и

GC-богатое окружение способны модулировать функционирование ключевых белков системы MMR – MutS и MutL. В случае *N. gonorrhoeae* изменение функционирования MutL в G4 может быть одним из механизмов регуляции антигенной вариации. Снижение эффективности узнавания повреждений MutS в GC-богатых участках, выявленное для белка *C. sphaeroides* - организма с высоким GC-составом генома, позволяет предположить, что данное ограничение носит фундаментальный характер и может быть универсальным для GC-богатых регионов геномов различных организмов. Учитывая высокую консервативность аминокислотной последовательности и структуры гомологов MutS, можно предположить, что GC-богатый состав ДНК может снижать эффективность репарации «мисматчей» в целом.

2. Влияние GC-богатой последовательности на эффективность эксцизионной репарации эукариот

С применением биоинформатических методов проведен анализ потенциальных G4-мотивов в промоторных областях гена *TERT* у 141 вида млекопитающих из 20 отрядов (база NCBI Orthologs). Поиск G4 осуществляли по шаблону $G_3N_{1-30}G_3N_{1-30}G_3N_{1-30}G_3$ с помощью сервера QGRS Mapper. Установлено, что некодирующая цепь промотора *TERT* обогащена PQS значительно, чем кодирующая, особенно около точки инициации транскрипции (Рис. 6).

Количество консервативных G4-мотивов

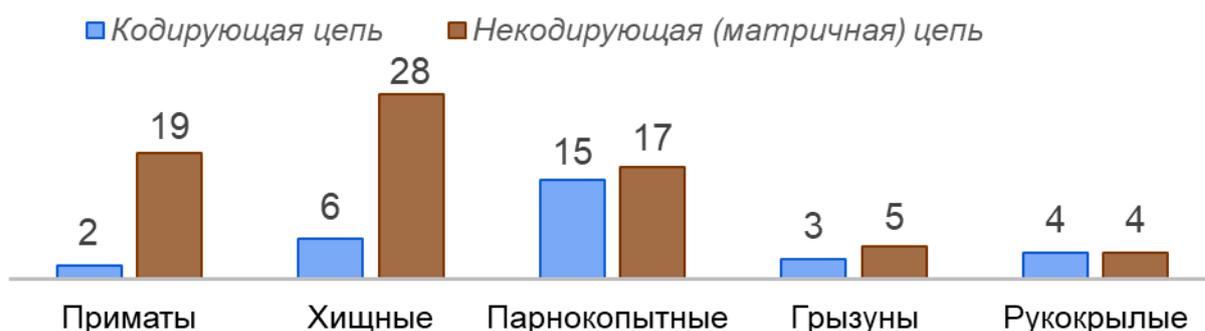


Рисунок 6. Число консервативных G4-мотивов в кодирующих (синие столбцы) и некодирующих, матричных (коричневые столбцы) цепях промоторных областей *TERT* в зависимости от типа отряда млекопитающих.

Суммарное количество G4-мотивов промотора *TERT* минимально в геномах грызунов и рукокрылых, а максимально – у хищных, парнокопытных и приматов, в том числе человека. Несмотря на вариабельность частоты распределения по цепям ДНК и длины PQS среди отрядов млекопитающих, выявлена эволюционная консервативность

G4 в промоторе *TERT*, что подтверждает функциональную значимость этих структур [5]. К числу таких консервативных элементов относится исследуемая в работе 68-звенная GC-богатая последовательность промотора *hTERT* с двенадцатью последовательными G-трактами в некодирующей цепи (Рис. 7). Мутации в этой последовательности в позициях -124, -146 и -138/-139 от стартового кодона являются онкологически значимыми (Huang F., *et. al.* Science. 2013).

