

На правах рукописи

НАБЕРЕЖНОВ ДЕНИС СЕРГЕЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ БЛАСТОМОГЕННЫХ
УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМ
РЕПАРАЦИИ ДНК**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва — 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Якубовская Марианна Геннадиевна

Официальные оппоненты:

Барлев Николай Анатольевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук

Наседкина Татьяна Васильевна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биологических микрочипов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П. А. Герцена – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «7» февраля 2019 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава РФ по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Соединения, обладающие аффинностью к ДНК, проявляют широкий спектр биологического действия. Считается, что их свойства в значительной мере определяются типом взаимодействия с ДНК и аффинностью к определенным структурным детерминантам, формируемым биополимером. ДНК-связывающие соединения могут интеркалировать между основаниями, взаимодействовать с В-формой ДНК по большой или малой бороздке, а также формировать комплексы с альтернативными структурами ДНК (G-квадруплексами, H- и Z-ДНК). В настоящее время большой интерес вызывают так называемые узкобороздочные лиганды (УБЛ), представляющих довольно большой класс агентов различной химической природы, для которых общим свойством является способность формировать комплексы с ДНК по малой бороздке за счет водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий без образования ковалентной связи. Поскольку многие УБЛ способны флуоресцировать после образования комплекса с ДНК и РНК, они получили широкое распространение в молекулярной клинической диагностике, экспериментальной онкологии, молекулярно-биологических и цитогенетических исследованиях в качестве реагента для визуализации нуклеиновых кислот. Ряд соединений этой группы используется в медицинской практике в качестве антипаразитарных и антисептических средств. Применительно к онкологической практике изучение УБЛ представляет как теоретический, так и практический интерес в связи с широким спектром их биологического действия, имеющего как про-, так и антиканцерогенную направленность. Эти соединения обладают широким спектром индивидуальной эпигенетической активности, по-разному влияя на уровень экспрессии и функциональную активность ферментов систем эпигенетической регуляции экспрессии генов. Изучение закономерностей данного влияния раскрывает перспективы использования УБЛ в комбинированной противоопухолевой терапии в качестве адьювантных компонентов, усиливающих действие основного противоопухолевого препарата.

В то же время некоторые из них могут проявлять и канцерогенную активность, которая, однако, в отличие от алкилирующих химиопрепаратов, основана на непрямом генотоксическом действии. Так, ряд УБЛ обладает бластомогенной активностью при отсутствии мутагенности.

Примерами таких соединений могут служить флуоресцентные красители Hoechst 33342 и Hoechst 33258, и противоопухолевый препарат CBL0137, не активные в классических тестах на мутагенность, но способные вызывать опухоли у дрозофилы в тесте на соматический мутагенез и рекомбинацию. При этом данные соединения обладают

способностью ингибировать активность топоизомеразы I. Поскольку для ингибиторов данного фермента была описана рекомбиногенная активность, можно предположить, что эти соединения также относятся к группе рекомбиногенов, однако выяснение механизма бластомогенного эффекта УБЛ требует дальнейшего изучения. Как известно, в патогенезе онкологических заболеваний человека соматическая гомологичная рекомбинация, приводящая к утрате гетерозиготности, является основным механизмом манифестации рецессивных мутаций. В частности, по такому механизму в 75% случаев развивается наследственная ретинобластома, поражающая детей, унаследовавших мутантный аллель гена Rb.

В то же время, CBL0137, взаимодействуя с ДНК как интеркалятор и как УБЛ, в экспериментах с индуцированным 1,2-диметилгидразином канцерогенезом на мышах проявил антиканцерогенное действие, что можно объяснить влиянием этого соединения на NF- κ B и p53. Было установлено, что эти эффекты ассоциированы со взаимодействием соединения с ДНК по узкой бороздке.

В связи продолжающимся активным синтезом новых соединений класса УБЛ, вопрос изучения механизма их влияния на функционирование ферментов репарации, белков с провоспалительной и антиапоптотической активностью, а также на регуляцию экспрессии генов представляется важным в плане совершенствования первичной профилактики канцерогенеза.

Таким образом, двоякое действие УБЛ требует комплексного изучения их свойств как в плане потенциальной канцерогенности, так и для разработки перспективных противоопухолевых и антиканцерогенных препаратов, что свидетельствует об актуальности темы представленного исследования.

Степень разработанности проблемы

Биологические эффекты УБЛ могут реализоваться по нескольким механизмам, основными из которых являются влияние на транскрипцию при связывании лигандов с промоторными и кодирующими последовательностями и взаимодействие лиганда с сайтами распознавания ферментов метаболизма ДНК, в том числе ферментов репарации и эпигенетической регуляции экспрессии генов. Одним из подходов выяснения механизмов действия УБЛ является изучение сиквенс-специфичности этих соединений, так как в настоящее время считается, что именно это свойство и обуславливает разнообразные варианты их биологической активности. В исследованиях отдельных соединений этого класса было продемонстрировано их сродство к АТ-богатым последовательностям, однако сравнительного анализа аффинности и специфичности соединений УБЛ к отдельным последовательностям ДНК проведено не было.

Для изучения сиквенс-специфичности УБЛ на основе использования ферментов ДНКазы I и РНК-полимеразы были разработаны удобные модельные системы. Стандартным подходом для изучения сиквенс-специфичности ДНК-связывающих лигандов является футпринтинг с помощью ДНКазы I и радиоактивно-меченых фрагментов ДНК. Прогресс в использовании флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК раскрывает новые возможности в использовании данного метода, делая его менее опасным, но в то же время экспрессным и чувствительным. До настоящего времени флуорофоры не использовались при проведении футпринтинга с ДНКазой I, однако практика их применения в других молекулярно-биологических методах является хорошим основанием для оптимизации этой методики для изучения сиквенс-специфичности УБЛ.

Функционирование бактериальной РНК-полимеразы является чувствительным к последовательности своего сайта связывания (промотора гена), поэтому от константы его связывания зависит сила промотора и уровень экспрессии белка, находящегося под данным промотором. Недавно Остерманном и соавт. была разработана модельная система коэкспрессии двух флуоресцентных белков, позволяющая оценивать функционирование генов в зависимости от последовательности их промоторных областей. Изучение влияния УБЛ при разных последовательностях промоторных областей на эффективность работы РНК-полимеразы по изменению соотношения экспрессии флуоресцентных белков покажет целесообразность развития этого нового подхода для выявления последовательностей ДНК, к которым тестируемое соединение демонстрирует наибольшую аффинность.

Белок поли(АДФ-рибоза)-полимераза-1 (PARP1) является ядерным белком, участвующим в системе репарации ДНК (NER, BER и HR). Данный белок активируется разрывами ДНК и катализирует реакцию поли(АДФ)-рибозилирования, вызывая немедленный ответ клетки на повреждения ДНК. Кроме того, имеются данные о влиянии этого белка и на транскрипцию, репликацию, клеточный цикл и др. В неактивном состоянии PARP1 связан с ДНК (связывание преимущественно проходит с участками, где ДНК образует альтернативные структуры, а также с АТ-богатыми последовательностями). Учитывая, что УБЛ проявляют сродство к этим участкам ДНК и тот факт, что недавно феномен ингибирования PARP1 с помощью УБЛ был продемонстрирован в исследованиях нашей лаборатории, выявление УБЛ наиболее активно ингибирующих PARP1 и изучение молекулярных закономерностей этого действия раскрывает новые возможности использования УБЛ в качестве модификаторов генотоксического действия противоопухолевых препаратов при снижении или отсутствии в опухолевых клетках ферментов гомологичной рекомбинации.