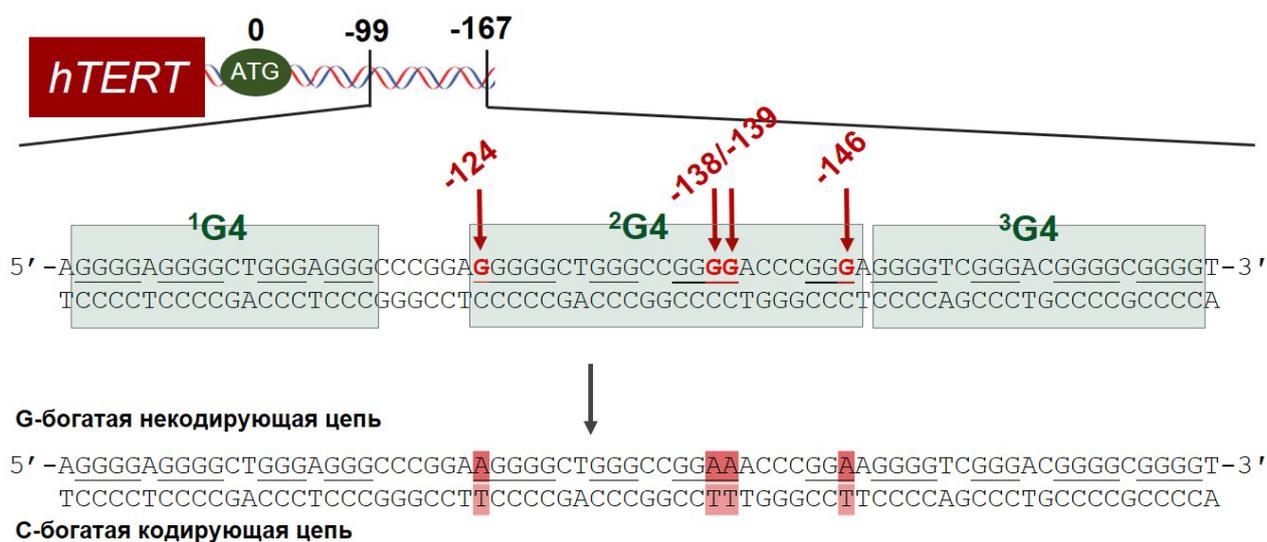


Рисунок 7. Специфические для опухолевых клеток «драйверные» мутации в первичной структуре промотора *hTERT*.

Для изучения функционирования эндонуклеазы APE1 человека из системы BER в области PQS были сконструированы одноцепочечные 96-нуклеотидные фрагменты некодирующей цепи промотора *hTERT*, содержащие 68-звенную G-богатую последовательность и фланкирующие 14-звенные области (Рис. 8 А), а также замены G→F в соответствующих «драйверным» мутациям положениях. Остаток 2-оксиметил-3-окситетрагидрофурана или 1,2-дидезоксирибозы (F) химически стабилен, имитирует отсутствие основания в ДНК (AP-сайт), но не подвергается спонтанному гидролизу и часто используется в модельных системах для изучения BER (Kroeger K. Nucleic Acids Research. 2004). В качестве контролей использовали одноцепочечный 96-звенный фрагмент промотора *hTERT* без модификации, аналогичные 96-звенные ДНК-дуплексы (Рис. 8 Б) и 96-звенную ДНК произвольной последовательности без G4-мотива, но с заменой G→F.