Таким образом, представленное исследование основано на имеющихся данных по

биологическим эффектам УБЛ и направлено на получение новых данных об их сиквенс-специфичности и влиянии на экспрессию белков и функционирование ферментов репарации ДНК.

В практическом аспекте на основании существующих разработок по футпринтингу с помощью ДНКазы I предложен способ оптимизации метода путем использования флуоресцентно-меченых фрагментов ДНК.

Основные цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования является сравнительный анализ взаимодействия УБЛ с ДНК и их влияния на функционирование белков систем репарации ДНК. В соответствии с основной целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Используя тест SMART на гетерозиготах *D.melanogaster* wts/+, wts/mus309 и wts/TM3 оценить вклад рекомбинационной репарации в бластомогенность УБЛ Hoeschst 33342, Hoeschst 33258.

2. Провести сравнительный анализ взаимодействия ряда УБЛ с ДНК, используя футпринтинг ДНКазой I:

- оптимизировать использование флуорофора для визуализации результатов футпринтинга ДНКазой I;
- сравнить влияние УБЛ на гидролиз ДНКазой I различных участков фрагмента ДНК.

3. Используя двухрепортерную систему белков Cerulean и RFP в *E.coli*, изучить влияние УБЛ на экспрессию белков-флуорофоров *in vivo* в зависимости от последовательности нуклеотидов в промоторной области гена Cerulean, используя библиотеку плазмид.

4. Провести сравнительный анализ способности ряда «классических» и новосинтезированных УБЛ ингибировать белок PARP1 при активации белка ДНК.

- разработать модельную систему реакции поли-АДФ-рибозилирования *in vitro* с использованием в качестве активатора белка PARP1 гантелеобразный дуплекс ДНК.
- оценить зависимость активации белка PARP1 от наличия АТ-богатого сайта, одноцепочечного разрыва и их взаимного расположения в гантелеобразном дуплексе ДНК.
- провести сравнительный анализ способности ряда известных и новосинтезированных УБЛ ингибировать белок PARP1;
- изучить способность УБЛ ингибировать белок PARP1, используя гантелеобразные дуплексы, содержащие одноцепочечный разрыв и сайта «узнавания» УБЛ при их разной взаимной локализации.

Научная новизна исследования обусловлена тем, что впервые

продемонстрированы:

- преимущественное участие рекомбинационной репарации в бластомогенном действии Hoeschst 33342, Hoeschst 33258 при использовании тест-системы на соматическую рекомбинацию и мутагенез на дрожжах;
- возможность использования флуоресцентно-меченой ДНК в методе футпринтинга ДНКазой I, которое позволяет более эффективно и безопасно определять предпочтительные участки узнавания ДНК-связывающих соединений;
- наличие специфических изменений профиля расщепления дуплекса ДНК с помощью ДНКазы I в присутствии каждого из проанализированных УБЛ;
- способность соединений класса УБЛ влиять на экспрессию белка в зависимости от последовательности промотора этого белка, используя двухрепортерную систему белков Cerulean и RFP в *E.coli*;
- влияние на ферментативную активность белка PARP1 наличия одноцепочечных разрывов в гантелеобразных дуплексах ДНК, выполняющих роль активатора реакции;
- зависимость уровня активации белка PARP1 от последовательности ДНК в области одноцепочечного разрыва.

Теоретическая и практическая значимость исследования

На основании результатов исследования выявлен механизм бластомогенности ряда УБЛ (Hoeschst 33342, Hoeschst 33258), связанный с рекомбиногенностью этих соединений.

Продемонстрировано влияние соединений класса УБЛ на соотношение коэкспрессируемых в бактериальной системе флуоресцентных белков RFP и Cer в зависимости от последовательности нуклеотидов в области промоторов соответствующих генов. Эти данные свидетельствуют о возможности разработки метода тестирования, позволяющего идентифицировать области наибольшей аффинности соединения, на основе бактериальной системы с коэкспрессией флуорофоров.

Показано, что одним из способов регуляции ферментативной активности белка PARP1 является связывание с одноцепочечными разрывами. Показано, что уровень активации зависит от последовательности ДНК в области разрыва.

При помощи футпринтинга ДНКазой I выявлены последовательности наиболее вероятного связывания для всех проанализированных УБЛ, показана специфичность соединений серии DBP к последовательности ААТТААТТ,

Практическая значимость работы связана с демонстрацией эффективного ингибирующего действия на активацию белка PARP1 диминазена, антипаразитарного препарата, что раскрывает возможности его использования в комбинированной

химиотерапии в качестве адьювантного препарата, усиливающего действие генотоксических агентов. Также работа практически значима для оптимизации метода футпринтинга ДНКазой I. Использование различных флуорофоров позволило повысить его чувствительность и сделать его более безопасным.

Методология и методы научного исследования

Диссертационная работа выполнена в лаборатории механизмов химического канцерогенеза НИИ химического канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В работе использовали комплексный анализ с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования:

- методы работы с *D.melanogaster*: метод тестирования ксенобиотиков на соматическую рекомбинацию и мутагенез на дрозофиле в нескольких модификациях;
- методы работы с *E.coli*: работа с компетентными клетками *E.coli*, работа с флуоресцентными белками Ser и RFP;
- методы работы с ДНК: полимеразная цепная реакция, метод очистки ДНК, гель-электрофорез, электрофорез нуклеиновых кислот в акриламидном и агарозном геле, футпринтинг ДНКазой I;
- методы работы с белком PARP1: реакция поли-АДФ-рибозилирования, вестерн-блоттинг.

Достоверность результатов подтверждена адекватным выбором методов и использованием современных методов математической статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. УБЛ Hoechst 33342 и Hoechst 33258 имеют преимущественно рекомбиногенный механизм их бластомогенности.
2. Футпринтинг ДНКазой I с использованием флуоресцентной метки является адекватной заменой метода с использованием радиоактивно-меченой ДНК и позволяет более эффективно определять предпочтительный участок узнавания ДНК-связывающих соединений.
3. «Классические» и новосинтезированные УБЛ имеют различия в специфичности к участкам ДНК, общим свойством которых является высокое содержание А/Т пар.
4. Двухрепортерная система белков Serulean и RFP в *E.coli* позволяет выявлять различия в сиквенс-специфичности УБЛ.
5. УБЛ диминазен способен ингибировать активность белка PARP1, что

позволяет рекомендовать его для использования в противоопухолевой комбинированной терапии.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами молекулярно-биологических исследований, полученные автором новые данные согласуются с имеющимися в литературе данными по изучению отдельных биологических и физико-химических свойств УБЛ. Достоверность полученных данных основана на адекватном выборе и корректном использовании в исследовании современных методов выделения и очистки нуклеиновых кислот, флуориметрии, методов генной инженерии, иммуногистохимического анализа, компьютерной обработки данных. Полученные в исследовании результаты обработаны с использованием адекватных методов математической статистики.

По материалам диссертации опубликованы 5 статей в отечественных журналах, входящих в перечень ВАК. Результаты представлены на 7 международных и отечественных научных конференциях.

Личный вклад автора

Автором был проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, составлен план исследования по диссертационной работе, выполнены эксперименты, проведен анализ собранных результатов, сформулированы выводы и написана диссертационная работа.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология («биологические науки»), а именно п. 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов. Список цитируемой литературы включает 294 (12 отечественных и 283 зарубежных) источников. Диссертация иллюстрирована 3 таблицами и 39 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе были использованы линии дрозофил:

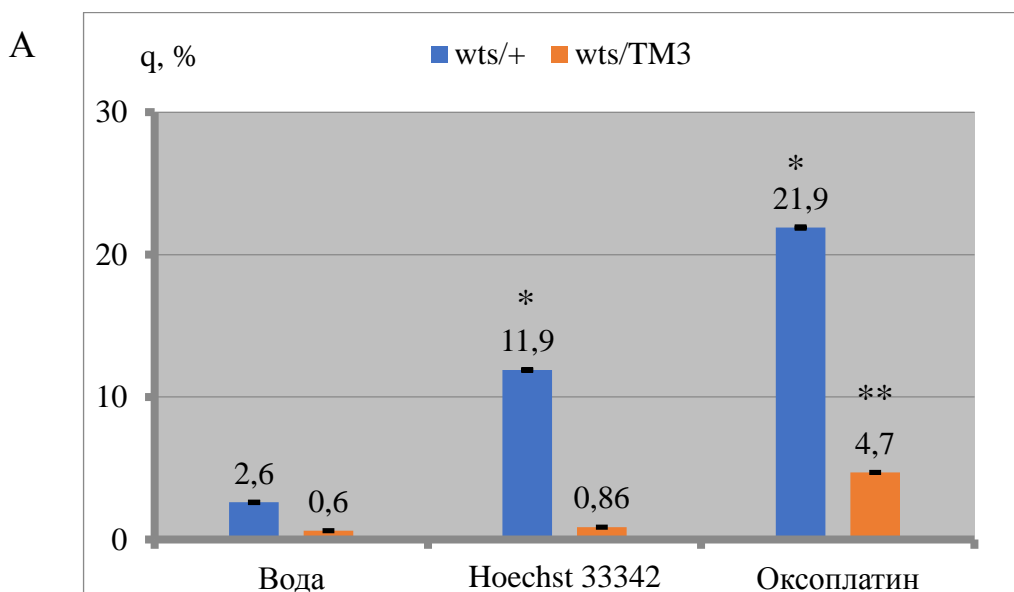
- w; wtsP4/TM3, Sb, Ser (получена от П. Брайанта);
- w; P{act-Gal4, UAS-GFP}; wtsP4/TM3 (выведена К.И. Кирсановым и

Р.А. Сидоровым).

Изучение механизма бластомогенности УБЛ Hoechst 33342 и Hoechst 33258 с использованием теста SMART на гетерозиготах *D.melanogaster* wts/TM3 и wts/mus309

Бластомогенная активность УБЛ Hoechst 33258 и Hoechst 33342 практически не изучалась; это связано с тем, что в большинстве тестов на мутагенность данные соединения не проявляют активности, однако в разработанном в нашей лаборатории тесте на соматическую рекомбинацию и мутагенез – SMART (Somatic Mutation and Recombination Test, SMART) было показано, что обработка личинок дрозофилы Hoechst 33258 и Hoechst 33342 приводит к значительному увеличению частоты появления опухолевых клонов. Исходя из этих данных, было высказано предположение, что эффект Hoechst обусловлен гомологичной рекомбинацией. Для проверки этой гипотезы были использованы гетерозиготы дрозофилы wts/TM3 и wts/mus309. При наличии хромосомы-балансера TM3 гомологичная рекомбинация приводит к гибели клеток, так как образуются хромосомы с двумя центромерами или без центромеры. У гетерозигот wts/mus309 имеется мутация в гене RecQ-хеликазы dmBLM (mus309), что приводит к снижению активности гомологичной рекомбинации.

В эксперименте на гетерозиготах wts/TM3 было показано, что использование балансера в тесте SMART почти полностью подавляет бластомогенный эффект Hoechst 33342 – количество опухолей остается на уровне контроля, в то время как при использовании гетерозигот wts/+ количество опухолей значительно возросло. При добавлении оксоплатина, вызывающего как мутагенез, так и рекомбинацию, количество опухолей возросло как при использовании гетерозигот wts/+, так и wts/TM3 (рисунок 1 А).



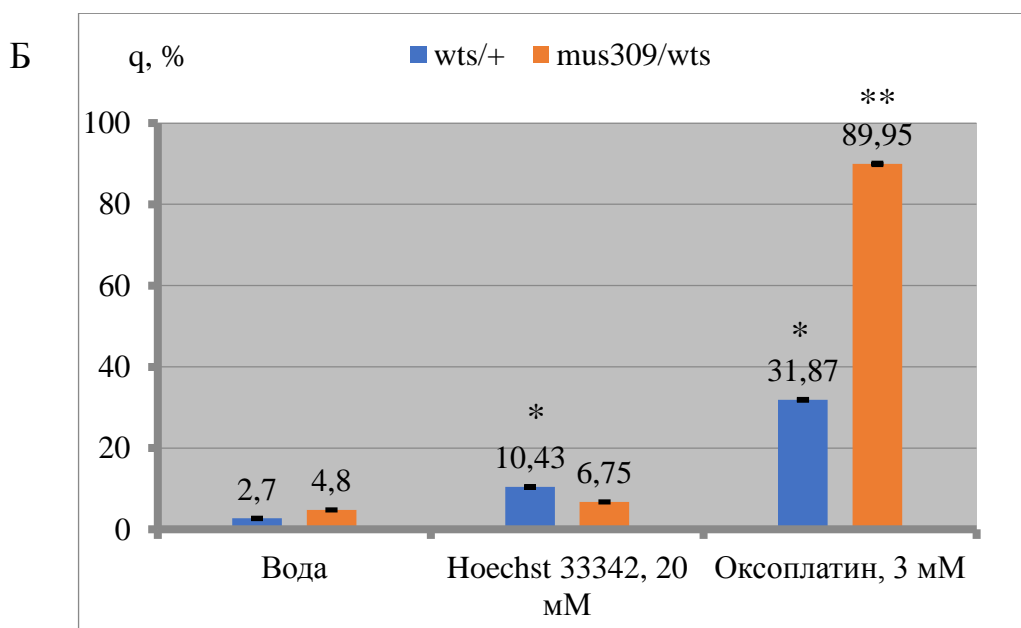


Рисунок 1 – Частота появления опухолевых клонов у гетерозигот wts/+ и wts/TM3 (А), у гетерозигот wts/mus309 (Б) обработанных оксоплатином и Ноеchst 33342. N – количество особей, n – количество опухолей, $q = n/N \cdot 100\%$, * - частота статистически значимо отлична от соответствующего контроля, $P < 0,01$.

На основании этого результаты нами был сделан вывод о преимущественно рекомбиногенной активности этих соединений.

Результаты тестирования эффекта Ноеchst 33342 в тесте SMART на гетерозитах wts/mus309 и wts/+ также свидетельствовали о его рекомбиногенном действии. У гетерозигот wts/mus309 варианте активация соматической гомологической рекомбинации снижена за счет мутации в гене RecQ-хеликазы dmBLM, вследствие чего частота спонтанного мозаицизма в контроле незначительно увеличилась (рисунок 1 Б).

Эти данные согласуются с данными других авторов. В проведенных нами экспериментах по оценке эффектов Ноеchst 33342 частота возникновения опухолевых клонов при действии алкилирующего агента (оксоплатин) возросла в 19 раз относительно частоты спонтанного мозаицизма у этой же линии (89,95% и 4,8%) и в три раза относительно частоты индуцированного оксоплатином мозаицизма у линии без мутации в гене RecQ-хеликазы (89,95% против 31,9%). При действии Ноеchst 33342 частота появления клонов возросла с 4,80% до 6,75% (статистически незначимо). Такое незначительное повышение частоты, по всей видимости, связано с ингибирующим действием этих соединений на топоизомеразу I и сравнимо с действием камптотецина в аналогичных экспериментах. Таким образом, данные второго эксперимента также

согласуются с выдвинутой нами гипотезой о рекомбиногенном механизме бластомогенности Hoechst.