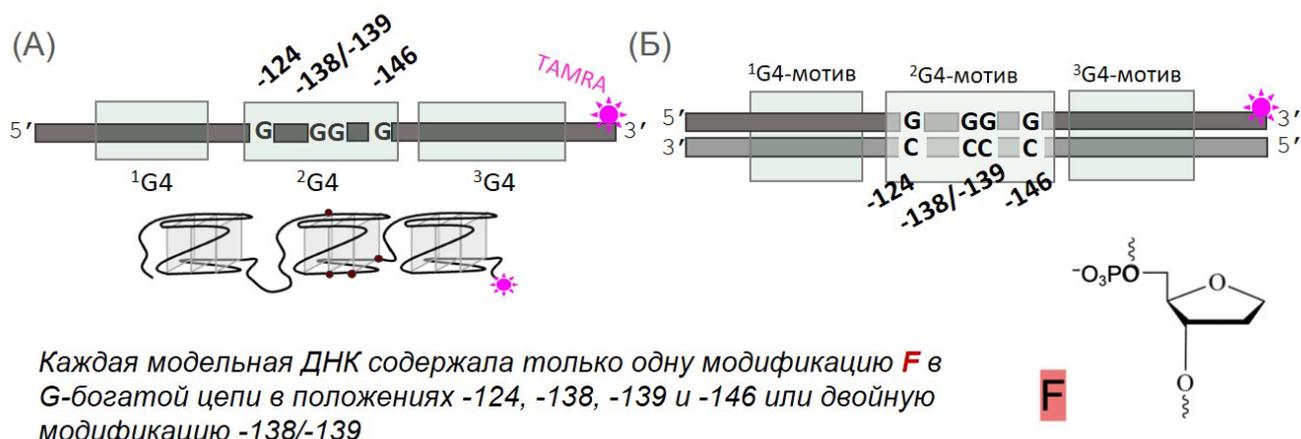


Рисунок 8. Модельные ДНК, содержащие фрагмент GC-богатой последовательности промотора *hTERT* с заменой/ами G→F в положениях, соответствующих «драйверным» (напротив F расположен dC). (A) Одноцепочечные ДНК. (B) Двухцепочечные ДНК.

Влияние F-сайтов в G-богатой цепи на структуру модельных ДНК было изучено методом КД. Одноцепочечный 96-звенный фрагмент промотора *hTERT* без модификаций формирует параллельный G4 (максимум на спектре КД при 265 нм) [3]. Замены G→F в G4-мотиве, вероятно, индуцируют переход к структурам антипараллельной или гибридной топологии (положительное плечо >280 нм) для большинства модифицированных олигонуклеотидов, кроме ДНК-фрагмента с -138/-139FF, сохраняющего параллельную структуру (Рис. 9 А).

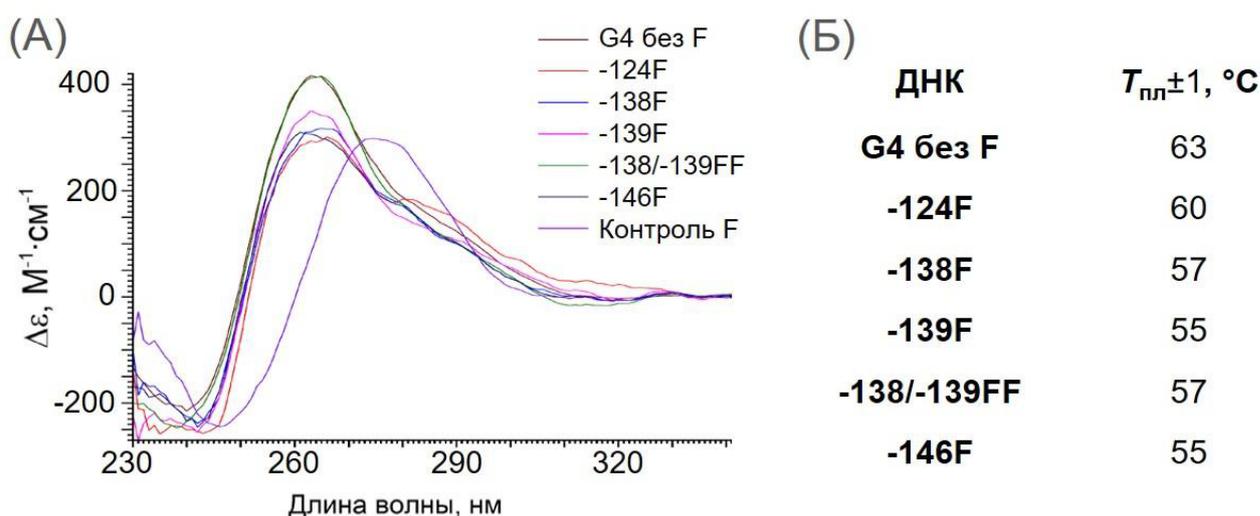


Рисунок 9. Влияние F-сайтов в составе 96-звенных одноцепочечных G-богатых модельных олигонуклеотидов на топологию и термическую стабильность G4 промотора *hTERT*. (A) Спектры КД при 30 °C в 20 мМ буфере 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА и 100 мМ КСl. (B) Значения $T_{пл}$, определенные для G-квадруплексных структур соответствующих модельных фрагментов.