Несмотря на то что гомологическая рекомбинация является важной системой репарации ДНК, существует множество доказательств того, что гомологическая рекомбинация может приводить к геномным перестройкам, таким образом играя важную роль в канцерогенезе. Трансформация нормальных клеток в опухолевые представляет собой многоступенчатый процесс, в котором принимает участие соматическая гомологическая рекомбинация. Гетерозиготные клетки, имеющие мутантную и нормальную аллель генов супрессоров опухолевого роста, могут стать источником развития опухоли в случае потери гетерозиготности.

Изучение сиквенс-специфичности узкобороздочных лигандов с помощью футпринтинга ДНКазой I

Биологический эффект узкобороздочных лигандов в первую очередь определяется характером их взаимодействия с ДНК. Ранее для исследуемых УБЛ была показана их АТ-специфичность, однако аффинность к конкретным сиквенсам не изучалась. На первом нами была оптимизирована методика стандартного метода футпринтинга для использования флуорофора в качестве метки. Для этого были протестированы наиболее распространенные флуоресцентные красители: FAM, Cy3, ROX, TAMRA, Cy5,5. Сканирование проводили на приборе Thyphoon 9410. В качестве оптимальных флуорофоров для детекции взаимодействия малых молекул с ДНК были выбраны TAMRA и Cy3: минимальное количество, достаточное для визуализации ДНК, составляло 0,8 пмоль. В дальнейшем для экспериментов использовался флуорофор TAMRA. Оптимизированный метод футпринтинга был применен как для изучения свойств уже известных УБЛ, так и для вновь синтезированных соединений. В качестве ранее описанных УБЛ были взяты Hoechst 33342, Hoechst 33258, DAPI, Diminazene, Pentamidine и CBL0137. Для этих УБЛ продемонстрированы тонкие различия в специфичности и способности к связыванию с ДНК, используя 200-звенный ДНК-дуплекс (рисунок 2).

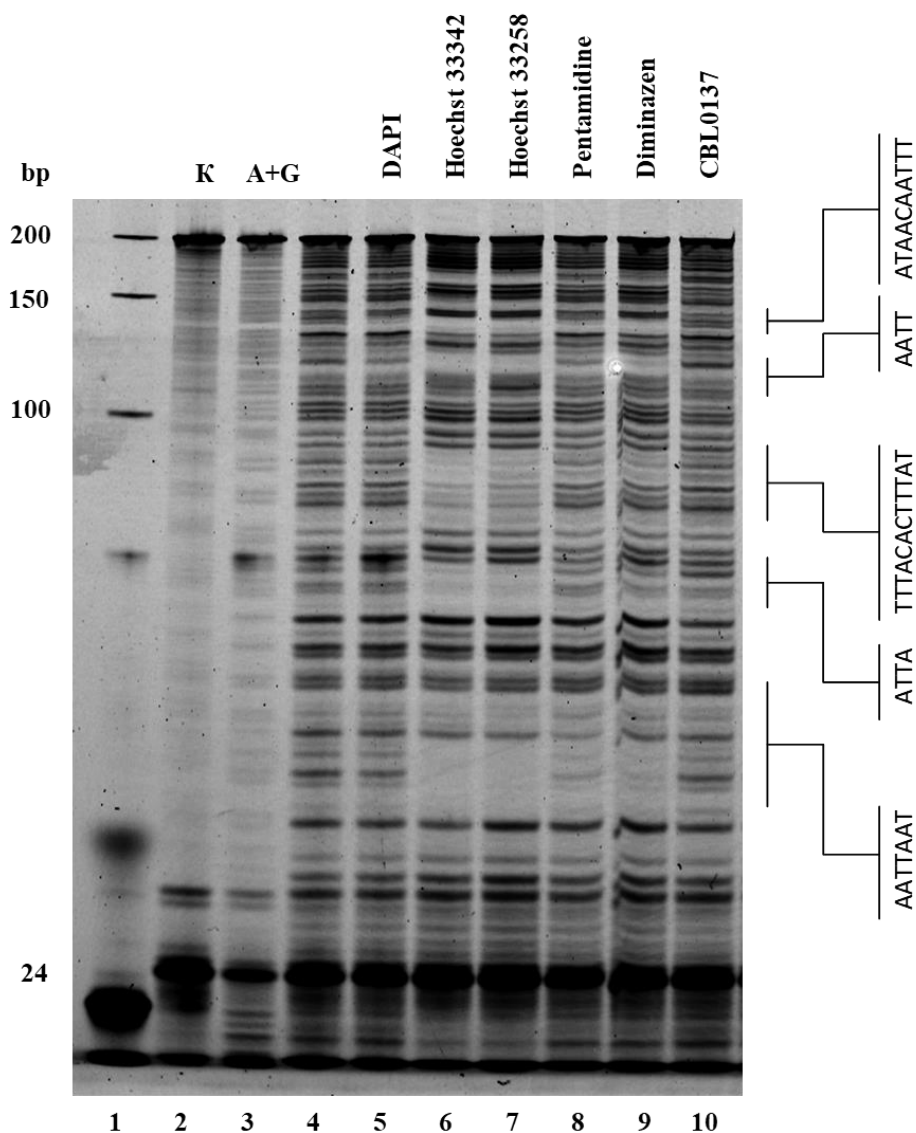


Рисунок 2 – ДНКза-футпринтинг флуоресцентно-меченых 200-звенных ПЦР-фрагментов в присутствии 8 мкМ различных узкобороздочных лигандов. 1 – 24, 100, 150, 200-звенные ДНК; 2 – исходный 200-звенный ПЦР фрагмент; 3 – химическое расщепление по пуринам; 4 – расщепление ДНКазой I в отсутствии узкобороздочных лигандов; 5 – 10 расщепление в присутствии DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, Pentamidine, Diminazen, CBL0137

Также на аналогичной системе (150-звенный ДНК-дуплекс той же последовательности) нами была исследована специфичность новосинтезированных УБЛ – серия DBP(n) и DB(n). Эти агенты представляют собой димерные бис-бензимидазолы (димеры остатков Hoechst), в которых остатки Hoechst соединены углеводородным (DB) или углеводород-пиперазиновыми (DBP) мостиками, цифра в названии соединения серии означает количество CH_2 заместителей в соединении, которое составляет 1, 2, 3 и 4 для серии DBP и 4, 6, 9, 10, 11 для серии DB. Для всех соединений этой серии характерно

проявление специфичности к АТ-богатым участкам ДНК длиной от 8 до 15 п.о. При этом различий в профиле расщепления между соединениями внутри серии не наблюдается. В то же время для серии DBP показана несколько большая аффинность к АТ-богатым участкам ДНК, чем для серии DB. В другой системе, где дуплекс ДНК не содержит последовательностей АТ и ТТ, было показано, что ни классические, ни новосинтезированные УБЛ с данным ДНК-дуплексом не связываются даже в высоких концентрациях.

Для более детального изучения АТ-специфичности УБЛ был использован дуплекс ДНК, состоящий только из АТ и ТТ в разных вариантах в области разрешения электрофореграммы футпринтинга. В состав этого дуплекса входят повторы АТ и ААТТ, а также адениновые массивы длиной от 4 до 7 оснований. Было установлено, что соединения серии DBP обладали наибольшей аффинностью к мотиву ААТГААТТ по сравнению с другими комбинациями АТ этого ДНК-дуплекса. Другие соединения (серия DB, DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, Pentamidine, Diminazene) афинны ко всей последовательности данного АТ-богатого ДНК-дуплекса.

Применение двойной репортерной системы для изучения свойств узкобороздочных лигандов

Для дальнейшего изучения сиквенс-специфичности УБЛ, а также исследования их влияния на экспрессию генов в зависимости от последовательности нуклеотидов в промоторных областях, была использована двойная репортерная система флуоресцентных белков. Система, представляет собой набор штаммов *E.coli*, несущих различные плазмиды. Каждая из плазмид содержит гены двух флуоресцентных белков (Cerulean и RFP). Последовательность промотора гена RFP постоянна, тогда как последовательность промотора Cerulean (далее Cer) вариабельна. При этом другие ключевые элементы транскрипции и трансляции, такие как рибосома-связывающий сайт и последовательность терминации, для каждого из генов одинаковы. Меняя промотор гена Cer и обрабатывая бактерии узкобороздочными лигандами, можно оценить влияние УБЛ на экспрессию гена под определенным промотором путем оценки соотношения уровней экспрессии гена RFP, находящегося под контролем константного промотора, и экспрессии Cer, находящегося под контролем вариабельного промотора. Двойная репортерная система была любезно предоставлена автором конструкции И.А. Остерманом (лаборатория Структуры и функции РНК НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ).

После проверки чувствительности системы к УБЛ и подбора оптимальных условий проведения эксперимента были подобрана концентрация УБЛ, время детектирования флуоресценции и возможность использования определенных промоторов и соединений.

Были использованы концентрации УБЛ DAPI, Pentamidine, Hoechst 33342, Hoechst 33258, которые не оказывают цитотоксического эффекта на *E.coli*. Показано, что регистрацию флуоресценции лучше всего проводить после 24 часов роста колоний.

На следующем этапе нами было изучено влияние УБЛ на созревание (транскрипцию/трансляцию/созревание) каждого из флуоресцентных белков. В этой серии экспериментов изучили зависимость отношений абсолютных уровней флуоресценции белков (Cег/RFP) от концентрации УБЛ. При этом экспрессия обоих генов находилась под контролем промотора T5. Обработку проводили следующими соединениями – Hoechst 33258, Hoechst 33342, DAPI, Pentamidine, Diminazene, CBL0137 и представителем серии DBP – DBP-2, в концентрациях 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 мкМ. Мы показали, что при увеличении концентрации соединений изменяется соотношение флуоресценции белков, что, по всей видимости, свидетельствует о влиянии соединений на процесс созревания белков, однако при низкой концентрации соединения не оказывают существенного влияния на соотношение экспрессии белков. Для DAPI такая концентрация составляет 5 мкМ, Pentamidine – 10 мкМ, Hoechst 33342 – 2,5 мкМ, Hoechst 33258 – 2,5 мкМ, CBL0137 – 40 мкМ. В дальнейших экспериментах были использованы подобранные концентрации.

На рисунке 3 представлены соотношения уровня экспрессии белка Cег к белку RFP, находящиеся под одним и тем же промотором T5. Как видно, соотношение уровня экспрессии белков при обработке тестируемыми соединениями отличается от уровня экспрессии белков без обработки.

Факт влияния УБЛ на созревание белков не позволяет использовать двойную репортерную систему для количественного сравнительного анализа, т.е. определения последовательности максимальной аффинности УБЛ, но тем не менее свидетельствует о принципиальном влиянии УБЛ на экспрессию генов в зависимости от последовательности нуклеотидов в промоторе.

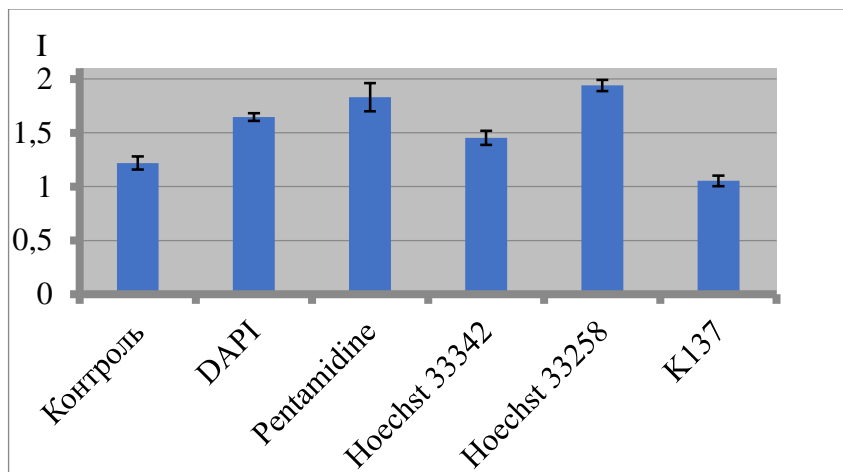


Рисунок 3 – Диаграмма отношения уровней флуоресценции белка Cег к белку RFP

($I_0(\text{Cer/RFP})$), экспрессирующихся под промотором T5 в клетках бактерий, обработанных 5 mM DAPI, 2,5 mM Hoechst 33258, 10 mM Pentamidin, 2,5 mM Hoechst 33342, 40 mM CBL0137 и без обработки

Для выявления этого влияния соотношения уровней экспрессии Cer/RFP в присутствии УБЛ были нормированы на соотношения уровней экспрессии Cer/RFP в отсутствие УБЛ (на рисунке 4 приведен пример для DAPI).

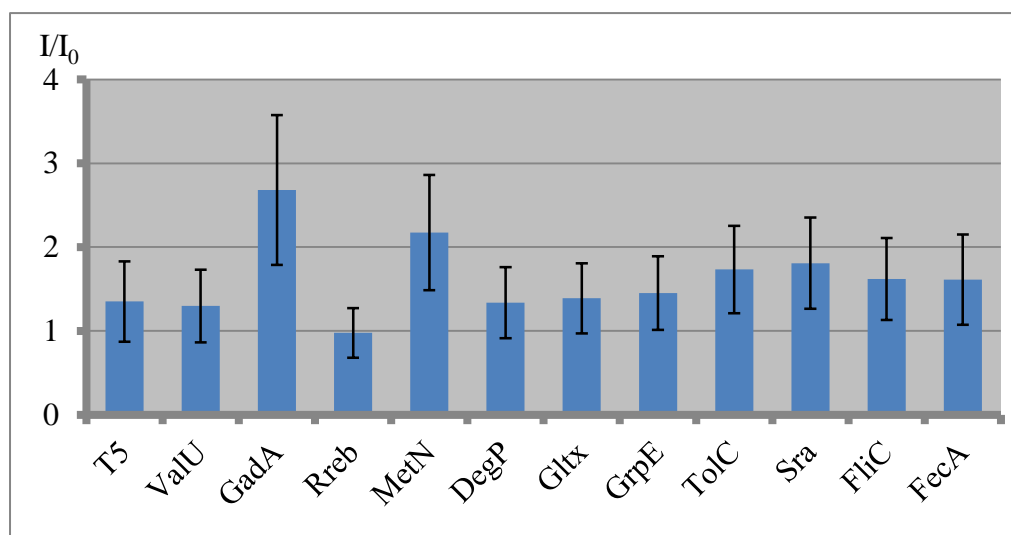


Рисунок 4 – Диаграмма отношения уровня флуоресценции белка Cer к белку RFP, экспрессирующихся под разными промоторами в клетках бактерий, обработанных: А – 5 mM DAPI, нормированное на отношения уровня флуоресценции $I_0(\text{Cer/RFP})$ без обработки