Значения $T_{пл}$, характеризующие влияние замен G→F на термостабильность G4, для одноцепочечных модельных ДНК определяли из данных температурных зависимостей молярной эллиптичности при 265 нм. Все модифицированные аналоги демонстрировали снижение $T_{пл}$ на 3–8 °С по сравнению с немодифицированным (Рис. 9 Б). ДНК-дуплексы, состоящие из 96-звенных олигонуклеотидов и комплементарных им цепей, имеют спектр, характерный для В-формы ДНК (максимум при 280 нм), независимо от наличия и положения замен G→F [6]. Таким образом, замены G→F в G-богатой цепи одноцепочечного фрагмента промотора *hTERT* снижают стабильность G4, но не разрушают его полностью, тогда как те же замены в составе ДНК-дуплексов не оказывают влияния на структуру ДНК.

Связывание APE1 человека с ДНК исследовали методом интерферометрии биомолекулярного слоя (BLI). Препарат рекомбинантного фермента с 6 остатками His на N-конце был любезно предоставлен академиком Д.О. Жарковым (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск). APE1 иммобилизовали на Ni-NTA-сенсоре, после чего регистрировали ассоциацию (300 с) и диссоциацию (600 с) с модельными ДНК. Данные анализировали с использованием модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения BLItz Pro 1.3.0.5 software (ForteBio), аппроксимируя кривые ассоциации и диссоциации для расчета значений констант диссоциации (K_d , рис. 10 А).

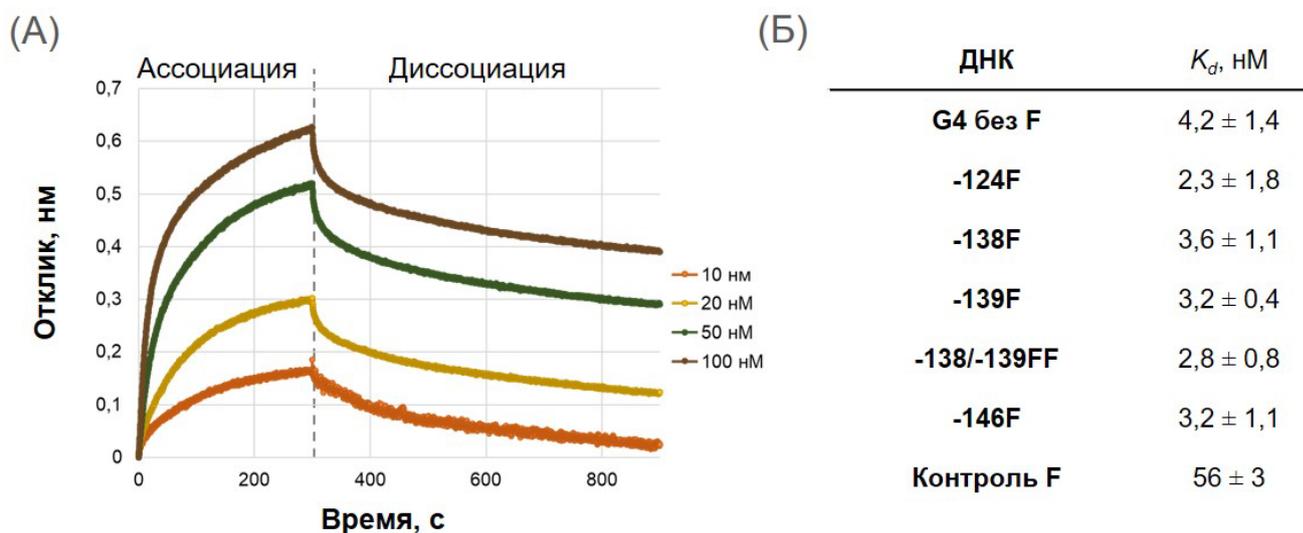


Рисунок 10. Связывание фермента APE1 (3,5 мкМ) с одноцепочечными 96-звенными фрагментами промотора *hTERT*, содержащими и не содержащими G4 и замену/ы G→F. Реакционные смеси содержали 20 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ КСl, 1 мМ ДТТ и 0,5 мг/мл БСА (А) Пример кривых ассоциации-диссоциации белково-нуклеинового комплекса, полученные методом измерения интерференции биослоя при различной концентрации ДНК (от 10 нМ до 100 нМ). (Б) K_d комплексов APE1-ДНК.