Для некоторых промоторов нормированное соотношение интенсивности флуоресценции I/I_0 статистически значимо отличается от нормированного соотношения I/I_0 (T5), что говорит о разном влиянии УБЛ на экспрессию белков в зависимости от промотора. DAPI оказывает влияние на экспрессию при промоторах MetN и GadA. Pentamidine оказывает влияние только при промоторе GadA. Hoechst 33258 оказывает влияние при промоторах MetN и GadA. Hoechst 33342 и кураксин CBL0137 в выбранной концентрации не оказывают влияния ни при одном из изученных промоторов. Тестируемые соединения влияют на определенные промоторы, так DAPI проявляет большее сродство к T5, чем к MetN и GadA, Pentamidine – большее сродство к T5, чем к GadA, а сродство Hoechst 33258 к промоторам убывает в ряду GadA – T5 – MetN. Полученные данные не позволяют сделать выводы о специфичности связывания протестированных УБЛ с определенными последовательностями ДНК в E.coli, однако позволяют выявить тенденцию связывания УБЛ с АТ-богатыми последовательностями в данной системе и влияния УБЛ на экспрессию белков в зависимости от природы

соединения. Эти результаты согласуются с литературными и полученными при выполнении фупринтинга ДНК данными о специфическом взаимодействии УБЛ с определенными последовательностями нуклеотидов.

Исследование влияния узкобороздочных лигандов на функционирование белка PARP1

Для изучения ингибирования УБЛ PARP1 использовалась система, включающая в себя: субстраты (NAD и PARP1), фермент (PARP1) и активатор ферментативной реакции. Продуктом реакции при этом является комплекс белка с цепями поли-(АДФ)-рибозы разной длины. Выявление продукта реакции проводится иммуногистохимически методом Вестерн-блоттинга с использованием антител к поли(АДФ)-рибозе. В качестве активатора реакции поли(АДФ)-рибозилирования *in vitro* может выступать либо ДНК, либо гистон H4. Для проведения экспериментов был использован 44-членный гантелеобразный олигонуклеотид (рисунок 5).

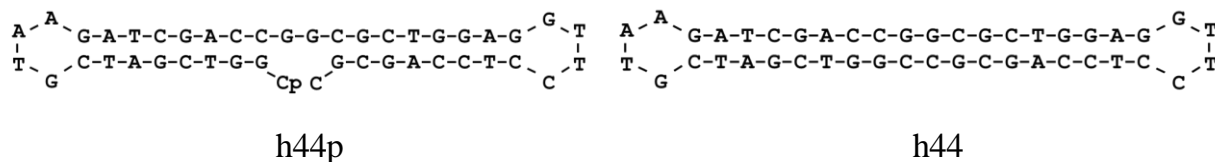


Рисунок 5 – Структуры модельных гантелеобразных дуплексов ДНК, использованных для изучения активации PARP1, с одноцепочечным разрывом (слева – дуплекс ДНК h44p) и без него (справа – дуплекс ДНК h44).

Для максимального сходства предложенной модели с реальными интермедиатами, встречающимися при репарации повреждений ДНК, последовательность содержала концевую фосфатную группу на 5'-конце разрыва.

Сначала были подобраны оптимальные условия проведения реакции – концентрация h44p – 11,7 нМ, PARP1 – 0,1 ед.

На следующем этапе мы провели сравнительный анализ количества образующейся поли-(АДФ)-рибозы как продукта активации PARP1, при наличии и отсутствии одноцепочечного разрыва в молекуле ДНК, h44p и h44, соответственно..

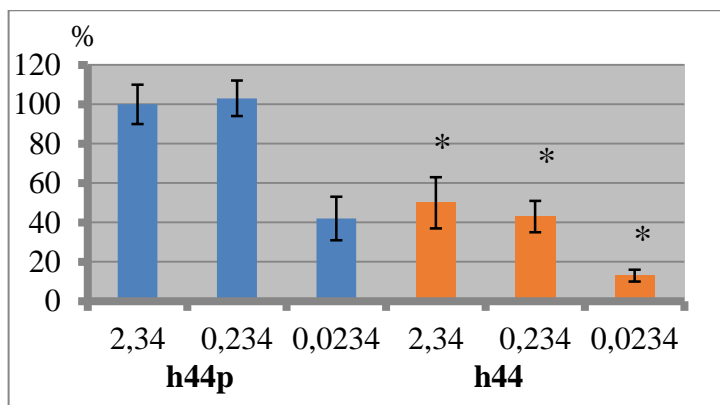


Рисунок 6 – Зависимость количества поли-АДФ-рибозы от концентрации ДНК-дуплекса h44p (синий) и h44 (оранжевый). Значения нормированы на 2,34 мМ концентрацию ДНК-дуплекса h44p с одноцепочечным разрывом (* – значения относительной интенсивности полос статистически значимо отличны от соответствующих контролей, $p < 0,05$).

Было показано (рисунок 6), что при эквимольных концентрациях ДНК-активатора с разрывом и без него реакция поли-АДФ-рибозилирования идет значительно активнее при наличии разрыва в ДНК. Полученные результаты о влиянии одноцепочечного разрыва в дуплексе ДНК на активность фермента согласуются с данными о том, что наличие одноцепочечного разрыва сильно увеличивает аффинность фермента к биополимеру.

Далее нами были исследованы ингибирующие эффекты описанных в литературе классических УБЛ: DAPI, Diminazene, Hoechst 33258, Netropsin, Pentamidine. Была определена дозовая зависимость – для определения среднего количества образующейся рADPr при разной концентрации ингибитора. В качестве положительного контроля использовался 4ANI (является конкурентом NAD, за счет чего ингибируют активность PARP1; в клинике применяется при ишемии миокарда), в концентрации, при которой реакция полностью подавляется (ингибирование 100%). В результате было показано, что наибольшей ингибирующей способностью обладают DAPI, Diminazene, Hoechst 33342 (рисунок 7).

Кроме классических УБЛ в наших экспериментах была проанализирована ингибирующая способность новосинтезированных димерных производных Hoechst. Несмотря на большее сродство к ДНК нами было показано что, все соединения серии DBP хуже ингибировали ферментативную активность PARP1, чем Hoechst 33258. Для дальнейшего изучения были отобраны DAPI, Diminazene и Hoechst 33258, для которых были определены IC_{50} .

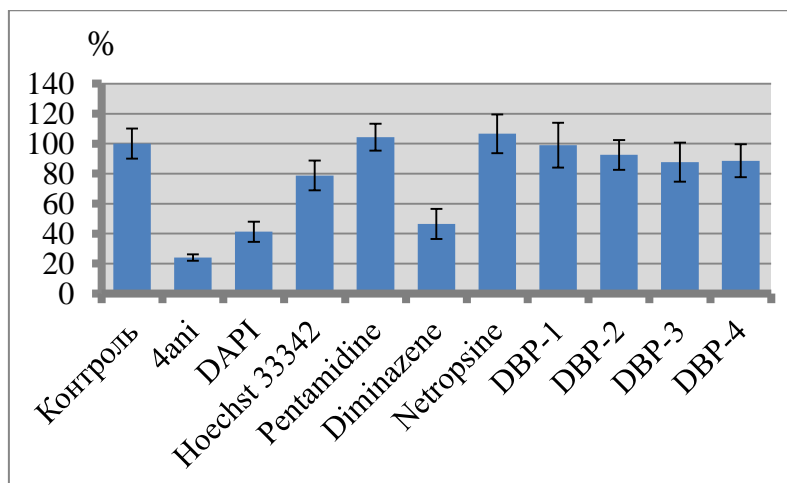


Рисунок 7 – Зависимость количества поли-АДФ-рибозы от присутствия различных УБЛ, при активации белка PARP1 ДНК-дуплексом h44p с одноцепочечным разрывом. Значения нормированы на количество поли-АДФ-рибозы в отсутствие УБЛ.