Независимо от наличия и положения остатка F значения K_d комплексов APE1 с одноцепочечными 96-нуклеотидными фрагментами некодирующей цепи промотора *hTERT* в условиях образования G4 составляли около 3 нМ, что говорит об эффективном связывании фермента с лигандом. Средство APE1 к контрольному олигонуклеотиду без G4-мотива было на порядок ниже (Рис. 10 Б) [6].

Гидролиз ферментом APE1 одноцепочечных 96-звенных олигонуклеотидов, содержащих G4-мотив промотора *hTERT* с заменами G→F, изучали в условиях, указанных в подписи к рисунку 8. Продукты реакции анализировали в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (Рис. 11 А). Несмотря на эффективное связывание APE1 с G4-содержащими субстратами, наблюдалось ингибирование гидролиза этих ДНК-фрагментов эндонуклеазой по сравнению с гидролизом контрольного олигонуклеотида произвольной последовательности с F, но без G4. Выход продуктов реакции после 60 мин инкубации зависел от положения модификации, а наибольшее (десятикратное) снижение эффективности гидролиза наблюдалось для субстрата с заменой G→F в позиции -124 (~12%). В отличие от одноцепочечных моделей, при использовании двуцепочечных ДНК, содержащих те же замены, эффективность расщепления APE1 достигала 85–100% и статистически значимо не зависела от положения модификации (Рис. 11 Б) [6].

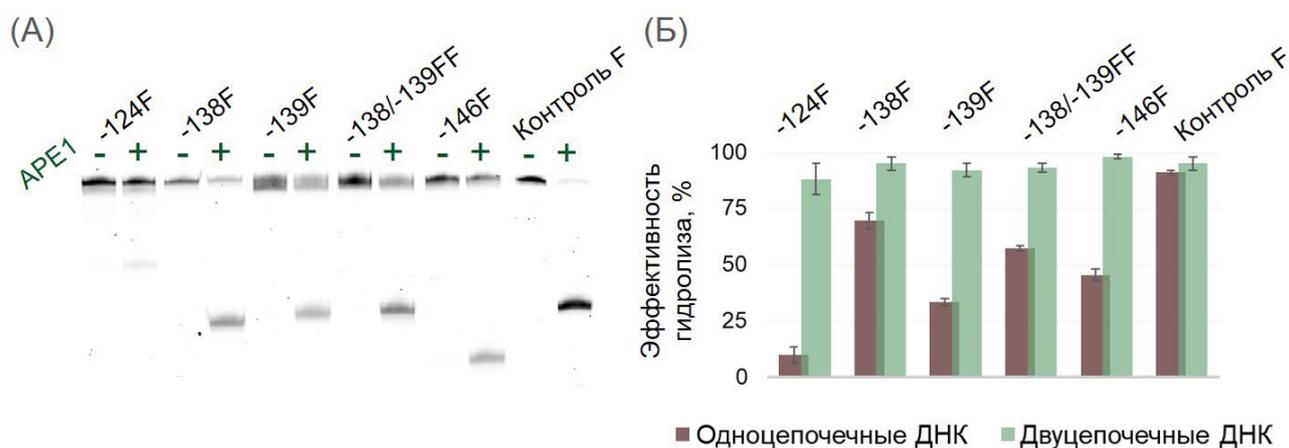


Рисунок 11. Гидролиз 96-звенных фрагментов промотора *hTERT* (100 нМ), содержащих и не содержащих G4 и замену/ы G→F, катализируемый APE1, в 20 мМ буфере Трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 0,5 мг/мл БСА и 10 е.а. (36 нМ) фермента. Реакции проводили при 37 °С в течение 60 мин и останавливали прогреванием при 60 °С в течение 20 мин. (А) Электрофореграмма продуктов расщепления одноцепочечных ДНК. (Б) Эффективность гидролиза (%) модельных одно- и двуцепочечных ДНК. Погрешности соответствуют 95%-ным доверительным интервалам (n = 3).

Таким образом, образование G-квадруплекса негативно влияет на активность APE1 человека при удалении повреждения, локализованного в G4-мотиве 68-звенной G-богатой области промотора *hTERT*, *in vitro*.

Влияние F-сайтов в C-богатой цепи на структуру модельных ДНК. Не менее вероятным является накопление AP-сайтов в C-богатой цепи промотора *hTERT* в процессе дезаминирования с превращением цитозина в урацил и последующим удалением его урацил-ДНК-гликозилазой в рамках BER. Мы использовали двуцепочечные 96-звенные модельные фрагменты *hTERT* промотора с модификациями F в C-богатой цепи в позициях, соответствующих «драйверным» мутациям, и с флуоресцентной меткой TAMRA на 3'-конце C-цепи (Рис. 12).

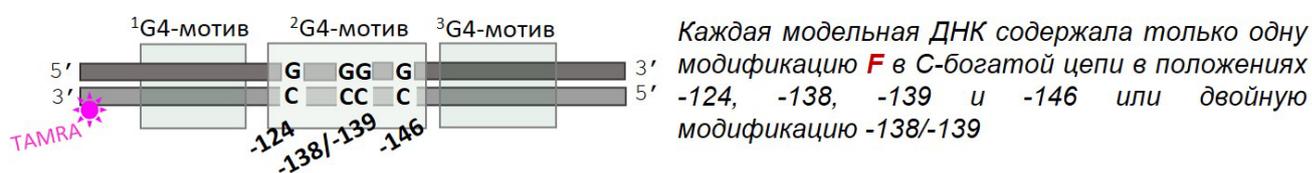


Рисунок 12. Модельные ДНК-дуплексы, содержащие фрагмент GC-богатой последовательности промотора *hTERT* с заменой/ами C→F в положениях, соответствующих «драйверным» (напротив F расположен dG).

Спектры КД 96-звенных дуплексов с заменами C→F в позициях, соответствующих «драйверным» мутациям промотора *hTERT*, оказались характерными для смеси GC-богатых дуплексов и предположительно G4-структур (характерный пик при 260 нм), образуемых G-богатой цепью промоторного региона *hTERT* (Рис. 13).

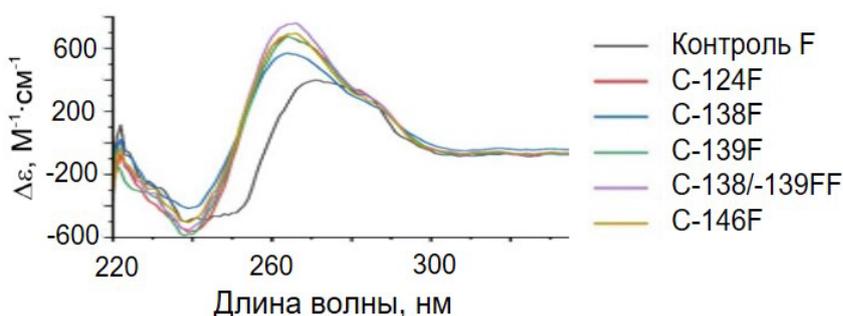


Рисунок 13. Спектры КД двуцепочечных ДНК, содержащих замену/ы C→F в C-цепи фрагмента промотора *hTERT*. Эксперимент проводили при 30 °С в 20 мМ буфере Трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ ЭДТА и 100 мМ КСl.

Гидролиз ферментом APE1 двуцепочечных 96-звенных модельных ДНК, содержащих G4-мотив промотора *hTERT* и замену/ы C→F, изучали в условиях, указанных в подписи к рисунку 10. Эффективность удаления F в положениях -124, -138 и -139 C-богатой цепи, достигала 80–90%. Однако наличие остатка F в положении -146 и двойная модификация в положениях -138/-139 приводили к двукратному снижению каталитической активности APE1 (Рис. 14), что, возможно, связано с формированием G4

в противоположной G-богатой цепи и частичным «секвестированием» фермента.