Кроме классических УБЛ в наших экспериментах была проанализирована ингибирующая способность новосинтезированных димерных производных Hoechst. Несмотря на большее сродство к ДНК нами было показано что, соединения серии DBP хуже ингибировали ферментативную активность PARP1, чем Hoechst 33258, при этом различия в ингибирующей активности DBP 1–4 были слабо выражены поэтому для дальнейшего изучения были отобраны DAPI, Diminazene и Hoechst 33258. Для которых были определены IC_{50} .

Результаты эксперимента с DAPI показывают, что концентрация полумаксимального ингибирования ферментной реакции для соединения составляет 62,5 нМ. При такой концентрации на 1 молекулу УБЛ приходится 3,4 пары оснований, что соответствует 5,3 молекулам DAPI на 1 молекулу h44p.

Для аналогичного эксперимента с Diminazene IC_{50} для этого агента составляет 0,132 мкМ, что соответствует 11,3 молекулам Diminazene на 1 молекулу h44p. Эти результаты согласуются с данными о том, что Diminazene обладает большей сиквенс-специфичностью и избирательностью связывания с ДНК (в том числе и с h44p) по сравнению с DAPI.

Наконец, результаты эксперимента с Hoechst 33258 показывают, что IC_{50} для данного соединения составляет 13,3 мкМ, что на два порядка выше при сравнении с Diminazene. Это, по всей видимости, связано с тем, что Hoechst 33258 обладает большей специфичностью (по сравнению с DAPI и Diminazene) и требует большего количества пар для эффективного связывания.

Далее нами было изучено влияние на ингибирующий эффект УБЛ введения АТ-

богатого региона. Для этого эксперимента использовались: гантелеобразные структуры ДНК h44p, G1 и G2. Два последних дуплекса содержали АТ-богатые регионы, находящиеся на разном удалении от места разрыва (рисунок 8).

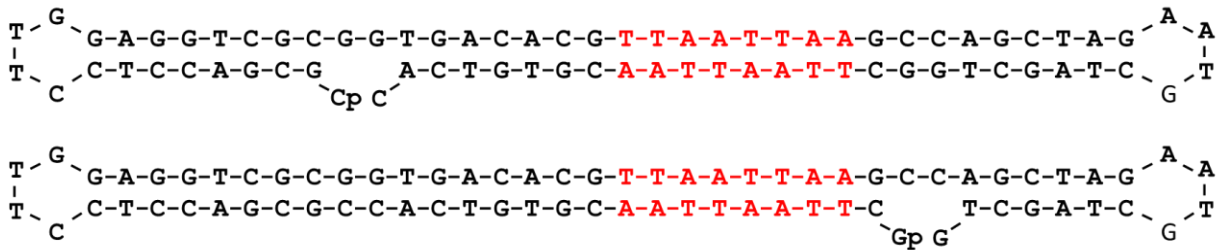


Рисунок 8 – Структуры модельных гантелеобразных дуплексов ДНК, использованных для изучения влияния последовательности ДНК на ингибирование активации PARP1: сверху (дуплекс ДНК G1) и без него внизу (дуплекс ДНК G2).

При анализе способности дуплексов G1 и G2 активировать реакцию автополи(АДФ)-рибозилирования было показано, что при использовании G2 активация ферментативной реакции происходит менее интенсивно в сравнении с активацией реакции дуплексом G1. При фиксированной концентрации ДНК и отсутствии ингибитора мы получили разные количества рADPr, что указывает на разную аффинность PARP1 к данным олигонуклеотидам.

В структуре обоих дуплексов G1 и G2 последовательность TCGATC находится на противоположных концах молекулы. Известно, что PARP1 обладает высокой аффинностью к разрыву ДНК, но также способен связываться с АТ-богатыми последовательностями. В дуплексе G1 последовательность ААТТ и ник удалены друг от друга на расстояние более 7 оснований, необходимых для посадки PARP1, что позволяет двум молекулам PARP1 связаться с ДНК. В гантелеобразном дуплексе G2 наблюдается обратная ситуация – последовательность ААТТ и одноцепочечный разрыв расположены всего в двух парах оснований друг от друга, вследствие чего активация двух молекул PARP1 становится невозможной. Это приводит к меньшему уровню активации фермента в случае активации дуплексом G1 в сравнении с дуплексом G2.

При исследовании влияния Diminazene на активацию реакции поли(АДФ)-рибозилирования при введении АТ-богатого региона в последовательности гантелеобразного ДНК-дуплекса было показано, что при эквимоллярных концентрациях ингибитора и активатора ингибирующая способность Diminazene значительно возрастает при наличии АТ-богатого сиквенса в ДНК-активаторе. Также нами была показана разница в активации белка PARP1 в присутствии Diminazene в концентрации 0,0117 мкМ, при

которой в случае модельного олигонуклеотида h44p ингибирующая активность УБЛ не регистрируется (рисунок 9). Это согласуется с данными наших экспериментов по изучению сиквенс-специфичности УБЛ и данными литературы о том, что Diminazene связывается с АТ-богатой последовательностью.

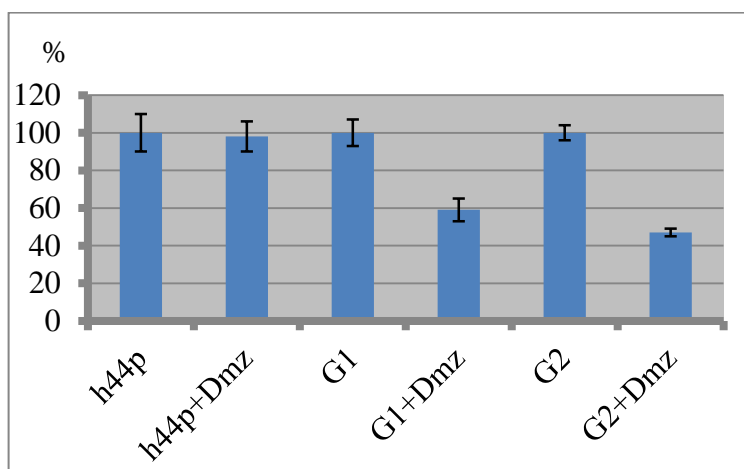


Рисунок 9 – Зависимость количества поли-АДФ-рибозы от присутствия Diminazene (Dmz) при активации белка PARP1 ДНК-дуплексами h44p, G1 и G2. Значения нормированы на количество поли-АДФ-рибозы в отсутствии УБЛ.