Полученные данные позволяют предложить следующую гипотезу об одном из механизмов закрепления «драйверных» мутаций в промоторе *hTERT*: (1) появление мутации в позиции -124 промотора *hTERT* может быть результатом снижения эффективности BER в результате нарушения функционирования фермента APE1 в области PQS в условиях образования G4 (например, в процессах расхождения цепей ДНК), (2) образование «драйверных» мутаций в позициях -146 и -138/-139 промотора *hTERT* может происходить из-за возникновения AP-сайтов в C-богатой цепи, способствующих локальной стабилизации G4, и ингибированию APE1 даже в условиях существования ДНК-дуплекса [6].

Эффективность гидролиза, %

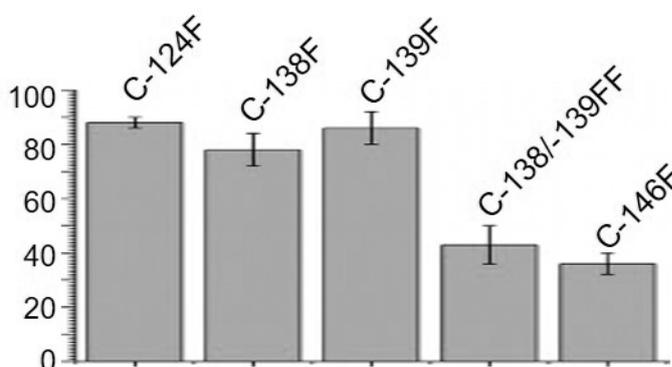


Рисунок 14. Расщепление двуцепочечных модельных ДНК, содержащих замену/ы C→F в C-цепи фрагмента промотора *hTERT*. Эксперимент проводили в 20 мМ буфере Трис-НСl (рН 7,5), содержащем 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 0,5 мг/мл БСА, 100 нМ ДНК-дуплекс и 10 е. а. (36 нМ) APE1. Погрешности соответствуют 95%-ным доверительным интервалам (n = 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенного исследования впервые комплексно продемонстрирована взаимосвязь между структурными особенностями GC-богатых областей генома и ограничениями в функционировании ключевых белков систем репарации «мисматчей» и гетероциклических оснований в ДНК прокариот и эукариот. Изменение функционирования MutL *N. gonorrhoeae* в G4 перед *pilE* может играть роль в регуляции антигенной вариации; неспособность MutS узнавать «мисматч» в GC-богатом контексте может быть одной из причин повышенной мутагенности этих регионов; снижение активности APE1 человека в отношении повреждений в G4 может приводить к возникновению мутаций в промоторе *hTERT*. По результатам работы можно сделать следующие выводы:

1. Белок MutS из *Cereibacter sphaeroides* не дискриминирует «мисматч» G/T в ДНК-дуплексе с составом GC-пар 82%: кажущиеся константы диссоциации комплексов белка

с ДНК, содержащей и не содержащей некомплементарную пару, составляют 72 ± 9 и 88 ± 11 нМ, соответственно. MutS узнает «мисматч» G/T в ДНК-дуплексе с составом GC-пар 53%: кажущиеся константы диссоциации комплексов белка с дуплексом, содержащим пару G/T, составляет 39 ± 5 нМ, а с каноническим дуплексом - 349 ± 46 нМ.

2. Белок MutL из *Neisseria gonorrhoeae* связывается с G-квадруплексом, образованным G-богатой последовательностью перед геном *pilE*, в 3-5 раз более эффективно по сравнению с ДНК-дуплексом. Фермент не гидролизует межнуклеотидные связи внутри G-квадруплекса, но вносит одноцепочечные разрывы во фланкирующие его дуплексные фрагменты.

3. Анализ баз данных подтвердил эволюционную консервативность G-квадруплексных мотивов в промоторных областях гена обратной транскриптазы теломеразы (*TERT*) 141 вида млекопитающих, включая приматов.

4. 68-звенный G-богатый фрагмент некодирующей цепи промотора *TERT* человека *in vitro* образует G-квадруплекс параллельной топологии, стабильность которого снижается в результате замены одного или двух остатков dG в положениях, соответствующих «драйверным» мутациям (-124, -146 и -139/-139 относительно стартового кодона), на аналог апурин/апиримидинового сайта - остаток 1,2-дидезоксирибозы.

5. Показано, что апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 эффективно связывается с G-квадруплексной структурой G-богатого фрагмента некодирующей цепи промотора *TERT* человека, содержащей остаток 1,2-дидезоксирибозы, но практически не гидролизует ДНК с модификацией в положении -124. Наблюдается двукратное снижение каталитической активности этого фермента в случае введения модификации в положения -146 и -138/-139 C-богатой кодирующей цепи в составе ДНК-дуплекса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук:

1) Монахова М.В., Милакина М.А., Савицкая В.Ю., Романова Е.А., Rao D.N., Кубарева Е.А. Белок MutL из системы репарации мисматчей бактерии *Neisseria gonorrhoeae*: взаимодействие с АТР и ДНК // Молекулярная биология. — 2021. — Т. 55, — № 2, — С. 289-304. Импакт-фактор 0,785 (РИНЦ). EDN: DLIRWD. 0,94 п.л.

Monakhova M.V., Milakina M.A., Savitskaya V.Yu., Romanova E.A., Rao D.N., Kubareva E.A. MutL protein from the *Neisseria gonorrhoeae* mismatch repair system: interaction with ATP and DNA // *Molecular Biology*. — 2021. — Vol. 55, — № 2, — PP. 252-266. Импакт-фактор 1,2 (JIF). EDN: FVRPFZ. 0,94 п.л.

2) Савицкая В.Ю., Монахова М.В., Якушкина Ю.В., Боровикова И.И., Кубарева Е.А. Бактерия *Neisseria gonorrhoeae*: системы репарации ДНК и их роль в патогенезе // *Биохимия*. — 2022. — Т. 87. — № 9. — С. 1182-1202. Импакт-фактор 2,1 (РИНЦ). EDN: AZORAR. 1,25 п.л.

Savitskaya V.Yu., Monakhova M.V., Iakushkina I.V., Borovikova I.I., Kubareva E.A. *Neisseria gonorrhoeae*: DNA repair systems and their role in pathogenesis // *Biochemistry (Moscow)*. — 2022. — Vol. 87. — № 9. — PP. 965-982. Импакт-фактор 2,2 (JIF). EDN: KQPRZA. 1,25 п.л.

3) Pavlova A.V., Savitskaya V.Yu., Dolinnaya N.G., Monakhova M.V., Litvinova A.V., Kubareva E.A., Zvereva M.I. G-quadruplex formed by the promoter region of the *hTERT* gene: structure-driven effects on DNA mismatch repair functions // *Biomedicines*. — 2022. — Vol. 10. — № 8. — P. 1871. Импакт-фактор 4,09 (JIF). EDN: UPZOMT. 1,2 п.л.

4) Savitskaya V.Yu., Strekalovskikh V.V., Snyga V.G., Monakhova M.V., Arutyunyan A.M., Dolinnaya N.G. and Kubareva E.A. *pilE* G-quadruplex is recognized and preferentially bound but not processed by the MutL endonuclease from *Neisseria gonorrhoeae* mismatch repair pathway // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2023. — Vol. 24. — № 7. — P. 6167. Импакт-фактор 4,9 (JIF). EDN: DBWKWO. 1,25 п.л.

5) Panova V.V., Dolinnaya N.G., Novoselov K.A., Savitskaya V.Y., Chernykh I.S., Kubareva E.A., Alexeevski A.V., Zvereva M.I. Conserved G-quadruplex-forming sequences in mammalian *TERT* promoters and their effect on mutation frequency // *Life*. — 2023. — Vol. 13. — № 7. — P. 1478. Импакт-фактор 3,62 (JIF). EDN: IXDZFN. 1,25 п.л.

6) Savitskaya V.Yu., Novoselov K.A., Dolinnaya N.G., Monakhova M.V., Snyga V.G., Diatlova E.A., Peskovatskova E.S., Golyshev V.M., Kitaeva M.I., Eroshenko D.A., Zvereva M.I., Zharkov D.O., Kubareva E.A. Position-dependent effects of AP sites within an *hTERT* promoter G-quadruplex scaffold on quadruplex stability and repair activity of the APE1 enzyme // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2025. — Vol. 26. — № 1. — P. 337. Импакт-фактор 4,9 (JIF). EDN: DSULHV. 1,25 п.л.