При изучении реакции ингибирования УБЛ Diminazene (при активации ДНК-дуплексами G1 и G2) показано, что, несмотря на то что Diminazene ингибирует активность белка PARP1 на 50% эффективнее, чем при активации h44p, статистической значимости в разнице ингибирования при активации G1 и G2 не продемонстрировано (59% против 47%). Возможно, такой эффект обусловлен тем, что в дуплексе G2 ингибирование активации главным образом проходит по АТ-богатому сайту (с учетом специфичности УБЛ) и соответствует ингибированию активности приблизительно на 50% (так, участков активации два), в то время как в G1 (где и одноцепочечный разрыв, и АТ-богатый находятся рядом) ингибирование идет и по одноцепочечному разрыву, и по АТ-богатому сайту одновременно. Согласно эксперименту с h44p ингибирование может составлять около 50%; можно предположить, что в ДНК-дуплексе G2 приблизительно на таком же уровне. Поэтому Diminazene ингибирует активацию белка PARP1 приблизительно на 50% и дуплексом ДНК G1, и дуплексом ДНК G2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе было выполнено изучение механизмов ряда биологических эффектов и физико-химических свойств УБЛ – соединений, способных специфично связываться с малой бороздкой ДНК. На модельной системе гетерозиготных D.

melanogaster в тесте на соматический мутагенез и рекомбинацию был проанализирован механизм бластомогенной активности Hoechst 33258 и Hoechst 33342. С помощью футпринтинга ДНК с использованием ДНКазы I была продемонстрирована сиквенс-специфичность взаимодействия УБЛ с ДНК. О сиквенс-специфичности взаимодействия УБЛ с ДНК также свидетельствуют данные, полученные в модельной системе бактериальных штаммов E.coli с двойной репортерной системой с флуоресцентными белками Cer и RFP, находящимися под одинаковыми и различающимися промоторами. Было продемонстрировано различие эффектов УБЛ на уровень экспрессии генов, имеющих разные последовательности нуклеотидов в их промоторных областях. На реконструированной системе анализа поли-АДФ-рибозилирования были изучены эффекты УБЛ на функционирование одного из ключевых белков запуска репарации PARP1.

ВЫВОДЫ

1. Соединения Hoechst 33258 и Hoechst 33342, относящиеся к классу УБЛ, индуцируют появление соматических гиперпластических клонов в тесте SMART у гетерозигот дрозофилы wts/+. Бластомогенный эффект этих соединений снижен у гетерозиготных дрозофил wts/mus309 и не наблюдается у дрозофил wts/TM3, у которых нарушена система соматической гомологичной рекомбинации. Эти данные свидетельствуют о преимущественно рекомбиногенном механизме бластомогенного действия Hoechst 33258 и Hoechst 33342.

2. Футпринтинг ДНК с использованием ДНКазы I, оптимизированный путем использования флуорофоров для визуализации продуктов расщепления ДНК, представляет собой адекватный метод анализа сиквенс-специфичности взаимодействия УБЛ с ДНК. Наибольшая эффективность визуализации продуктов расщепления ДНК наблюдалась при использовании флуорофоров TAMRA и Cy3.

3. В присутствии УБЛ (DAPI, Diminazen, Pentamidin, Hoechst, серия DB и серия DBP, CBL0137) наблюдался специфический для каждого из проанализированных соединений профиль расщепления ДНКазой I. Общим свойством изученных УБЛ, за исключением CBL0137, является взаимодействие с АТ-богатыми последовательностями.

4. Влияние УБЛ на экспрессию белков RFP и Cerulean в двухрепортерной системе зависит от последовательности нуклеотидов в промоторных областях соответствующих генов, что свидетельствует о возможности использования данной системы для анализа сиквенс-специфичности УБЛ в системе *in vivo*.

5. Для изучения функционирования белка PARP1 адекватной модельной системой является реконструированная система реакции поли-АДФ-рибозилирования с использованием гантелеобразных дуплексов ДНК в качестве активатора фермента.

Наличие одноцепочечных разрывов в гантелеобразных дуплексах увеличивает ферментативную активность белка PARP1.

6. УБЛ ингибируют активность белка PARP1 при его активации гантелеобразными дуплексами с одноцепочечным разрывом. Ингибирующая способность УБЛ снижается в ряду: DAPI > Diminazene > Hoechst. IC₅₀. Действие Diminazena наблюдается при использовании доз, не проявляющих токсического эффекта *in vivo*, что позволяет рекомендовать данное соединение к применению в комбинированной противоопухолевой терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шалгинских, Н.А. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в химическом канцерогенезе / Н.А. Шалгинских, Н.Ю. Карпеченко, А.М. Оглоблина, Е.А. Лесовая, К.И. Кирсанов, Д.С. Набережнов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – № 3. – С. 46–68.

2. Набережнов, Д. С. ДНКза-футпринтинг комплексов ДНК с малыми молекулами, с использованием флуоресцентной метки / Д.С. Набережнов, К. И. Кирсанов, М.Г. Якубовская // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2 (часть 25). – С. 5599–5604

3. Safina, A. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells / A. Safina, P. Cheney, M. Pal, L. Brodsky, A. Ivanov, K. Kirsanov, E. Lesovaya, D. Naberezhnov, E. Neshet, I. Koman, D. Wang, J. Wang, M. Yakubovskaya, D. Winkler, K. Gurova // NAR. – 2017. – Vol. 45(4). – P. 1925–1945.

4. Набережнов, Д.С. Сравнительный анализ влияния узкобороздочных лигандов на активацию белка PARP1 / Д.С. Набережнов, В.Ю. Глазунов, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – Режим доступа: <https://www.science-education.ru/pdf/2016/6/25685.pdf>

5. Карпеченко, Н.Ю. Спонтанная олигонуклеотидная инвазия в (CA/TG)_n-повторы как основа их функционирования в «горячих» точках рекомбинации / Н.Ю. Карпеченко, В.К. Гасанова, Д.С. Набережнов, Н.Г. Долинная, М.Г. Якубовская // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2014. – № 12 (часть 4). – С. 30–35.

6. Yakubovskaya, M. Epigenetically active xenobiotics in cancer prevention and therapy optimization / M. Yakubovskaya, N. Shalginskikh, D. Naberezhnov, K. Kirsanov, E. Lesovaya, G. Belitsky // European Journal of Cancer. – 2015. – Vol. 14. – p.66-67

7. Kirsanov, K. Multiple mechanisms of DNA minor groove binding ligand epigenetic

effects / K. Kirsanov, E. Lesovaya, N. Shalginskikh, D. Naberezhnov, V. Glazunov, G. Belitsky, M. Yakubovskaya // *European Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 14. – p.24

8. Оглоблина, А.М. Формирование G-квадруплексами гуанин-богатыми повторяющимися последовательностями / А.М. Оглоблина, Д.С. Набережнов, М.Г. Якубовская, Н.Г. Долинная // V Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома». – 3–7 декабря 2012 г. – С. 50.

9. Набережнов, Д.С. Оценка влияния малых ДНК-связывающих молекул на экспрессию генов / Д.С. Набережнов, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская // VIII Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии. – 16–18 сентября 2014 г. – С. 108–109.

10. Набережнов, Д.С. Влияние последовательности ДНК на способность узкобороздочных лигандов ингибировать активность белка PARP-1 *in vitro* / Д.С. Набережнов, В.Ю. Глазунов, Е.А. Лесовая, А.В. Шубин, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов // Молекулярная онкология: итоги и перспективы. – 16–17 декабря 2015 г. // Успехи молекулярной онкологии. – Т. 2. – С. 49–50.

11. Набережнов, Д.С. Бластомогенная активность Hoechst33342 в тесте SMART, обусловленная его рекомбиногенным действием / Д.С. Набережнов, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская // III Всероссийская конференции по молекулярной онкологии, 6–8 декабря 2017 г. – С. 19.

12. Vlasova, O. Molecular Mechanisms of Tumor Preventive and Anticancer Effects of DNA Binding Small Molecule Curaxin / O. Vlasova, T. Fetisov, A. Ivanov, D. Naberezhnov, N. Karpechenko, E. Antoshina, T. Gorkova, O. Morosova, L. Trukhanova, I. Khitrovo, E. Lesovaya, G. Belitsky, K. Gurova, K. Kirsanov, M. Yakubovskaya // The 12th International Conference & 5th Asian Congress on Environmental Mutagens with the 33rd Annual Meeting of KSOT/KEMS. – November 12–16. – 2017. – P. 183.